

MARLUCI MONTEIRO GUIRADO

Outros Aspectos do Efeito da Cafeína e da
Borra do Café em *Aedes aegypti*



1910001284



MARLUCI MONTEIRO GUIRADO

**OUTROS ASPECTOS DO EFEITO DA CAFEÍNA E DA
BORRA DO CAFÉ EM *Aedes aegypti***

Dissertação apresentada para
obtenção do Título de Mestre
em Genética.

**São José do Rio Preto - SP
2004**

MARLUCI MONTEIRO GUIRADO

**OUTROS ASPECTOS DO EFEITO DA CAFEÍNA E DA
BORRA DO CAFÉ EM *Aedes aegypti***



A.1.284/04

**Dissertação apresentada para
obtenção do Título de Mestre
em Genética.**

Orientadora: Profa. Dra. Hermione Elly Melara de Campos Bicudo

São José do Rio Preto - SP

2004

1575
69650

20264000

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO



Programa de Pós-Graduação em Genética

MARLUCI MONTEIRO GUIRADO

OUTROS ASPECTOS DO EFEITO DA CAFEÍNA E DA

BORRA DO CAFÉ EM *Aedes aegypti*

Guirado, Marlucci Monteiro.

Outros aspectos do efeito da cafeína e da borra do café em *Aedes aegypti* / Marlucci Monteiro Guirado – São José do Rio Preto: [s.n.], 2004.

147 f. il. ; 30 cm.

Orientador: Hermione Elly Melara de Campos Bicudo

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

1. *Aedes aegypti* – Controle alternativo. 2. *Aedes aegypti* – Mortalidade. 3. *Aedes aegypti* – Desenvolvimento. 4. Borra do café. 5. Cafeína. 6. Esterases. I. Bicudo, Hermione Elly Melara de. II. Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 575

Orientadora: Profa. Dra. Hermione Elly Melara de Campos Bicudo

São José do Rio Preto - SP

2004



MARLUCI MONTEIRO GUIRADO

**OUTROS ASPECTOS DO EFEITO DA CAFEÍNA E DA
BORRA DO CAFÉ EM *Aedes aegypti***

DISSERTAÇÃO APRESENTADA PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE.

COMISSÃO JULGADORA

Presidente e Orientadora:.....

2º Examinador:.....

3º Examinador:.....

São José do Rio Preto - SP

____/____/____

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Vetores do 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" (IBILCE / UNESP), sob a orientação da Profa. Dra. Hermione Elly Melara de Campos Bicudo.



*Aos meus pais Leonildo e Sônia (in
memorian) por todo amor, dedicação,
sacrifícios e ensinamentos que permitiram
que eu concluísse mais esta importante
etapa de minha vida.*

*Ao Gabriel, meu filho, por toda alegria
que você me proporciona.*

Dedico...



Agradecimentos

Ao término deste trabalho, gostaria de agradecer às pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para a sua realização:

Agradeço especialmente à Profa. Hermione Elly Melara de Campos Bicudo, grande mestre e exemplo de sabedoria, pela incansável orientação nesse trabalho, por ter confiado no meu desempenho, pelo apoio e incentivo constantes e por me proporcionar crescimento e amadurecimento científico;

à Profa. Dra. Maria Tercília V. de A. Oliveira, pelo incentivo, interesse e por aceitar ser membro da banca examinadora;

ao Prof. Dr. José Poleze Soares Novo, pela disponibilidade em ser membro da banca examinadora;

às Profas. Marlene K. H. Kobayashi, Lilian Madi-Ravazzi e Mary Massumi Itoyama, pela atenção e convivência agradável;

aos Profs. do Departamento de Biologia, pelos ensinamentos e experiências transmitidos no decorrer do curso;

às Profas. Ana Elizabeth Silva e Tercília V. A. de Oliveira, responsáveis pela coordenação do Curso de Pós-Graduação em Genética, no período de realização deste trabalho, pela dedicação, atenção e orientação dispensadas;

ao Depto. de Biologia e a Direção do IBILCE/UNESP, pela disposição das condições materiais necessárias;

aos funcionários da Seção de Pós-Graduação, pela dedicação com que desempenham suas funções;

aos funcionários da Biblioteca, especialmente Maria do Carmo Junqueira e Maria Luiza, pelas orientações e Elaine Aparecida Silva Colombo, pela revisão das referências bibliográficas;

ao Prof. Dr. Antônio José Manzatto, pela valiosa colaboração na análise estatística;

aos funcionários do Biotério deste Instituto, Carlos, pela prestatividade com que sempre nos atendeu, e a Jorge, por fornecerem os camundongos para alimentação dos *Aedes*;



às Sras. Simone Carvalho, funcionária do Depto. de Biologia, e às Sras. Soraya e Rosângela, do Serviço de Atendimento Especializado (Saepe) deste Instituto, pelo atendimento atencioso e eficiente;

às companheiras do Laboratório de Vetores, Adriana Pasqueto Nascimento, Alessandra Augusta Bernardo e Cássia Cardoso de Oliveira, pela amizade e convivência agradável no ambiente de trabalho;

à Alessandra Theodoro Laranja, pela grande amizade em todos os momentos, pelas orientações e auxílios sempre que necessários;

à Jucimara Colombo, Aline Targa, Cláudia Pacheco e demais colegas da Pós-Graduação, por compartilharem os mesmos ideais;

manifesto minha gratidão de forma particular ao Sr. Reinaldo Defende, da SUCEN e Vigilância Epidemiológica, pela competência e prontidão em nos atender, trazendo ao laboratório as larvas e pupas coletadas do campo, sem as quais, não seria possível a realização deste trabalho;

à Cecília Cristina Marques, Diretora do Instituto Adolfo Lutz – Lab. I de São José do Rio Preto, pela colaboração e apoio, que permitiu que eu conciliasse o trabalho, com meus estudos, sou muito grata;

à Regina Alexandre Pagliusi, Isabel Cabrera, Ivete Z. C. Almeida, Jacqueline T. M. Peresi e a todos amigos do Instituto Adolfo Lutz, pelo interesse e estímulo;

aos meus pais Leonildo e Sônia (*in memorian*), que me formaram com seu amor e trabalho;

à minha irmã, Fabiola, pela amizade, apoio e ajuda constantes,

ao meu irmão Marcelo e minha cunhada Maria Luiza, pela compreensão e apoio;

ao meu querido filho, Gabriel, pelo carinho e pelos momentos felizes que me proporciona, me estimulando a não desanimar nunca;

ao Lúcio, pelo companheirismo, afeto, respeito, paciência e ajuda em todos os momentos;

a Deus, por tudo e por mais esta oportunidade;

SINCERAMENTE OBRIGADA!



Pode-se alcançar a sabedoria por três caminhos. O primeiro caminho é o da meditação, que é o mais nobre. O segundo é o da imitação, que é o mais fácil e o menos satisfatório. Em terceiro lugar, existe o caminho da experiência, que é o mais difícil.

Confúcio

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO.....	10
1. Importância médico-sanitária de <i>Aedes aegypti</i>	11
2. Aspectos biológicos de <i>Aedes aegypti</i>	16
3. Medidas de controle.....	25
4. Resistência.....	29
5. Formas alternativas de controle.....	31
6. A cafeína e a borra de café como controle.....	33
II. OBJETIVOS.....	37
III. MATERIAL E MÉTODOS	39
1. Organismo utilizado e procedência das amostras.....	40
2. Manutenção das amostras em laboratório.....	40
3. Experimentos.....	45
4. Eletroforese.....	54
4.1. Preparo das amostras.....	55
4.2. Preparo do gel.....	55
4.3. Coloração.....	57
4.4. Secagem do gel.....	58
4.5. Soluções.....	58
5. Análise estatística.....	60



IV. RESULTADOS.....	61
1. Estudo do efeito da idade das suspensões de borra de café e das soluções de cafeína na mortalidade das larvas de <i>Aedes aegypti</i>	62
2. Estudo da influência da cafeína e da borra de café na escolha do local para oviposição de <i>Aedes aegypti</i>	91
3. Estudo do efeito da cafeína na eclosão das larvas de <i>A. aegypti</i>	101
4. Estudo do efeito da cafeína na viabilidade dos adultos.....	107
5. Padrão de esterases em larvas tratadas com cafeína e temefós.....	109
V. DISCUSSÃO.....	115
VI. CONCLUSÕES.....	128
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	132
VIII. RESUMO.....	142
IX. ABSTRACT.....	145

INTRODUÇÃO

I. INTRODUÇÃO



1. Importância Médico-Sanitária do *Aedes aegypti*

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

O *Aedes aegypti* é originário da África e daí se alastrou para outras regiões, sendo atualmente cosmopolita (Reyes-Villanueva, 1990). É um vetor de enfermidades virais, como a febre amarela urbana e a dengue. A dengue é uma doença febril aguda que pode ser de curso benigno ou grave, dependendo da forma como se apresente: infecção inaparente, Dengue Clássico (DC), Febre Hemorrágica da Dengue (FHD) ou Síndrome do Choque da Dengue (SCD) (FUNASA, 2002). O DC e a FHD têm aumentado regularmente, em incidência e distribuição, durante os últimos 40 anos. Anualmente, é estimado que existem 20 milhões de casos de dengue no mundo, resultando em cerca de 24.000 mortes (WHO, 2003b).

A distribuição mundial do *A. aegypti* e a ocorrência de áreas com risco de transmissão de dengue, de acordo com o “International Travel and Health”, da World Health Organization (WHO), nos Estados Unidos, consta da Figura 1. Quanto à dengue hemorrágica, tem sido constatada com frequências variáveis, em praticamente todos os países em que ocorre a dengue.

Nas áreas urbanas do sudeste da Ásia, Pacífico Ocidental e praticamente em todo o continente americano, os indivíduos estão expostos a um

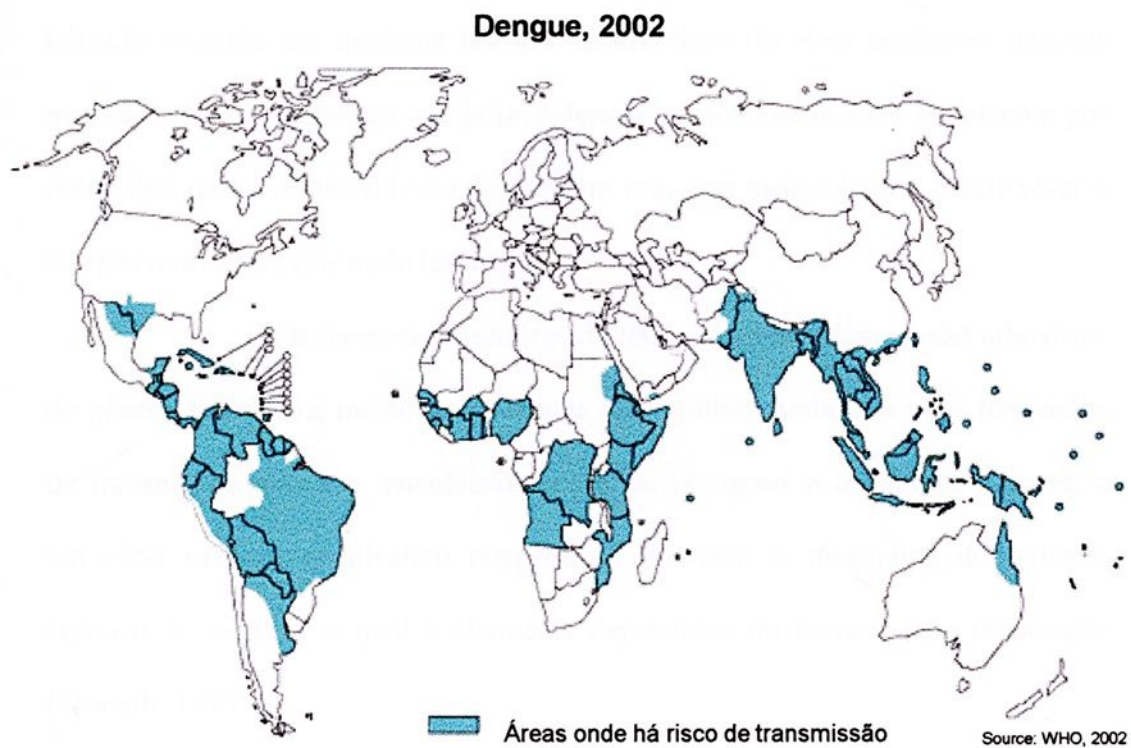


Figura 1 - Distribuição mundial do mosquito *Aedes aegypti*, com destaque das áreas com risco de transmissão de dengue no ano de 2002 (International Travel and Health, 2003).

ou mais dos quatro sorotipos do vírus da dengue que são chamados de DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4 (Clark, 1995). Esses sorotipos podem ser diferenciados sorologicamente (Westaway *et al.*, 1985 apud Barbosa, 1996) e bioquimicamente (Vezza *et al.*, 1980). Não existe imunidade entre os sorotipos; assim uma pessoa pode ter quatro infecções por dengue durante sua vida (Gubler & Trent, 1994). A infecção causada por qualquer um dos quatro tipos do vírus produz as mesmas manifestações. O indivíduo que já teve dengue, quando acometido novamente por outro tipo de vírus diferente do da primeira vez, está mais sujeito a desenvolver a febre hemorrágica, que pode levar a óbito.

Os agentes causadores da febre amarela e dengue são arbovírus, do gênero *Flavivirus*, membros da família *Flaviviridae*. Ambos os vírus têm ciclos de transmissão silvestre, envolvendo macacos selvagens e mosquitos vetores, e um ciclo urbano, envolvendo hospedeiros humanos e mosquitos domésticos, como o *A. aegypti*, o qual é altamente dependente do homem para oviposição (Monath, 1994).

Após ter sido erradicado na década de 50 (Pessoa e Martins, 1982; revisão em Schatzmayr, 1994), o *A. aegypti* reinviadiu o Brasil a partir dos anos 70. No Estado de São Paulo, 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 (Chiaravalloti Neto, 1997). O aumento da infestação desta e de várias outras regiões brasileiras, pelo mosquito, trouxe, como consequência, epidemias de dengue em muitas, e a ocorrência de



casos da febre hemorrágica, em algumas. Segundo os dados da Direção Regional de Saúde DIR-XXII, que abrange 101 municípios, no ano 2003, foram registrados, na região, 833 casos de dengue confirmados laboratorialmente, dos quais 400 em São José do Rio Preto, e quatro casos de dengue hemorrágico, sendo um no município de Ipiranga e três em São José do Rio Preto.

O ressurgimento da dengue e a emergência da dengue hemorrágica tornaram-se, nos últimos anos, um grave problema de saúde pública também no âmbito mundial. A doença é endêmica em mais de 100 países na África, Américas, Leste do Mediterrâneo, Sudeste da Ásia e Oeste do Pacífico (WHO, 2003a).

O Brasil está entre os países em que a situação é preocupante. A cada ano a doença vem se repetindo, sendo que o maior número de casos se concentra no período das chuvas, época em que as condições ambientais são propícias para o desenvolvimento e a proliferação do mosquito vetor. Porém, tem-se observado transmissão ao longo do ano, mostrando que a doença está endêmica em vários municípios (CVE, 2003a).

A partir de 1994, as epidemias têm apresentado maior vulto, espalhando-se para todas as regiões geográficas. No Estado de São Paulo, desde 1990 ocorrem epidemias todos os anos, com circulação detectada a partir de 1996 de vírus dos sorotipos 1 e 2 e, mais recentemente, do sorotipo 3. No Estado de São Paulo, este sorotipo foi detectado em 23 municípios, o que corresponde a 67,5% dos municípios que realizaram isolamento viral (CVE, 2003b), potencializando o



risco de surgimento de epidemias de febre hemorrágica da dengue, notadamente nas grandes metrópoles que já tiveram epidemias por dois sorotipos.

A transmissão da dengue se faz pela picada durante o dia, geralmente pela manhã e entardecer, do mosquito fêmea que adquiriu o vírus através da picada anterior, em um indivíduo infectado. O vírus entra no sistema digestivo e se dissemina para outros órgãos do mosquito, incluindo a glândula salivar. Após várias replicações na glândula salivar, o vírus, presente na saliva do mosquito, pode ser transmitido a outro indivíduo, na próxima picada, durante a ingestão de sangue (Halstead, 1988).

O período de incubação no homem, período entre a picada infectante e o aparecimento de sintomas, pode variar de 3 a 15 dias, sendo, em média, de 5 a 6 dias. O período de transmissibilidade ocorre enquanto houver vírus no sangue (período de viremia). Este período começa um dia antes do aparecimento dos sintomas e vai até o sexto dia da doença. Após um repasto de sangue infectado, o vírus vai se localizar nas glândulas salivares da fêmea do mosquito, em média, após 8 a 12 dias. Após esse período, o mosquito torna-se apto a transmitir o vírus e, assim, permanece por toda a sua vida (FUNASA, 1996).

A introdução dos diversos sorotipos do vírus e a manutenção da doença em muitas regiões do mundo vem ocorrendo devido à urbanização descontrolada nos trópicos, aumento demográfico, condições climáticas favoráveis para a proliferação dos vetores, deficiências dos programas de controle,



deteriorização dos programas de saúde pública e, finalmente, em decorrência de problemas econômicos e sociais (Barbosa, 1996; Rodhain, 1996).

2. Aspectos Biológicos do *Aedes aegypti*

A espécie *Aedes aegypti* foi descrita por Linnaeus em 1762 (Forattini, 1965). Pertence ao Filo Arthropoda (pés articulados), Classe Insecta (três pares de patas), Ordem Díptera (um par de asas anterior funcional e um par posterior transformado em halteres), Família Culicidae, Subfamília Culicinae, Gênero *Aedes* e Subgênero *Stegomyia*.

O *A. aegypti* é uma espécie tropical e subtropical, tem sua distribuição geográfica dentro de uma larga faixa compreendida entre os paralelos 45° de latitude norte e 35° de latitude sul. É considerado raro, o seu encontro além desses limites. A atividade humana somada a outros fatores tais como topografia regional, temperatura e umidade exercem marcada influência nesta distribuição (Gadelha & Toda, 1985).

A distribuição do *A. aegypti* também é limitada pela altitude. Embora não seja usualmente encontrado acima dos 1.200 metros, já foi referida sua presença a 1.700 metros acima do nível do mar, no México (Herrera Basto, 1992) e a 2.200 metros, na Colômbia (Nelson, 1985 apud Martinez Torres, 1990).

Em geral a distribuição do mosquito é controlada por sua própria biologia, que é afetada pelos limites de sua capacidade para suportar climas extremos e seu comportamento intimamente associado com populações humanas (Slosek, 1986). Como a água é necessária para o desenvolvimento dos



ovos e dos estádios larvais, a abundância de chuva e sua distribuição sazonal têm efeito no tamanho das populações do mosquito (Moore *et al.*, 1978).

Por sua estreita associação com o homem, favorecida pela utilização de recipientes artificiais para o desenvolvimento de formas imaturas, o *A. aegypti* é, essencialmente, mosquito urbano, encontrado em maior abundância em cidades, vilas e povoados. Entretanto, no Brasil, México e Colômbia, já foi localizado em zonas rurais, provavelmente transportado de áreas urbanas, em vasos domésticos, onde se encontravam ovos e larvas (FUNASA, 2001).

Os mosquitos se desenvolvem por meio de metamorfose completa, isto é, são holometábolos, e o ciclo de vida do *A. aegypti* compreende as fases de ovo, larva (quatro estádios larvários), pupa e adulto (Figura 2).

Os ovos do *A. aegypti* medem, aproximadamente, 1 mm de comprimento e têm contorno alongado e fusiforme (Forattini, 1965). São depositados pela fêmea, individualmente, diretamente na água ou nas paredes internas dos depósitos que servem como criadouros (lugares de nascimento e desenvolvimento do mosquito), pouco acima da superfície líquida. No momento da postura, os ovos são brancos, mas, após duas horas eles escurecem tornando-se quase negros (Gadelha & Toda, 1985).

Quanto às características da água, tem-se como estabelecido que existe preferência de *A. aegypti* por meios pouco poluídos, pobres em sais e matéria orgânica. Contudo, desde que as condições gerais sejam viáveis, é duvidoso que exista acentuada seletividade em relação a este fator, exceção feita



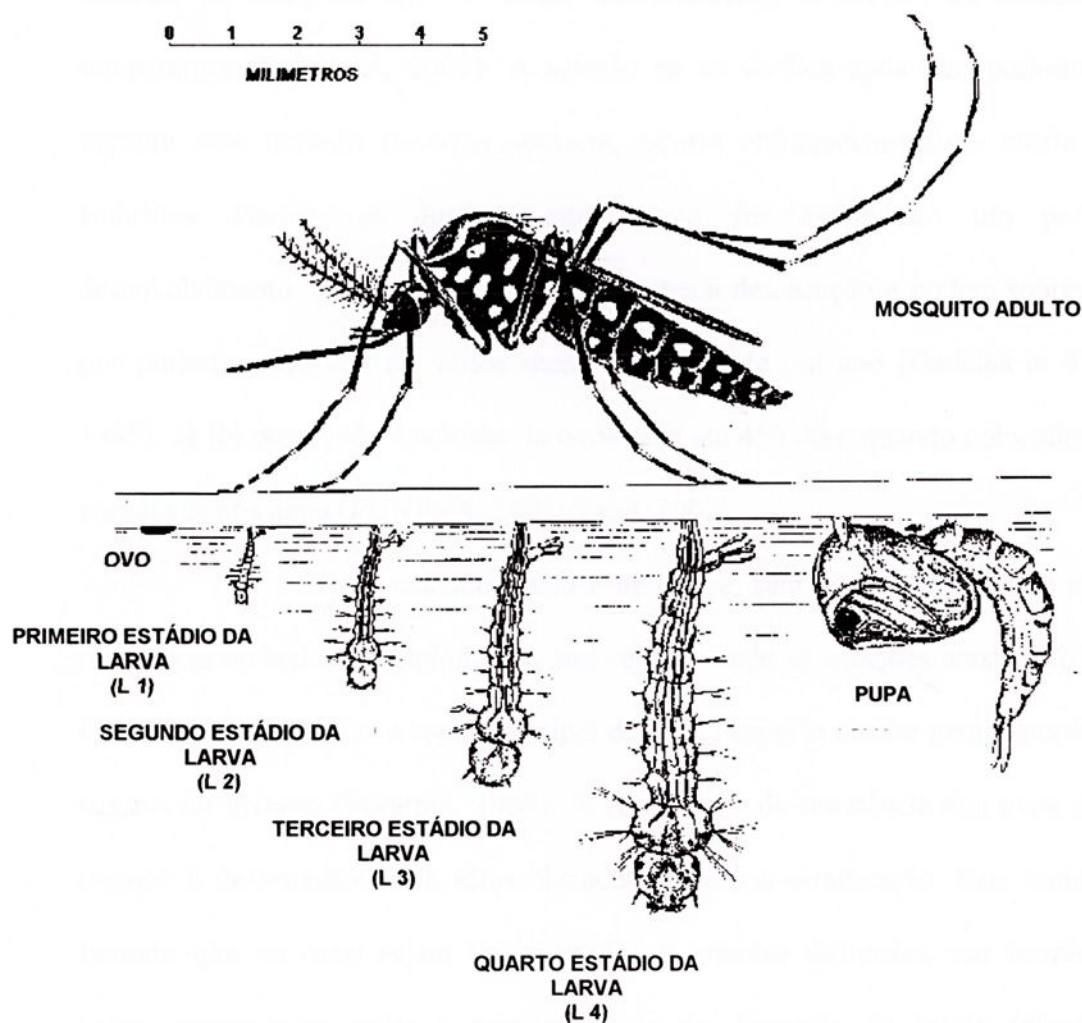


Figura 2 – Ciclo de vida do mosquito *Aedes aegypti* (modificado da Internet-www.prefeitura.unicamp.br/prefeitura/CA/DENGUE/3dengue_unicamp.html)

para forte salinidade ou outro elemento marcadamente desfavorável (Cristophers, 1960 apud Forattini, 1965).

A fecundação se dá durante a postura, e o desenvolvimento do embrião se completa em 48 horas, em condições favoráveis de umidade e temperatura (FUNASA, 2001). A eclosão só se verifica após esse período. Se durante esse período os ovos secarem, ocorre enfraquecimento e morte dos embriões. Porém, se durante este tempo for assegurado um perfeito desenvolvimento, os ovos se tornam resistentes à dessecação e podem sobreviver por períodos que vão de vários meses até mais de um ano (Gadelha & Toda, 1985). Já foi observada a eclosão de ovos com até 450 dias, quando colocados em contato com a água (FUNASA, 2001; Tauil, 2002).

Neste culicídeo, a fase de ovo é, sem dúvida, a etapa de maior resistência de seu ciclo biológico e, nas regiões onde as estações anuais são bem marcadas, é tida como o meio principal de que a espécie dispõe para suportar os rigores do inverno (Forattini, 1965). A capacidade de resistência dos ovos de *A. aegypti* à dessecação é um sério obstáculo para sua erradicação. Esta condição permite que os ovos sejam transportados a grandes distâncias, em recipientes secos, tornando-se assim o principal meio de dispersão do inseto (dispersão passiva) (FUNASA, 2001).

A fêmea distribui cada postura em vários recipientes. Os locais de postura são, de maneira quase exclusiva, depósitos líquidos artificiais situados em recipientes localizados bem próximos às habitações humanas ou mesmo dentro das casas. Assim sendo, existe uma grande variedade de tipos de



criadouros como, por exemplo, 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 (Forattini, 1965; Pessoa & Martins, 1982). Importante sob o ponto de vista da disseminação da espécie, é a presença de criadouros em ambientes portuários e em navios (Forattini, 1965).

O contato com a água parece ser o estímulo principal para a saída das larvas e, em condições normais, a grande maioria delas eclode decorridos alguns minutos ou no máximo horas, após a submersão no meio líquido. Contudo, outros fatores podem exercer influência estimulante, como por exemplo, a presença de microorganismos, a agitação da água, a composição do meio, a presença de substâncias químicas e a existência de oxigênio dissolvido. Os fatores hereditários devem ser também considerados influentes (Gadelha & Toda, 1985).

A larva que emerge do ovo é a primeira dos quatro estádios larvários. Ela cresce sequencialmente de 1 mm para 6 ou 7 mm de comprimento. A passagem de um estágio larval para o próximo é feito pelo processo de muda durante o qual ocorre o desprendimento do exoesqueleto. Um fluido é secretado para possibilitar a separação do exoesqueleto da nova cobertura desenvolvida sob o corpo. Abre-se então a cápsula cefálica e o tórax do exoesqueleto, deixando emergir a larva com um novo tegumento e com folga para aumentar o seu tamanho (Gadelha & Toda, 1985).



A fase larvária do *A. aegypti* é o período de alimentação e crescimento. Quando a larva do mosquito deixa o ovo, ela está fortemente adaptada para viver na água, tendo duas características que determinam seu modo de vida: o uso de oxigênio atmosférico para respiração e filtração da água para alimentação (Jones, 1978). As larvas se desenvolvem rapidamente nas águas impuras, onde se nutrem de microorganismos aquáticos (bactérias, algas e lêvedos), pólen e uma ampla variedade de detritos orgânicos, passando cerca de 95% do tempo filtrando água para reter partículas alimentares (Jones, 1978).

A duração da fase larvária depende da temperatura, disponibilidade de alimento e densidade das larvas no criadouro. Em condições ideais, o período entre a eclosão e a pupação pode não exceder de cinco a sete dias, ou ser protelada por tempo prolongado, caso existam condições desfavoráveis (Vanderley *et al.*, 1987). Condições adversas como suplemento alimentar inadequado, superpopulação de larvas e baixa temperatura podem prolongar o período do quarto estágio larvário por várias semanas, antes de sua transformação em pupa (Gadelha & Toda, 1985).

A larva do *A. aegypti* é composta de cabeça, tórax e abdômen. O abdômen é dividido em oito segmentos. O segmento posterior e anal do abdômen tem quatro brânquias lobuladas, para regulação osmótica, e um sifão ou tubo de ar para a respiração na superfície da água. O sifão é curto, grosso e mais escuro que o corpo. Para respirar, a larva vem à superfície, onde fica em posição quase vertical. Movimenta-se em forma de serpente, fazendo um "S" em seu deslocamento. É sensível a movimentos bruscos na água e, sob feixe de luz,



desloca-se com rapidez, buscando refúgio no fundo do recipiente (fotofobia) (FUNASA, 2001).

Tendo em vista a maior vulnerabilidade da fase larvária, as ações de combate devem, preferencialmente, atuar nessa fase.

As pupas são também aquáticas e, nessa fase, elas não se alimentam, só respiram e não são afetadas por ação de larvicidas. Respiram na superfície da água por meio de trompetas situadas no tórax (Borror & Delong, 1964 apud Clements, 1992). A cabeça e o tórax, com seus alongados apêndices, estão cimentados juntos na forma de um cefalotórax. O abdômen retém a forte musculatura larval e funciona como um órgão de propulsão efetivo. Neste estágio, a boca e o ânus são selados; desta forma a pupa não se alimenta e não elimina fluidos ou sólidos. O estágio final da metamorfose, na pupa, pode ser completado em um ou dois dias, se a temperatura for suficientemente alta (Clements, 1992). O tempo frio dilata esse período para cinco ou mais dias (Gadelha & Toda, 1985).

O adulto de *A. aegypti* representa a fase reprodutora do inseto. Como ocorre com grande parte dos insetos alados, essa é uma importante fase de dispersão. Entretanto, com o *A. aegypti* é provável que haja mais transporte passivo de ovos e larvas em recipientes do que dispersão ativa pelo inseto adulto (FUNASA, 2001). O adulto é geralmente escuro e seu tórax possui tegumento recoberto de escamas escuras e de outras branco-prateadas, as quais se dispõem formando o desenho classicamente comparado a uma “lira”. As “cordas” desta são representadas por um par de linhas médias finas, onde os elementos branco-prateados são mais estreitos. O abdômen é escuro com manchas brancas



prateadas, formando anéis. As pernas são escuras, sendo os fêmures e as tíbias revestidas de escamas brancas. Os artículos tarsais possuem nítida anelação branca, na extremidade basal (Gadelha & Toda, 1985).

O adulto recém-emergido passa suas primeiras 24 horas em repouso, pousado sobre as paredes ou outras superfícies verticais, sombreadas, ao redor do criadouro. Depois inicia um período de vôos curtos em busca do sexo oposto e de um hospedeiro para alimentação. Não há ordem para cópula e alimentação. Na fêmea, durante o repouso, ocorre um desenvolvimento folicular parcial, cujo término está sujeito à ingestão de sangue para a maioria dos mosquitos (anautogenia). A fêmea inicia o comportamento de busca 24 e 72 horas após ter eclodido. Uma fêmea jovem (24h) produz som de baixa frequência e não é perseguida por machos, porém uma fêmea madura (mais de 48h) produz som de maior frequência e é fortemente atrativa (Reyes-Villanueva, 1990). O acasalamento geralmente se dá durante o vôo, mas, ocasionalmente, pode ocorrer sobre uma superfície, vertical ou horizontal. Uma única inseminação é suficiente para fecundar todos os ovos que a fêmea venha a produzir durante sua vida (FUNASA, 2001).

Os machos alimentam-se preferencialmente de fluidos doces, como o néctar das flores. As fêmeas podem se alimentar de açúcar também, mas são dotadas de acentuada hematofagia. Em média, a fêmea de *A. aegypti* ingere cerca de 2,8 miligramas de sangue (Jones, 1978). Segundo Cristophers (1960) apud Marinotti *et al.* (1990), a fêmea de *A. aegypti* precisa ingerir sangue para a



demanda energética do metabolismo basal e do vôo, além da necessidade, já mencionada, para o desenvolvimento dos ovos.

Em geral, a fêmea faz uma postura após cada repasto sangüíneo. O intervalo entre a alimentação sangüínea e a postura é, em regra, de três dias, em condições de temperatura satisfatórias. Com frequência, a fêmea se alimenta mais de uma vez, entre duas sucessivas posturas, em especial quando perturbada antes de totalmente ingurgitada (cheia de sangue). Este fato resulta na variação de hospedeiros, com disseminação do vírus a vários deles (FUNASA, 2001).

Algumas fêmeas são ativas e só tem necessidade de um repasto sangüíneo para a maturação dos ovos; outras, ao contrário (e são em maior número), só efetuam postura 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 (Pessoa & Martins, 1982). Na falta do homem, ou experimentalmente, pode picar cães, gatos, ratos, cobaias, pássaros ou répteis (Pessoa & Martins, 1982).

O *A. aegypti* tem capacidade de dispersão ativa reduzida. Voa somente na brisa suave. Quando a velocidade do vento atinge 5 a 6 km por hora, procura abrigo. Esse fato provavelmente limita a sua autonomia de vôo, que raramente ultrapassa 100m do lugar de onde se originou. Isso se refere especialmente ao macho; por isso a sua presença é um indicador seguro de criadouros próximos (Gadelha & Toda, 1985).



3. Medidas de Controle

Como já foi mencionado, a dengue tornou-se endêmica no país desde meados da década de 80, ocasionando repetidas epidemias em muitas cidades, registrando-se, inclusive, a ocorrência da forma hemorrágica. Reverter esta situação específica exige a adoção de ações sistematizadas e de excelente nível, ações desencadeadas desde o nível local, mas que tenham por base diretrizes e normas estabelecidas nacionalmente, que possam ser adaptadas às características de cada realidade (FUNASA, 1996).

A notificação de casos suspeitos, a investigação do local provável de infecção e a busca ativa de casos são medidas importantes no controle da dengue, porém a ausência do vetor é a única garantia para que não ocorra a doença. Por isso, é fundamental o seu monitoramento permanente para conhecimento das áreas infestadas e desencadeamento das medidas de controle (FUNASA, 1996). O combate ao *A. aegypti* pode ser feito pela aplicação de produtos químicos ou biológicos em tratamento focal, peri-focal e aspersão de inseticidas em ultrabaixo-volume (UBV) ou por termonebulização, com máquinas especiais (FUNASA, 2001).

A seleção de métodos apropriados de monitoramento e controle depende dos objetivos da vigilância, dos níveis de infestação e da disponibilidade de recursos. De acordo com Pereira & Santucci (2003), por questão de praticidade, entre outras razões operacionais, os métodos empregados com mais frequência, para monitoramento das populações de culicídeos, envolvem levantamentos larvais. Geralmente, o imóvel é a unidade de pesquisa na qual se



procuram os recipientes que sirvam, potencialmente, ao desenvolvimento de mosquitos. Esses são examinados buscando-se a presença de formas imaturas de culicídeos (larvas e pupas).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) preconiza que há maior probabilidade de ser deflagrada uma epidemia quando os índices de infestação predial ou Índice de Breteau (número de imóveis com focos positivos de *A. aegypti* sobre o total de imóveis inspecionados vezes 100) estão acima de 5%. No entanto, não existe nível limite, abaixo do qual se possa ter certeza de que não ocorrerão surtos de dengue. Em áreas com *Aedes*, o monitoramento do vetor deve ser realizado constantemente, para desencadear as medidas de combate, mesmo nos períodos de baixa ou nenhuma transmissão de dengue (FUNASA, 2003a).

Os índices de infestação têm sido utilizados como instrumentos na avaliação de resultados de medidas de controle, conhecimento da composição dos principais tipos de recipientes e determinantes da abundância vetorial em determinados locais, possibilitando, assim, redirecionar e/ou intensificar determinadas atividades de controle, ou ainda, alterar as estratégias adotadas.

Segundo Ussui & Barata (2003), as medidas de controle e profilaxia podem ser principalmente de dois tipos:

- controle mecânico: são medidas dirigidas aos recipientes, constituindo-se na sua remoção ou alteração de suas condições de maneira a não permitir o acúmulo de água ou vedar a entrada de mosquitos adultos, evitando a



proliferação das formas imaturas de mosquito. Neste sentido, a participação da comunidade é dependente de programas de educação e conscientização.

- controle químico: consiste na aplicação de produtos químicos (inseticidas), de baixa a alta concentração, nos locais de criação do vetor e em suas proximidades ou locais de abrigo e repouso, em doses previamente determinadas, por meio de diferentes técnicas e equipamentos, devendo ser executados por pessoal treinado. Basicamente, é dividido em duas modalidades: larvicida, aplicado diretamente nos criadouros e adulticida, aplicado por nebulização.

Em nosso país, e mesmo no continente, as condições sócio-ambientais favoráveis à expansão do *A. aegypti* possibilitaram uma dispersão desse vetor, desde sua reintrodução em 1976, que não conseguiu ser controlada com os métodos tradicionalmente empregados no combate às doenças transmitidas por vetores. Programas essencialmente centrados no combate químico, com baixíssima ou mesmo nenhuma participação da comunidade, sem integração setorial e com pequena utilização do instrumental epidemiológico, mostraram-se incapazes de conter um vetor com altíssima capacidade de adaptação ao novo ambiente criado pela urbanização acelerada e pelos novos hábitos (FUNASA, 2003b).

Hoje em dia, considera-se a erradicação do *A. aegypti* praticamente impossível devido ao crescimento da população, ocupação desordenada do ambiente e à falta de infra-estrutura dos grandes centros urbanos. A industrialização também dificulta o enfrentamento desse tipo de inseto, já que



os novos produtos descartáveis, por ela produzidos (tais como copos e garrafas de plástico) são eliminados de forma incorreta e acabam por transformar-se em focos para a multiplicação do *A. aegypti*. Assim, como já foi dito, o máximo que se pode fazer é manter a população do mosquito em baixos níveis (Tauli, 2001; Ferreira, 2003).

Em 1996, o Ministério da Saúde decidiu rever a estratégia empregada contra o *A. aegypti* e propôs o Programa de Erradicação do *Aedes aegypti* (PEAa). Ao longo do processo de implantação desse programa observou-se a inviabilidade técnica de erradicação do mosquito a curto e médio prazo. O PEAa, mesmo não atingindo seus objetivos teve méritos ao propor a necessidade de atuação multissetorial e prever um modelo descentralizado de combate à doença, com a participação das três esferas de governo, Federal, Estadual e Municipal. A implantação do PEAa resultou em um fortalecimento das ações de combate ao vetor, com um significativo aumento dos recursos utilizados para essas atividades, mas ainda com as ações de prevenção centradas quase que exclusivamente nas atividades de campo de combate ao *A. aegypti* com o uso de inseticidas. Essa estratégia, comum aos programas de controle de doenças transmitidas por vetor em todo o mundo, mostrou-se absolutamente incapaz de responder à complexidade epidemiológica da dengue (FUNASA, 2003b).

Também se investiu na conscientização da população utilizando os meios de comunicação. Setores da população mobilizaram-se procurando envolver escolas, igrejas, etc., embora todos estes sejam meios que exigem continuidade para surtir algum efeito.



Os resultados obtidos no Brasil e o próprio panorama internacional, onde inexistem evidências da viabilidade de uma política de erradicação do vetor, a curto prazo, levaram o Ministério da Saúde a fazer uma nova avaliação dos avanços e das limitações, com o objetivo de estabelecer um novo programa de controle da dengue que incorporasse elementos como a mobilização social e a participação comunitária, indispensáveis para responder de forma adequada a um vetor altamente domiciliado (FUNASA, 2003b).

As tentativas de controle dos mosquitos têm sido grandemente dificultadas pela sua capacidade reprodutiva e flexibilidade genética elevadas, incluindo a dispersão de genes de resistência a inseticidas nas populações o que pode agravar a disseminação das doenças transmitidas (Besansky & Collins, 1992).

4. Resistência

O mosquito *A. aegypti* começou a mostrar resistência a organofosforados no Caribe, em 1950 (Slosek, 1986). Em 1980, a OMS divulgou a notícia da resistência desta espécie aos organofosforados Malation, Fenitrotrion, Fention e Temefós, usados amplamente no Caribe e países vizinhos e o Malation e Temefós, nos países asiáticos (Reyes-Villanueva, 1990). Esta capacidade do *A. aegypti* de se adaptar geneticamente aos inseticidas pode, eventualmente, frustrar completamente os esforços humanos para erradicá-lo (Slosek, 1986).

A utilização de inseticidas químicos requer um monitoramento e controle da toxicidade e resistência do vetor. No Brasil, a maioria dos agentes



químicos utilizados são organofosforados, pois as linhagens de *Aedes* que reinfestaram o País são resistentes a organoclorados (incluindo DDT) (Uribe, 1983 apud Marzochi, 1994). Os organofosforados são administrados na forma de granulado de areia com 1% de temefós, e são considerados seguros quando usados para matar larvas em recipientes com água (Jukes, 1983 apud Marzochi, 1994). Entretanto, o potencial tóxico destes químicos, quando aplicados em altas concentrações, como adulticidas, é um problema que requer investigações quanto à ação nas pessoas e meio ambiente (Marzochi, 1994). Durante os surtos de FHD, a maioria dos municípios utilizam aplicações de Malation, Fenitrotrion, Deltametrin e outros inseticidas para obter um rápido controle da população de mosquitos vetores (Gratz & Jany, 1994).

A maioria dos inseticidas utilizados estão atualmente sujeitos à degradação pelas esterases e desta maneira, essas enzimas constituem um dos principais mecanismos pelos quais os insetos se tornam resistentes. Em geral, a resistência tem sido relacionada com níveis mais altos de atividade esterásica (Mourya *et al.*, 1993). Os genes para tais esterases espalham-se rapidamente em uma população devido à seleção dos indivíduos resistentes, em áreas tratadas (Poirié *et al.*, 1992).

O nível de resistência em populações de insetos vetores é dependente do volume e frequência dos inseticidas aplicados. O rápido desenvolvimento de resistência em mosquitos é favorecido por características que incluem o curto ciclo de vida e a progênie abundante (Hemingway & Ranson, 2000).



Inseticidas organofosforados têm sido utilizados no controle do *A. aegypti* durante os últimos 15 a 20 anos, em várias regiões do mundo (Georghiou *et al.*, 1987). O temefós (Abate®), impregnado em grânulos de areia, é aplicado para controle larval em reservatórios hídricos, inclusive os de água potável, especialmente quando sua origem é duvidosa ou é sabidamente contaminada, o que tem favorecido o desenvolvimento de resistência a esse inseticida (Georghiou & Taylor, 1977; Rawlins & Wan, 1995).

5. Formas alternativas de controle

Diante dos efeitos tóxicos que podem ser causados pelos inseticidas, o uso de substâncias alternativas que venham a ajudar no controle do *Aedes*, é extremamente desejável. Nos últimos tempos, algumas investigações têm sido realizadas em busca de inseticidas de origem natural, que potencialmente possam ser incorporados no controle químico do vetor.

No biocontrole de mosquitos tem sido utilizados vários organismos, como por exemplo as bactérias *Bacillus thuringiensis israelensis* (*Bti*) e *B. sphaericus*, que produzem proteínas tóxicas para as larvas de mosquitos (Berry *et al.*, 1987; Khawaled *et al.*, 1990, 1992; Orduz, 1995; Melo-Santos, *et al.*, 2001). Esses microorganismos, no entanto, são mais eficientes contra vetores que se criam em quantidades grandes de água, como pântanos, rios e lagoas, porém, não são recomendáveis do ponto de vista prático para vetores que se reproduzem em pequenos depósitos temporários, que é o caso do *A. aegypti* (Reyes-Villanueva, 1990). De acordo com Polanczyk *et al.* (2003), o uso do *Bti* apresenta



algumas vantagens como segurança humana, baixo desenvolvimento de resistência e possibilidade de uso com produtos químicos, porém, segundo os mesmos autores, um impedimento de uso, em grande escala, é o baixo efeito residual devido principalmente à exposição direta da luz solar que inativa a toxina pela radiação ultravioleta.

Outros inimigos naturais de *A. aegypti* são todas as espécies de Toxorhynchites, as quais são predadoras na fase de larva; o adulto se alimenta de néctar e secreções vegetais. O maior atrativo de se empregar este mosquito como agente de biocontrole de *A. aegypti* é a incrível capacidade das fêmeas em localizar os recipientes com larvas, além de se utilizar menos inseticidas (Sherratt & Tikasingh, 1989; Focks, 1985 apud Reyes-Villanueva, 1990; Tikasingh & Eustace, 1992; Amalraj & Das, 1996, 1998)

Os copépodos da família Cyclopidae, atacam as larvas do mosquito, sendo também considerados inimigos naturais do *A. aegypti*. Suares et al. (1984 apud Reyes-Villanueva, 1990) foram os primeiros a relatar a eliminação de estádios imaturos deste mosquito em recipientes artificiais, na Colômbia, pelo copépodo *Mesocyclops aspericornis*. Outros estudos têm demonstrado que estes organismos podem funcionar como agentes de controle biológico, reduzindo a população larval (Marten et al., 1994; Santos & Andrade, 1997; Vu et al., 1998; Schaper, 1999).

Neng et al (1997) relatam o controle de *A. aegypti* na região central e sul da China, com o uso do peixe *Clarias fuscus* (peixe gato chinês), o qual é altamente larvívoro e tolera fortes mudanças ambientais.



Diferentes estratégias de controle estão sendo agora consideradas, incluindo a alteração genética dos mosquitos vetores, visando evitar a rápida proliferação do vírus nas suas glândulas salivares. Olson et al (1996) conseguiram, por alteração genética, tornar o mosquito *A. aegypti* incapaz de transmitir o vírus da dengue. Porém, é necessário saber se é possível integrar, de modo permanente, o DNA *antisense*, no material genético do mosquito e se o mosquito alterado pode tomar o lugar do selvagem.

6. A cafeína e a borra de café como controle

A cafeína vem sendo utilizada, desde a década de 80, em experimentos laboratoriais no Departamento de Biologia do IBILCE/UNESP. Seu uso em experimentos de controle de *A. aegypti* foi decorrente de ter mostrado efeito toxicológico em *Drosophila* em trabalhos realizados, anteriormente, no mesmo Departamento. Itoyama & Bicudo (1992); Itoyama et al (1998) usando meios de cultura com concentrações de cafeína iguais a 0,05, 0,1, 1,0 e 1,5 mg/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 concentração 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 tratadas, 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 2,5 mg/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 1,0 mg/mL e 1,5 mg/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).

A utilização da cafeína em testes com *A. aegypti* (Laranja et al., 2003) mostrou que a cafeína exerce um efeito dose dependente sobre o desenvolvimento do mosquito, de modo que quanto maior a concentração da cafeína, mais precoce o bloqueio do desenvolvimento. Nos experimentos iniciados com ovos, o desenvolvimento foi bloqueado na fase L1, no meio com cafeína a 2,0 mg/mL; em L2, no meio contendo 1,0 mg/mL; predominantemente nas fases L3 e L4, respectivamente, nos experimentos em que foram usadas as concentrações de 0,5 e 0,2 mg/ml. Nos experimentos iniciados com larvas L3 e



concentrações de 0,1 e 0,2 mg/ml de cafeína, foram obtidos adultos em número maior na primeira concentração.

No mesmo estudo, observou-se também, que a cafeína altera o padrão de bandas esterásicas dos indivíduos submetidos aos tratamentos, analisados em gel de poliacrilamida. Cinco bandas, sendo quatro carboxilesterases e uma acetilcolinesterase mostraram variação em larvas L4. Os autores consideraram que 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. Esses dados mostraram que a cafeína atua sobre esterases cuja classificação bioquímica é a mesma das 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.

Uma conclusão central observada no trabalho de Laranja et al. (2003) é a indicação de que a cafeína em concentração igual ou superior a 0,5 mg/mL pode ser um auxiliar no controle do *Aedes*. A possibilidade de utilizar cafeína como auxiliar de controle, pelo bloqueio do desenvolvimento em fases precoces, teria como vantagem principal a redução do uso de inseticidas organofosforados e piretróides.



Em função dos efeitos da cafeína e devido ao conteúdo desta substância, foram realizados testes toxicológicos com a borra de café. Por ser de fácil acesso à população, eventualmente poderia vir a ser colocado em pratos de vasos e flores e outros recipientes domésticos no lugar dos organofosforados granulados (abate). Em experimentos iniciados com ovos em que foram utilizadas as concentrações 25, 50 e 100 mg/mL de pó de café usado, não houve produção de adultos nas duas últimas concentrações. Na concentração 50 mg/mL o desenvolvimento foi bloqueado em L2.

IL. OBJETIVOS



II. OBJETIVOS

O presente projeto foi elaborado tendo em vista a necessidade de obter algumas informações adicionais, quanto ao efeito da cafeína e da borra do café, na mortalidade e desenvolvimento do *Aedes aegypti*. A disponibilidade dessas informações seria útil e poderia reforçar a indicação da cafeína e da borra do café como bioinseticidas.

Para obter essas informações procurou-se, basicamente, verificar:

1 - O tempo de validade, quanto à mortalidade larval e desenvolvimento, da solução de cafeína ou da suspensão de borra do café, em uso no criadouro experimental, ou da solução de cafeína estocada no ambiente e na geladeira;

2 - Se a cafeína e a borra do café podem exercer alguma atração ou repelência, sobre as fêmeas, para oviposição;

3 - Se há efeito da cafeína na eclosão das larvas; e

4- Se a cafeína, que mostrou ser eficiente no controle larval, pode exercer algum efeito na sobrevivência dos adultos.

5 - Complementarmente, foram feitas observações quanto ao padrão de bandas esterásicas de mosquitos tratados com cafeína e temefós.



1. OBJETIVO, JUSTIFICATIVA E IMPORTÂNCIA DA PESQUISA

A pesquisa objetiva avaliar a influência da qualidade da água sobre a saúde dos habitantes da cidade de São José do Rio Preto - SP, procurando-se estabelecer a relação entre a qualidade da água e a incidência de doenças. A pesquisa é justificada pela importância da água para a saúde humana e pela necessidade de se estabelecer a qualidade da água para a população. A importância da pesquisa é a de estabelecer a relação entre a qualidade da água e a saúde humana, o que é fundamental para a melhoria da qualidade de vida da população.

2. REVISÃO DE LITERATURA

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a água é um dos recursos mais importantes para a vida humana. A água é essencial para a sobrevivência e para a saúde humana. A água é também um dos recursos mais importantes para a produção de alimentos e para a indústria. A água é, portanto, um recurso essencial para a vida humana e para a sociedade.

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a água é um dos recursos mais importantes para a vida humana. A água é essencial para a sobrevivência e para a saúde humana. A água é também um dos recursos mais importantes para a produção de alimentos e para a indústria. A água é, portanto, um recurso essencial para a vida humana e para a sociedade.

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a água é um dos recursos mais importantes para a vida humana. A água é essencial para a sobrevivência e para a saúde humana. A água é também um dos recursos mais importantes para a produção de alimentos e para a indústria. A água é, portanto, um recurso essencial para a vida humana e para a sociedade.

III. MATERIAL E MÉTODOS

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a água é um dos recursos mais importantes para a vida humana. A água é essencial para a sobrevivência e para a saúde humana. A água é também um dos recursos mais importantes para a produção de alimentos e para a indústria. A água é, portanto, um recurso essencial para a vida humana e para a sociedade.

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a água é um dos recursos mais importantes para a vida humana. A água é essencial para a sobrevivência e para a saúde humana. A água é também um dos recursos mais importantes para a produção de alimentos e para a indústria. A água é, portanto, um recurso essencial para a vida humana e para a sociedade.

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a água é um dos recursos mais importantes para a vida humana. A água é essencial para a sobrevivência e para a saúde humana. A água é também um dos recursos mais importantes para a produção de alimentos e para a indústria. A água é, portanto, um recurso essencial para a vida humana e para a sociedade.

1. ORGANISMO UTILIZADO E PROCEDÊNCIA DAS AMOSTRAS

No presente trabalho, foram utilizadas amostras da população de *Aedes aegypti* de São José do Rio Preto – SP, provenientes de coletas, em diferentes pontos da cidade. Ovos, larvas e pupas coletados por funcionários da Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN) e Vigilância Epidemiológica Municipal, foram trazidos ao Laboratório de Vetores do IBILCE e utilizados nos estudos.

2. MANUTENÇÃO DOS MOSQUITOS EM LABORATÓRIO

No laboratório, os mosquitos foram criados em água de torneira, à temperatura ambiente, no interior de gaiolas de madeira, com tela fina de nylon nas paredes e na parte superior. Na parte anterior da gaiola, uma abertura guarnecida de tecido serve para manipulação (Figura 3).

Ao emergirem, os adultos da espécie *Aedes aegypti* foram identificados com o auxílio de uma lupa de mão e transferidos para a gaiola. As características morfológicas desses mosquitos permitem que os mesmos sejam facilmente distinguidos de outras espécies (Figura 4).

Os adultos foram alimentados, no laboratório, com uma solução aquosa de açúcar na concentração de 0,08 g/mL, trocada a cada semana. Esta é colocada em um frasco de boca estreita contendo um chumaço de algodão imerso, deixando uma pequena porção do algodão exposta para que os mosquitos possam sugar (Figura 5). Tanto os machos como as fêmeas alimentam-se desta solução.





Figura 3 – Gaiolas de madeira utilizadas para a criação de *Aedes aegypti*, na Sala de Cultura do Laboratório de Vetores do IBILCE / UNESP.

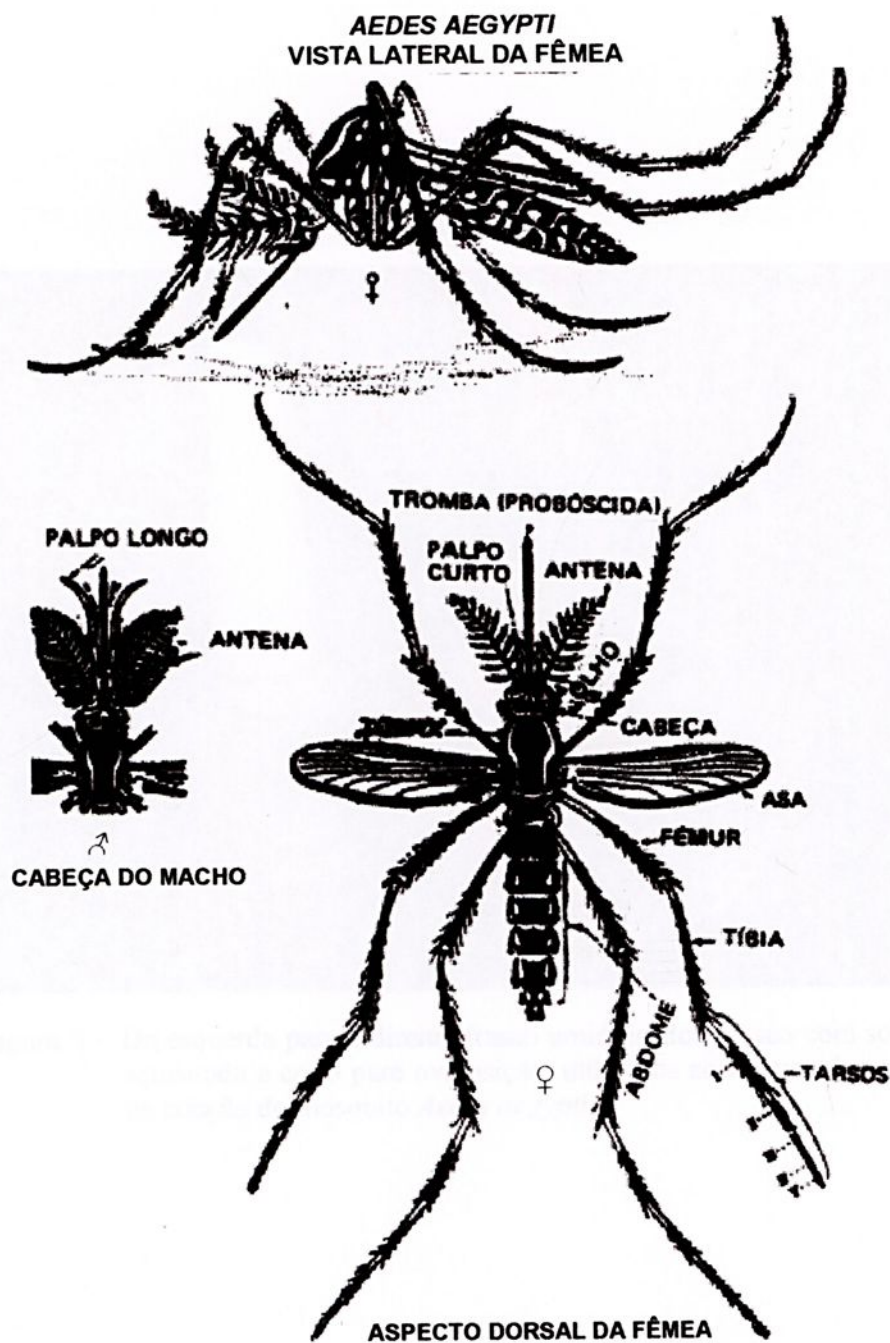


Figura 4 – Vista lateral e dorsal do mosquito fêmea de *Aedes aegypti* e detalhe da cabeça do macho (FUNASA, 2001).



Figura 5 – Da esquerda para a direita, frasco umidificador, frasco com solução açucarada e copo para oviposição, utilizados no interior das gaiolas de criação do mosquito *Aedes aegypti*.

Porém, para a obtenção de ovos, as fêmeas foram alimentadas com sangue de camundongo, cedido pelo Biotério do Departamento de Zoologia deste Instituto. Para isto, o camundongo é preso em uma tela quadriculada de arame, ficando imobilizado e exposto à alimentação das fêmeas, por um período de uma hora. Este procedimento é realizado uma ou mais vezes por semana, colocando-se os camundongos tanto nas gaiolas de criação como na dos experimentos. Na véspera da alimentação com sangue, a solução de açúcar é retirada para que os mosquitos fiquem em jejum.

Para a coleta dos ovos, no interior das gaiolas é colocado um copo com água de torneira até um terço da sua capacidade, na qual se imerge uma tira larga de papel de filtro, rodeando o interior do copo, onde as fêmeas realizam suas posturas, geralmente no limite da superfície da água (Figura 5). Este papel de filtro contendo os ovos é colocado para secar durante, aproximadamente, 24 horas. Após esse período, os ovos são contados, embalados em saquinhos plásticos e identificados, anotando-se o nome da espécie, procedência, data da embalagem e número de ovos. Os ovos embalados são estocados para serem utilizados, posteriormente, até por volta de um ano. Porém, sua utilização nos experimentos deste trabalho não ultrapassou 30 dias após a oviposição.

As larvas que eclodem dos ovos obtidos no laboratório são alimentadas com ração macerada de peixe, para acelerar seu desenvolvimento. Esta é colocada no meio aquoso quando a maioria das larvas já estão na fase L₃. A água com ração deve ser trocada semanalmente.



Para manter a umidade, é colocado no interior das gaiolas, um recipiente (umidificador), que consiste de um copo contendo água e um cone de papel de filtro, nele parcialmente imerso (Figura 5).

A temperatura e umidade do ar da Sala de Cultura de *Aedes* são registradas, pelo menos três vezes ao dia, utilizando um medidor digital (Fisher Scientific 11-661-9), com o objetivo de eventualmente explicar algum resultado com base na variação desses fatores.

A Sala de Cultura do *A. aegypti* do Laboratório de Vetores possui como medidas de segurança, os vitrôs protegidos com telas de nylon e uma ante-sala com as paredes brancas que permite visualizar algum mosquito que eventualmente escape para o meio ambiente.

3. EXPERIMENTOS

Foram realizados experimentos, utilizando-se os meios borra de café (pó de café usado), cafeína e o inseticida temefós, nos tratamentos, e água de torneira para controle.

A borra de café provinha geralmente da mistura de marcas diversas de café e, na maioria das vezes, foi utilizada nos experimentos no mesmo dia de seu uso para preparo da bebida. A cafeína utilizada foi a da Acros Organics, a 98,5% ($C_8H_{10}N_4O_2$) e o temefós, o mesmo usado pela SUCEN no controle larval do *Aedes*, na concentração de 1% impregnado em grãos de areia.

Como foi mencionado, foram realizados experimentos para:

1 – Analisar o efeito da solução de cafeína ou suspensão de borra do café sobre a mortalidade e desenvolvimento do *Aedes*;

2 – Verificar se a presença de cafeína ou borra do café na água afeta a escolha do local para oviposição;

3 – Verificar se a presença da cafeína, no meio, influencia a taxa de eclosão; e

4 – Verificar se a ingestão da cafeína pode causar efeito na sobrevivência dos adultos.

Além disso, foram também realizadas algumas análises do padrão de esterases, por eletroforese em gel de poliacrilamida, a fim de detectar alterações causadas pelos tratamentos.

A Tabela 1 apresenta um resumo das condições em que foram realizados os experimentos, abrangendo o estágio dos organismos no início dos mesmos, o número de indivíduos utilizados em cada teste, as concentrações utilizadas de cada substância no meio (borra do café, cafeína e temefós) e se houve ou não o acréscimo de alimento.

I – ESTUDO DO EFEITO DA IDADE DAS SUSPENSÕES DE BORRA DE CAFÉ E DAS SOLUÇÕES DE CAFEÍNA, NA MORTALIDADE DAS LARVAS DE *Aedes aegypti*.

Este estudo baseado em oito experimentos, nos quais houve ou não acréscimo de alimento (ração de peixe) nos meios de criação dos mosquitos, buscando avaliar, na medida do possível, as diferentes condições ambientais utilizadas pelos mosquitos, quanto à disponibilidade de alimento.



Tabela 1 - Condições de realização dos quatro estudos. Estádio e número dos indivíduos que deram início aos experimentos, concentrações dos meios utilizados (borra de café, cafeína e temefós) e acréscimo ou não de alimento. L3 = larva no terceiro estágio; L4 = larva no quarto estágio; N = número total de ovos, larvas ou adultos em todas as réplicas tratadas e controle dos experimentos

Estudos	Estádio	Experi- mentos	N	Meios utilizados e concentração			Alimento
				Borra do Café (mg/mL)	Cafeína (mg/mL)	Temefós (µg/mL)	
I	L3 + L4	1	81	300			não
		2	590	75; 150; 225;300			não
		3	440	75; 150; 225;300			sim
		4	610		0,2; 0,5; 1,0; 2,0		não
		5	350		0,5; 1,0; 2,0		sim
		6	500		1,0; 2,0; 2,5		não
		7	500		1,0; 2,0; 2,5		sim
		8	280			0,0025; 0,025; 0,05	não
		Total	3270				
II	adulto	1	563	150	0,5; 1,0		
		2	343	150	0,5; 2,0		
		Total	906				
III	ovo	1	500		0,2; 0,5; 1,0; 2,0		
		2	200		1,0		
		Total	700				
IV	adulto	1	80		3,0		
Total Geral			4956				

Experimento 1: Mortalidade de larvas de *A. aegypti* em suspensões de borra do café de diferentes idades e uma só concentração, sem adição de alimento – Experimento piloto.

Foram preparados nove copos contendo quatro colheres de sopa de borra do café (60 gr para 200 mL de água). Diariamente, colocavam-se sete a 10 larvas em um dos copos, até que todos recebessem larvas. A análise dos copos foi diária, aproximadamente no mesmo horário, observando-se o número de larvas vivas e mortas e se houve continuidade do desenvolvimento até as fases de pupas e adultos. As suspensões foram utilizadas até o nono dia de idade.

Experimento 2: Mortalidade de larvas de *A. aegypti* em suspensões de borra de café de diferentes idades e concentrações, sem adição de alimento.

Foram preparadas cinco réplicas de suspensões de borra de café de cada uma das seguintes concentrações:

- 75 mg/mL (15 gr para 200 mL de água), correspondendo, aproximadamente, a uma colher de sopa rasa;
- 150 mg/mL (30 gr para 200 mL de água), correspondendo, aproximadamente, a duas colheres de sopa rasas;
- 225 mg/mL (45 gr para 200 mL de água), correspondendo, aproximadamente, a três colheres de sopa rasas;
- 300 mg/mL (60 gr para 200 mL de água), correspondendo, aproximadamente, a quatro colheres de sopa rasas.

Como controle foi utilizada água de torneira.



Diariamente, foram introduzidas 10 larvas (estádios L₃ e L₄) em cada conjunto de copos, formado por um copo de cada concentração, até que todos os cinco copos de todas as concentrações tenham sido utilizados. Quando todas as larvas morriam, os copos eram reutilizados para colocação de novas larvas.

A observação de cada copo foi diária, aproximadamente no mesmo horário, anotando-se o número de larvas vivas e mortas e se houve o desenvolvimento para os estádios pupal e adulto. As análises envolveram suspensões com até 12 dias de idade.

Experimento 3: Mortalidade de larvas de *A. aegypti* em suspensões de borra do café de diferentes idades e nas mesmas concentrações do experimento anterior, com adição de alimento, e algumas mudanças no procedimento.

Foi repetido o experimento anterior, com a borra de café, utilizando pirex com capacidade de 500 mL no lugar dos copos, e peneirinhas finas contendo as larvas, imersas no meio, para facilitar sua visualização quando da análise. Neste caso, levantando-se a peneira a contagem tornava-se mais fácil. Em duas das cinco réplicas, por concentração, foi adicionado 0,01 gr de ração de peixe macerada. A análise foi feita da mesma forma utilizada nos experimentos anteriores, utilizando-se suspensões com até 15 dias de idade.

Experimento 4: Mortalidade de larvas de *A. aegypti* em soluções de cafeína de diferentes idades e concentrações, sem acréscimo de alimento.



Foram utilizadas soluções de cafeína nas concentrações 0,2, 0,5, 1,0 e 2,0 mg/mL e água para controle.

Foram preparados cinco copos contendo 150 mL de cada solução de cafeína e um contendo água.

Diariamente, foram introduzidas 10 larvas nos estádios L₃ e L₄ em um copo de cada concentração, até que todos os cinco copos de todas as concentrações tenham sido utilizados. À medida que todas as larvas morriam, os copos iam sendo reutilizados para colocação de novas larvas. A análise foi feita diariamente, aproximadamente no mesmo horário, observando-se o número de larvas vivas e mortas, e o desenvolvimento dos estádios pupal e adulto. Observou-se o efeito de soluções com até 25 dias de idade, nos criadouros experimentais.

Experimento 5: Mortalidade de larvas de *A. aegypti*, em soluções de cafeína de diferentes idades e concentrações, com acréscimo de alimento.

Neste teste, a cafeína foi utilizada nas seguintes concentrações: 0,5, 1,0 e 2,0 mg/mL. Também foi utilizada a água para controle.

Esse teste foi realizado da mesma maneira que o anterior, porém quando eram introduzidas as larvas nos copos, também era adicionado o alimento (0,01 gr de ração de peixe macerada, por copo). A análise dos copos foi diária e as soluções de cafeína foram utilizadas até 18 dias após o preparo.

Experimento 6: Mortalidade de larvas de *A. aegypti*, em soluções de cafeína de diferentes concentrações, mantidas à temperatura ambiente e na geladeira, analisadas em intervalos de 30 dias, sem adição de alimento.



Foram preparados dois litros de cada uma das seguintes concentrações de cafeína: 1,0, 2,0 e 2,5 mg/mL. Um litro de cada concentração foi deixado à temperatura ambiente e o outro, guardado em geladeira, em frascos fechados.

Essas soluções foram inicialmente testadas com 24 horas de preparo, e posteriormente, a cada mês, até o sétimo. Colocavam-se, em copos, 150 mL de cada concentração e introduziam-se 10 larvas por copo. A água também foi testada para efeito de controle. Os resultados foram anotados diariamente, observando-se o número de larvas vivas e mortas e o desenvolvimento de pupas e adultos.

Experimento 7: Mortalidade de larvas de *A. aegypti* em soluções de cafeína de diferentes concentrações, mantidas à temperatura ambiente e na geladeira, analisadas em intervalos de 30 dias, com adição de alimento.

Este experimento foi realizado da mesma maneira que o anterior, acrescentando-se aproximadamente 0,01 gr de ração de peixe macerada em cada copo, inclusive no controle. A análise dos copos foi feita diariamente.

Experimento 8: Mortalidade de larvas de *A. aegypti*, em soluções de temefós de diferentes concentrações, mantidas à temperatura ambiente e analisadas em intervalos de 15 dias, sem adição de alimento.

Para comparação, foi também analisado o efeito do inseticida temefós, larvicida utilizado pela SUCEN para combate ao *Aedes*. Foi preparado

um litro de solução de temefós para cada uma das seguintes concentrações: 0,0025, 0,025 e 0,05 $\mu\text{g/mL}$.

Essas soluções foram mantidas à temperatura ambiente, em frascos fechados, testadas 24 horas após o preparo e, posteriormente, a cada 15 dias, até três meses.

Colocavam-se 150 mL de cada concentração e 10 larvas por copo. O meio água também foi testado, para efeito de controle, como nos demais experimentos. Os resultados foram anotados diariamente, observando-se o número de larvas vivas e mortas e o desenvolvimento de pupas e adultos.

II – ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA CAFEÍNA E DA BORRA DE CAFÉ NA ESCOLHA DO LOCAL PARA OVIPOSIÇÃO DE *Aedes aegypti*.

Neste estudo, foram realizados dois experimentos.

Experimento 1: Preferência na oviposição, em relação aos meios cafeína, borra de café e água.

Foi utilizada uma gaiola com quatro copos preparados para oviposição de cada vez, contendo 200 mL de cada um dos meios: cafeína a 0,5 e a 1,0 mg/mL, borra do café a 150 mg/mL (equivalente a duas colheres de sopa) e água (controle). Nesta gaiola foram inicialmente colocados vinte casais de mosquitos adultos, acrescentando-se novos mosquitos diariamente. As fêmeas foram alimentadas com sangue de camundongo duas vezes por semana. Quando era colocado o camundongo, as soluções eram substituídas por novas, e realizava-se um rodízio na posição dos copos, no sentido horário.



Havendo ovos, o papel de filtro era retirado dos copos e posto para secar, computando-se, então, seu número. Um novo papel de filtro era colocado dentro de todos os copos.

Experimento 2: Preferência na oviposição em relação aos meios cafeína, borra de café e água, utilizando os mesmos meios, com variação na concentração de cafeína.

Esse experimento foi realizado da mesma maneira que o anterior, substituindo-se a cafeína a 1,0 mg/mL por cafeína a 2,0 mg/mL.

III – ESTUDO DO EFEITO DA CAFEÍNA NA ECLOSÃO DAS LARVAS DE *A. aegypti*.

Neste estudo, foram realizados dois experimentos.

Experimento 1: Taxa de eclosão das larvas em uma única concentração de cafeína.

Foram preparadas cinco placas de petri contendo 60 mL, de cada um dos meios: cafeína a 1,0 mg/mL e água de torneira (controle). Em cada placa foram colocados para eclodir 20 ovos.

Devido às temperaturas mais baixas na época do ano (temperaturas variando de 19,9° a 25,8°C), estas placas foram mantidas em estufa entre 30,5° e 33° C. Os ovos utilizados eram provenientes das gaiolas de criação do Laboratório de Vetores, e tinham idade inferior a 30 dias.

As placas foram analisadas diariamente, aproximadamente no mesmo horário, observando-se o número de larvas eclodidas.



Experimento 2: Taxa de eclosão das larvas em diferentes concentrações de cafeína.

Foram preparadas placas de petri, em cinco réplicas, contendo solução de cafeína, de cada uma das concentrações: 0,2, 0,5, 1,0 e 2,0 mg/mL e cinco placas contendo água. Cada uma delas continha 60 mL de solução e foram colocados 20 ovos por placa. Da mesma maneira que no experimento anterior, foram utilizados ovos com idade de até 30 dias e os resultados foram anotados diariamente, aproximadamente no mesmo horário.

IV – ESTUDO DO EFEITO DA CAFEÍNA NA VIABILIDADE DOS ADULTOS.

Neste estudo foi realizado um experimento.

Experimento: Mortalidade dos adultos de *A. aegypti* alimentados com solução de açúcar contendo cafeína.

Foram preparadas duas gaiolas contendo 40 mosquitos adultos. Em uma delas foi adicionada cafeína a 3,0 mg/mL na solução açucarada da qual os mosquitos se alimentam. Na outra, foi utilizada uma solução açucarada normal. O tempo de sobrevivência dos mosquitos foi observado.

4. ELETROFORESE

A análise do padrão de esterases para detectar alterações causadas pelos tratamentos em *A. aegypti*, foi realizada utilizando-se a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida. Para a realização desta técnica foi utilizada



uma fonte de energia (200 Volts) e uma cuba de eletroforese (Figura 6), na qual foi colocado o gel polimerizado e, neste, as amostras para corrida pela ação da corrente elétrica. As soluções e tampões utilizados nesta técnica estão descritos no item 4.5.

4.1. Preparo das amostras

Larvas de *A. aegypti* no estágio L4, congeladas a -20°C foram individualmente colocadas em *ependorfs* acrescentando-se 25 μL de tampão de amostra a 10%. A maceração foi feita com um bastão de vidro e foi utilizado um volume de 10 μL de cada amostra para aplicação no gel.

4.2. Preparo do gel

Para o preparo dos géis de corrida, montou-se, primeiramente, a cuba de eletroforese, na qual foram colocadas as duas placas de vidro, que comportavam o gel polimerizado. Na montagem, após as placas serem limpas com álcool, passou-se uma camada bem fina de vaselina nas duas bordas laterais e na borda inferior de uma das placas. A vaselina serve para vedar as placas e impedir que o gel escorra enquanto estiver no estado líquido.

Sobre estas camadas de vaselina, colocavam-se os espaçadores do gel. Em seguida, aplicava-se uma camada fina de vaselina sobre os espaçadores e colocava-se a outra placa sobre os mesmos, prendendo a seguir, as duas placas com o auxílio de seis garras, duas em cada lateral e duas na parte inferior das placas. Após montadas, as placas eram deixadas na posição vertical



Figura 6 - Cuba vertical e fonte de energia utilizados na técnica de eletroforese.

para que o gel pudesse ser colocado.

O gel utilizado foi o de poliacrilamida a 8%, preparado com os componentes relacionados a seguir, na ordem de sua utilização.

Acrilamida/Bis.....	7,5 mL
Tampão do gel pH 8,8.....	8,0 mL
Água Destilada.....	14,0 mL
Persulfato de Amônia.....	0,45 mL
Temed.....	25,0 µl

O persulfato de amônio e o temed atuam como catalisadores da reação de polimerização e devem ser colocados por último.

Estando o gel entre as placas, colocou-se o pente de acrílico com 20 dentes, na parte superior do gel, para que fossem formados os poços, nos quais foram aplicadas as amostras. Após a polimerização do gel, retirou-se o pente, assim como o espaçador inferior e as placas foram dispostas na posição vertical, em uma cuba de acrílico, com o auxílio de quatro garras.

As amostras, já preparadas foram, então, aplicadas no gel com o auxílio de uma micropipeta. Após a aplicação das amostras, o gel foi submetido à eletroforese por duas horas, a uma voltagem constante de 200V, à temperatura ambiente, utilizando-se para preenchimento dos compartimentos superior e inferior da cuba, o tampão de corrida TRIS 0,012 M pH 8,3 ajustado com glicina.

4.3. Coloração



Foram utilizados como substratos para identificação das esterases nos géis, o α e β -naftil acetatos. Terminado o tempo de corrida, o gel foi incubado em 50 mL de tampão fosfato 0,1M pH 6,2 durante 45 minutos. Em seguida, o tampão fosfato foi descartado e acrescentaram-se 50 mL da solução corante, recém preparada e filtrada, sendo que o gel permaneceu incubado por uma hora no escuro, para coloração das bandas esterásicas.

Após esse tempo, a solução corante foi descartada, o gel foi lavado em água corrente e banhado com 70 mL da solução descorante. O gel permaneceu nessa solução por 24 horas, no escuro.

4.4. Secagem do gel

A secagem do gel foi baseada no método de Ceron et al. (1992). O gel foi retirado da solução descorante e banhado em uma solução de gelatina incolor a 5%, prensado por um bastidor entre duas folhas de papel celofane e deixado à temperatura ambiente por três a quatro dias, para secagem.

Com este procedimento, o gel sofre desidratação transformando-se em uma fina película entre as folhas de celofane que então pode ser recortado e guardado.

4.5. Soluções

1. Tampão de amostra a 10%:

- tampão do gel..... 9,0 mL
- glicerol..... 1,0 mL



2. Tampão do gel

- TRIS (1,5M)..... 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 (0,2M)..... 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 1L, 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 ESTATÍSTICA

A análise estatística foi utilizada nas comparações dos tratamentos quanto à mortalidade de *A. aegypti* em soluções de cafeína mantidas à temperatura ambiente e em geladeira, testadas a cada 30 dias, e em soluções de temefós mantidas à temperatura ambiente, testadas a cada 15 dias. Também foi utilizada nas comparações quanto à taxa de eclosão, em tratamentos com cafeína.

Os dados foram analisados pelo teste t de Student para amostras independentes, utilizando o software estatístico Statdisk (Triola, 1998).

D. RESULTADOS



IV. RESULTADOS



I - ESTUDO DO EFEITO DA IDADE DAS SUSPENSÕES DE BORRA DE CAFÉ E DAS SOLUÇÕES DE CAFEÍNA NA MORTALIDADE DAS LARVAS DE *Aedes aegypti*.

Experimento 1 (Piloto): Mortalidade de larvas de *A. aegypti*, em suspensões de borra do café de diferentes idades e uma só concentração, sem adição de alimento.

A Tabela 2 refere-se a esse primeiro experimento, que na verdade constituiu um experimento piloto, onde foi testada uma única concentração de borra do café (4 colheres de sopa para um copo com 200 mL de água). Nos testes 1 a 7, em que foi analisado o efeito da idade da suspensão, distribuída nos copos, e com zero a sete dias pós-preparo (a suspensão não foi testada com um dia de idade por não haver disponibilidade de larvas no estágio necessário), seis dos sete testes mostraram 100% de mortalidade nas primeiras 24 horas. O teste 4 atingiu a mortalidade de 100% das larvas em 96h de tratamento.

Nos testes 8 e 9, em que a idade da suspensão era de nove dias, a porcentagem de mortalidade, nas 24 primeiras horas, decresceu. Das 15 larvas utilizadas nesses dois testes, oito (53%) morreram nas primeiras 24h.

Experimento 2: Mortalidade de larvas de *A. aegypti*, em suspensões de borra do café de diferentes idades e concentrações, sem adição de alimento.

Foram utilizadas suspensões de borra do café nas concentrações de 75, 150, 225 e 300 mg/mL (respectivamente 1, 2, 3 e 4 colheres de sopa rasas da borra úmida, para 200 mL de água de torneira). Os meios foram distribuídos em copos, preparando-se cinco réplicas de cada concentração, e utilizando-se uma réplica por dia, até o quinto dia, para tratamento de larvas L₃ e L₄.



Tabela 2 - Mortalidade (%) de *Aedes aegypti* em suspensões de borra do café com diferentes tempos pós-preparo, sem adição de alimento. Observações até 96 horas de tratamento. Concentração utilizada: 300 mg/mL. N = número de larvas L3 e L4 com que os testes foram iniciados.

Teste	N	Idade do meio (dias)	Tempo de tratamento (horas)			
			24	48	72	96
1	8	0	100			
2	10	2	100			
3	10	3	100			
4	10	4	60	20	10	10
5	10	5	100			
6	10	6	100			
7	8	7	100			
8	8	9	75	0	0	
9	7	9	30	15	30	

À proporção que todas as larvas morriam, os copos eram reutilizados para tratamento de novas larvas, de modo que as suspensões de borra puderam ser testadas até 12 dias após seu preparo. Os resultados obtidos são observados na Tabela 3.

Nos tratamentos a 75 mg/mL, a mortalidade foi de 80 a 100% nas primeiras 24h e de 100% nas 48 primeiras horas, para as suspensões de zero (uso logo após o preparo) a dois dias de idade. Entre três e 12 dias de idade do meio, a mortalidade decresceu para 50% a 0% nas primeiras 24h. Nesses testes, considerados juntos (testes 4 a 9), a partir do total de 60 larvas, foram produzidos 12 adultos (20%).

Nos tratamentos a 150 mg/mL, a mortalidade foi de 100% nas primeiras 24h, nas suspensões de zero a dois dias de idade. No teste número 4 (suspensão com três dias de idade), a mortalidade foi de 100% nas primeiras 48h. A partir de quatro até nove dias de idade da suspensão (testes 5 a 9), a mortalidade nas primeiras 24h sofreu uma redução para 50% a 20%, com produtividade de 13 adultos a partir das 50 larvas (26%).

Nos tratamentos a 225 mg/mL, a mortalidade foi de 100% nas primeiras 24h de exposição, nos seis testes que envolveram suspensões de zero a cinco dias de idade. A partir da idade de seis até 12 dias (testes 7 a 10), houve redução da mortalidade para 40% a 10% nas primeiras 24h de exposição, com produção de 10 adultos a partir do total de 40 larvas dos quatro testes (25%).

Na exposição das larvas a 300 mg/mL da suspensão de borra do café, a mortalidade foi de 100% nas primeiras 24h, até o quarto dia de idade.



Tabela 3 - Mortalidade (%) de *Aedes aegypti* em suspensões de borra do café com diferentes tempos pós-preparo, sem adição de alimento. Concentrações utilizadas: 75, 150, 225 e 300 mg/mL. TM = Tempo máximo (em dias) de sobrevivência dos mosquitos no meio; P = Pupas mortas. Em cada concentração, o primeiro teste e o controle referem-se a 50 larvas L3 e L4 e os demais, a 10 larvas.

Concen- tração (mg/mL)	Teste	Idade do meio (dias)	Tempo de tratamento (horas)										TM (dias)	Nº adul- tos
			24	48	72	96	120	144	168	192	216	240		
75	1	0	98	02										
	2	1	80	20										
	3	2	100											
	4	3	50	10	0	0	10	0	0	0	0	0	10	3
	5	4	50	0	0	10 (1P)	30							1
	6	5	20	0	0	0	30	10	0	0	10	10	13	2
	7	6	10	0	0	0	50	20	0	0	0	10	11	1
	8	7	0	0	0	0	0	0	0	50	30	0	11	2
	9	12	30	0	20	0	0	0	20	0				3
150	1	0	100											
	2	1	100											
	3	2	100											
	4	3	80	20										
	5	4	50	0	10	0	0	0	0	0	0	10	14	3
	6	5	20	10	10	0	0	10	0	0	10	10	13	2
	7	6	40	0	0	0	10	0	30	0	0	0	13	2
	8	7	20	10	40	10	0	0	0	0	0	0	10	2
	9	9	20	20	10	0	0	0	10	0	0			4
225	1	0	100											
	2	1	100											
	3	2	100											
	4	3	100											
	5	4	100											
	6	5	100											
	7	6	30	10	30	0	0	0	10	0	0	0	11	2
	8	7	10	10	30	30	0	0	0	10				1
	9	9	20	40	0	0	0	0	10	0	0			3
	10	12	40	0	10	0	0	10	0					4
300	1	0	100											
	2	1	100											
	3	2	100											
	4	3	100											
	5	4	100											
	6	5	90	0	10									
	7	6	60	10	0	10 (1P)	20							
	8	7	40	20	0	10	0	10 (1P)	10	0	10			
	9	9	80	0	0	0	0	10	10					
	10	12	20	0	0	0	0	10	20 (2P)	10 (1P)				4
Água	1	0	8	6	6	14	0	0	0	2	0	0	30	8

Nas suspensões com idades de cinco e seis dias, a mortalidade foi de 100%, respectivamente, até as primeiras 72h e as primeiras 120h. Nas idades de sete e nove dias, a mortalidade de 100% das larvas ocorreu até, respectivamente, 216h e 168h de exposição, ou seja, nove e sete dias. Apenas o teste 10, com 12 dias de idade da suspensão, produziu adultos. Cinco pupas foram produzidas nos tratamentos com suspensões e seis a 12 dias de idade, porém, todas morreram nos tempos de exposição correspondentes à colocação do símbolo P, na tabela.

O meio controle, constituído apenas por água de torneira, foi preparado apenas no início dos tratamentos. Houve baixa mortalidade das larvas distribuídas ao longo do experimento, com produção de oito adultos a partir de 50 larvas iniciais (16%).

Experimento 3: Mortalidade de larvas de *A. aegypti*, em suspensões de borra do café de diferentes idades e concentrações, com adição de alimento.

Foram utilizadas as mesmas concentrações de borra do café do experimento anterior (75, 150, 225 e 300 mg/mL), colocando-se alimento (0,01 gr de ração de peixe macerada) em alguns testes, para comparação. Como foi descrito em Material e Métodos, neste experimento, as larvas permaneceram dentro de uma pequena peneira mergulhada no recipiente contendo a suspensão, o que as impedia de entrar em contato com a borra depositada no fundo do mesmo. Isto foi feito para facilitar a contagem das larvas vivas e mortas. A Tabela 4 contém os resultados.

Na concentração de 75 mg/mL, nos testes 1 e 4 com, respectivamente, zero e três dias de idade da suspensão, sem adição de alimento,



Tabela 4 - Mortalidade (%) de *Aedes aegypti* em suspensões de borra do café com diferentes tempos pós-preparo, com adição de alimento nos testes marcados com asterisco. Concentrações utilizadas: 75, 150, 225 e 300 mg/mL. TM = Tempo máximo (em dias) de sobrevivência dos mosquitos no meio; P = Pupas mortas. Cada teste foi iniciado com 10 larvas L3 e L4. Na água foram utilizadas 30 e 20 larvas, respectivamente nos testes 1 e 2.

Concen- tração (mg/mL)	Teste	Idade do meio (dias)	Tempo de tratamento (horas)										TM (dias)	Nº adul- tos
			24	48	72	96	120	144	168	192	216	240		
75	1	0	40	30	10	10	0	10						
	*2	1	50	40	0	0	0	0	0	0	0	0	12	1
	3	2	0	60	20	0	0	0	0	0	0	0	14	2
	4	3	30	10	20	40								
	*5	4	20	0	30 (1P)	0	0	0	0	20 (1P)				3
	6	7	0	0	0	10	0	0	0	0	10	0	34	2
	7	9	0	10	0	0	0	0	10	0	0	0	20	3
	8	15	0	0	0	30	10	0	0	20	10	0	19	
150	1	0	40	60										
	*2	1	10	70 (1P)	0	20								
	3	2	10	70	10	0	0	0	0	0	0	0	13	1
	4	3	60	40										
	*5	4	0	40	10	0	0	0	10	0	30 (3P)			1
	6	6	10	10	0	10	60	0	0	0	0			1
	7	8	10	10	30	0	0	0	0	0	10 (1P)			4
	8	9	10	0	0	70	0	0	0	0	0	0	10	2
	9	15	10	0	10	0	10	20	10	0	10	0	14	
225	1	0	80	10	10									
	*2	1	70	0	0	10	0	0	10	0	0	10	10	
	3	2	80	0	0	0	0	10	0	0	10			
	4	3	60	0	0	0	0	0	40					
	*5	4	0	50	10	0	0	0	0	0	0	0	11	4
	6	6	10	70	0	20								
	7	11	90	10										
	8	12	20	0	0	60	10 (1P)	10 (1P)						
	9	13	20	0	10	10	0	0	0	0	0	0	16	2
	10	15	10	80	10									
300	1	0	70	30										
	*2	1	20	80 (1P)										
	3	2	100											
	4	3	90	0	10									
	*5	4	80	20										
	6	6	90	10										
	7	8	10	70	0	0	10	0	0	0	0	0	11	
	8	9	80	0	20									
	9	11	60	10	0	0	0	30						
	10	12	30	0	0	10	10	0	20 (2P)	10				2
	11	13	80	20										
	12	15	90	10										
Água	1	0	0	0	0	0	0	6	0	0	3	0	37	22
	*2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			20

houve mortalidade de 100% das larvas até 144 e 96 horas de tratamento (seis e quatro dias, respectivamente). Nos demais, algumas larvas chegaram a sobreviver 34 dias (teste 6). Houve produção de adultos tanto em testes com adição de alimento como em testes sem adição do mesmo: foram produzidos quatro adultos (20%), do total de 20 larvas utilizadas nos testes 2 e 5, com adição de alimento, e sete adultos (12%) a partir do total de 60 larvas colocadas nos testes sem acréscimo do mesmo. Portanto, nesta concentração, a eficiência da suspensão na mortalidade das larvas, restringiu-se ao dia do preparo.

Na concentração de 150 mg/mL, a mortalidade foi de 100% nas primeiras 48h de exposição, nos testes 1 e 4 (sem adição de alimento) com, respectivamente, zero e três dias de idade do meio. No teste 2, com adição de alimento, a mortalidade de 100% das larvas ocorreu com 96h de tratamento. Nesse teste, com um dia de idade da suspensão de borra, houve produção de uma pupa que não prosseguiu no seu desenvolvimento. Nos testes 5 a 9 (no 5, com alimento e nos demais sem), a partir de quatro até quinze dias de idade da suspensão, a mortalidade foi baixa nas primeiras 24h (0 a 10%), com produção de oito adultos a partir do total de 50 larvas (16%).

Na concentração de 225 mg/mL, nos testes 1, 7 e 10 (sem adição de alimento) com, respectivamente, zero, onze e 15 dias de idade da suspensão, a mortalidade de 100% das larvas se completou até as 72h nos testes 1 e 10 e até as 48h no teste 7. Entre os testes 2 e 5, com adição de alimento, houve produção de adultos apenas no teste 5, preparado com suspensão de quatro dias de idade.



Considerando-se os testes sem adição de alimento, apenas no de número 9 (suspensão com 13 dias de idade), foram produzidos dois adultos.

Nos tratamentos com 300 mg/mL da borra do café, nos testes com zero a seis dias de preparo da suspensão, a mortalidade foi de 100% nas primeiras 24h do teste 3, nas primeiras 48h, dos testes 1, 2, 5 e 6 e às 72h de exposição, no teste 4. Não houve produção de adultos nos testes com adição de alimento, e entre aqueles sem adição, houve produção de dois adultos e duas pupas cujo desenvolvimento não prosseguiu até a fase adulto, na suspensão com 12 dias de idade.

No meio controle, o teste sem adição de alimento mostrou baixa mortalidade, com produção de 22 adultos a partir das 30 larvas iniciais (73%). No teste com adição de alimento, houve produção de 100% de adultos a partir das 20 larvas com que foi iniciado o teste.

Experimento 4: Mortalidade de larvas de *A. aegypti*, em soluções de cafeína de diferentes idades e concentrações, sem acréscimo de alimento.

A Tabela 5 contém os resultados dos testes com quatro concentrações de cafeína (0,2, 0,5, 1,0 e 2,0 mg/mL) e água como controle.

Os meios foram preparados e distribuídos em copos (cinco réplicas), utilizados para colocação de larvas L₃ e L₄ em dias consecutivos, até o quinto dia de idade, e depois em idades variadas, quando reutilizados após a morte de todas as larvas.

Assim, o número de testes variou, nas diferentes concentrações, em função da possibilidade de reaproveitamento dos copos contendo as soluções,



Tabela 5 - Mortalidade (%) de *Aedes aegypti* em soluções de cafeína com diferentes tempos pós-preparo, sem acréscimo de alimento. Concentrações utilizadas: 0,2, 0,5, 1,0 e 2,0 mg/mL. TM = Tempo máximo (em dias) de sobrevivência dos mosquitos no meio; P = Pupa morta. Cada teste foi iniciado com 10 larvas L3 e L4. No meio controle (água) foram testadas 100 larvas.

Concen- tração (mg/mL)	Teste	Idade do meio (dias)	Tempo de tratamento (horas)										TM (dias)	Nº adul- tos
			24	48	72	96	120	144	168	192	216	240		
0,2	1	0	10	0	10	0	0	0	0	0	10	0	14	7
	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	30	2
	3	2	0	10	0	0	0	0	0	0	10	0	26	1
	4	3	0	0	0	20	0	0	0	0	0	0	18	2
	5	4	20	20	10	10	10	0	0	0	20		9	1
	6	14	0	30	0	10	10	20	0	0	0	0	14	
	7	22	0	0	0	20	0	40	20	10	0	0	15	
0,5	1	0	0	10	0	0	0	0	10	0	0	0	25	1
	2	1	10	10	0	0	0	30	0	0	0	10	30	
	3	2	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	21	
	4	3	80	20										
	5	4	50	40	0	10								
	6	8	50	40	0	10								
	7	9	0	0	0	10	20	40	0	10	0	0	17	
	8	13	30	40	10	0	10	10						
	9	22	100											
	10	25	90	10										
1,0	1	0	20	20	20	0	0	10	0	0	0	10	20	
	2	1	20	0	0	20	20	10	10	0	0	0	19	
	3	2	0	20	0	10	0	20	0	0	0	30	17	
	4	3	80	10	10									
	5	4	0	40	0	20	0	10	0	10	0	0	18	
	6	8	0	20	20	20	20	10	10					
	7	16	100											
	8	18	50	40	0	10								
	9	22	100											
	10	25	100											
2,0	1	0	0	80	20									
	2	1	10	50	20	10	10							
	3	2	0	70	0	0	30							
	4	3	70	30										
	5	4	40	40	10 (1P)	10								
	6	5	100											
	7	7	75	5	5	15								
	8	8	40	60										
	9	9	70	30										
	10	10	10	90										
	11	11	60	40										
	12	12	100											
	13	13	90	10										
	14	14	90	10										
	15	15	80	20										
	16	16	90	10										
	17	17	50	50										
	18	18	100											
	19	22	100											
	20	25	100											
Água	1	0	7	2	1	2	5	0	0	1	2	1	38	46



inicialmente colocadas. A concentração mais elevada (2,0 mg/mL) permitiu o maior reaproveitamento dos mesmos, dada a mortalidade precoce das larvas.

Entre os sete testes realizados com a cafeína na concentração de 0,2 mg/mL, apenas nos dois últimos, em que a idade da solução era de 14 e 22 dias, a mortalidade foi total, mas distribuída no tempo de exposição de até 14 e 15 dias, respectivamente, não havendo produção de adultos. Nas idades da solução entre zero e quatro dias, a mortalidade foi baixa ao longo de nove a 30 dias de exposição. Nesses testes, houve produção de um número variável entre um e sete adultos, sendo que o maior número foi produzido na solução testada no dia do seu preparo.

Entre os 10 testes com cafeína na concentração de 0,5 mg/mL, e soluções de zero a 25 dias de idade, apenas o primeiro teste (zero dias), produziu um adulto, provavelmente resultante de uma larva L₄ prestes a empupar utilizada no teste, sobre a qual a cafeína não teve tempo de agir, pois essa pupa foi produzida com 24h de tratamento e o adulto com 48h. Da mesma forma que nos testes com cafeína a 0,2 mg/mL de concentração, a porcentagem de mortalidade das larvas ocorreu com menor tempo de exposição ao meio, à medida que a idade deste aumentou. Nos testes 9 e 10, esta mortalidade foi de 100% nas primeiras 24h ou 48h de exposição às soluções de 22 e 25 dias de idade, respectivamente.

Resultados semelhantes foram obtidos com 1,0 e 2,0 mg/mL de cafeína. A 1,0 mg/mL, nos testes 7, 9 e 10 (soluções de 16, 22 e 25 dias de idade, respectivamente), a mortalidade das larvas foi de 100% nas primeiras 24h de tratamento. Nesta concentração não houve produção de adultos.



Na cafeína em concentração de 2,0 mg/mL, a mortalidade foi de 100% até as primeiras 48h de tratamento, a partir do teste número 8 até o número 20, com soluções de idade entre 8 e 25 dias. Em todos os demais testes desta concentração, a mortalidade de 100% completou-se, no máximo, até o quinto dia. Consequentemente, nesta concentração, também não houve produção de adultos.

Na água utilizada como controle, a partir do total de 100 larvas, foram produzidos 46 adultos (46%) até o 38º dia de exposição.

Experimento 5: Mortalidade de larvas de *A. aegypti*, em soluções de cafeína de diferentes idades e concentrações, com acréscimo de alimento.

Como mostra a Tabela 6, neste experimento foram testadas três concentrações de cafeína (0,5, 1,0 e 2,0 mg/mL), com adição de alimento (0,01 gr de ração de peixe macerada). A concentração 0,2 mg/mL foi excluída, devido ao fato de ter se mostrado ineficiente, no experimento anterior.

Na concentração de 0,5 mg/mL, os 10 testes realizados, com idades da solução de cafeína variando entre zero e 18 dias, produziram adultos com porcentagens que variaram de 30% a 80%. A mortalidade variou, mas igualmente foi baixa ao longo de nove a 15 dias, nos diferentes testes.

Nas concentrações de 1,0 e 2,0 mg/mL, não houve produção de adultos. A 1,0 mg/mL, porém, nos seis testes com idade da solução variando de zero a 11 dias, as observações prosseguiram até entre oito e 27 dias de exposição, quando todas as larvas morreram.



Tabela 6 - Mortalidade (%) de *Aedes aegypti* em soluções de cafeína com diferentes tempos pós-preparo, com acréscimo de alimento em todos os testes. Concentrações utilizadas: 0,5, 1,0 e 2,0 mg/mL. TM = Tempo máximo (em dias) de sobrevivência dos mosquitos no meio; P = Pupas mortas. Cada teste foi iniciado com 10 larvas L3 e L4. No controle foram testadas 50 larvas.

Concen- tração (mg/mL)	Teste	Idade do meio (dias)	Tempo de tratamento (horas)										TM (dias)	Nº adul- tos
			24	48	72	96	120	144	168	192	216	240		
0,5	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20 (1P)			8
	2	1	60	10	0	0	0	0	0	0	0			3
	3	2	20	0	10	10	0	10	0	0	0			5
	4	3	0	0	0	0	10	0	0	10	0	0	12	8
	5	4	0	0	10	0	0	20	10 (P)	10	0	10 (P)	10	4
	6	11	0	40	0	0	0	0	0	10	0	10	13	4
	7	14	20	0	0	0	10	0	20	0	0	0	15	5
	8	15	0	0	0	0	0	0	0	10	0	10	14	5
	9	17	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	12	8
	10	18	0	0	0	0	0	0	0	10	0	10	11	7
1,0	1	0	10	10	0	0	0	0	0	0	0	0	27	
	2	1	10	0	10	0	0	0	10	0	10	0	27	
	3	2	20	50	0	20	0	0	0	10				
	4	3	20	30	10	0	0	10	0	0	0	0	20	
	5	4	20	20	0	0	0	0	10	0	0	0	18	
	6	11	20	10	20	0	0	20	0	0	10	10	11	
2,0	1	0	20	70	10									
	2	1	60	30	10									
	3	2	50	40	10									
	4	3	50	40	10									
	5	4	60	40										
	6	6	60	40										
	7	7	90	10										
	8	8	90	10										
	9	9	100											
	10	11	90	10										
	11	14	100											
	12	15	80	20										
	13	17	100											
	14	18	100											
Água	1	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0			47

A 2,0 mg/mL, entre os 14 testes preparados com soluções de zero a 18 dias de idade, a mortalidade de 100% das larvas foi atingida nas primeiras 72h de exposição, nos testes de número 1 a 4, nas primeiras 48h nos de número 5 a 8, 10 e 12, e nas primeiras 24h para os testes 9, 11, 13 e 14.

Na água, houve produção de 94% de adultos (47 de 50), até o nono dia de exposição das larvas.

Experimento 6: Mortalidade de larvas de *A. aegypti*, em soluções de cafeína de diferentes concentrações, mantidas à temperatura ambiente e na geladeira, analisadas em intervalos de 30 dias, sem adição de alimento.

Neste experimento as soluções de cafeína nas concentrações de 1,0, 2,0 e 2,5 mg/mL, foram mantidas no ambiente do laboratório e em geladeira, em frascos fechados, e analisadas quanto ao efeito na mortalidade das larvas, em intervalos de um mês (dados na Tabela 7 e resumo dos mesmos, na Tabela 8).

Sem adição de alimento, em todas as idades testadas da solução, as concentrações que produziram mortalidade mais precoce das larvas foram as de 2,0 e 2,5 mg/mL. O tempo máximo de viabilidade das larvas tratadas, com essas soluções mantidas no ambiente, foi de 120h e 72h, respectivamente, e das mantidas na geladeira foi de 96h para ambas (Tabela 8). Predominou a porcentagem de mortalidade nas primeiras 48h de tratamento, nas duas concentrações da solução mantidas no ambiente e na solução a 2,5 mg/mL, mantida na geladeira. Na solução de 2,0 mg/mL mantida na geladeira, predominaram igualmente os tempos de 48h e 72h de tratamento para mortalidade de 100% das larvas.



Tabela 7 - Mortalidade (%) de *Aedes aegypti* em soluções de cafeína, mantidas à temperatura ambiente (ab) e em geladeira (ge), sem adição de alimento, testadas a cada 30 dias. Concentrações utilizadas: 1,0, 2,0 e 2,5 mg/mL. TM = Tempo máximo (em dias) de sobrevivência dos mosquitos no meio. Cada teste foi iniciado com 10 larvas L3 e L4. A água (controle) refere-se a 80 larvas.

Teste	Solução de Cafeína			Tempo de tratamento (horas)										TM (dias)	Nº adul- tos
	Idade do meio (dias)	Concen- tração (mg/mL)	Manu- te- ção	24	48	72	96	120	144	168	192	216	240		
1	1	1,0	ab	20	50	10	20								
		2,0	ab	50	50										
		2,5	ab	50	50										
		Água	ab	5	18	6	1	0	0	1	0	1	0	57	12
2	30	1,0	ab	0	30	50	0	10	10						
			ge	0	0	90	10								
		2,0	ab	10	50	30	0	10							
			ge	0	50	30	20								
		2,5	ab	40	50	10									
			ge	0	80	10	10								
3	60	1,0	ab	10	20	20	0	30	0	0	10	0	0	17	
			ge	10	30	20	10	10	0	0	0	0	0	17	
		2,0	ab	30	50	10	0	10							
			ge	20	50	30									
		2,5	ab	30	70										
			ge	40	40	20									
4	90	1,0	ab	20	40	20	10	10							
			ge	10	50	10	30								
		2,0	ab	50	50										
			ge	40	40	20									
		2,5	ab	60	40										
			ge	50	50										
5	120	1,0	ab	10	50	0	10	0	20	0	0	10			
			ge	10	50	10	0	0	0	10	0	0	0	16	
		2,0	ab	40	60										
			ge	30	70										
		2,5	ab	60	40										
			ge	70	30										
6	150	1,0	ab	0	10	30	40	0	0	0	0	0	10	20	
			ge	0	0	30	40	10	10	0	0	0	0	18	
		2,0	ab	20	70	10									
			ge	0	50	50									
		2,5	ab	40	50	10									
			ge	20	50	30									
7	180	1,0	ab	10	70	20									
			ge	20	60	10	0	10							
		2,0	ab	50	50										
			ge	50	50										
		2,5	ab	50	50										
			ge	60	40										
8	210	1,0	ge	0	30	60	0	0	0	0	0	0	0	15	
		2,0	ge	90	10										
		2,5	ge	70	30										

Tabela 8 - Tempo de tratamento (horas) em que ocorreu mortalidade do total de larvas de *Aedes aegypti* nos diferentes tratamentos (resumo a partir dos dados da Tabela 7). Em cada teste foram utilizadas 10 larvas L3 e L4. ab = solução mantida no ambiente; ge = solução mantida na geladeira.

Solução de Cafeína		Idade da solução (dias)							
Concentração (mg/mL)	Manutenção	1	30	60	90	120	150	180	210
1,0	ab	96	144	408	120	216	480	72	-
2,0	ab	48	120	120	48	48	72	48	-
2,5	ab	48	72	48	48	48	72	48	-
1,0	ge	-	96	408	96	384	432	120	360
2,0	ge	-	96	72	72	48	72	48	48
2,5	ge	-	96	72	48	48	72	48	48

A solução de cafeína a 1,0 mg/mL, também foi eficiente pela não produção de adultos. Quanto à mortalidade do total de larvas, os dados mostraram que na solução mantida no ambiente esta ocorreu no máximo em 480h (20 dias). Já na solução mantida em geladeira, o tempo máximo para o mesmo fim foi de 432h (18 dias).

Na água, foram produzidos 12 adultos a partir do total de 80 larvas (15%) (Tabela 7).

A comparação pelo teste t de Student, da mortalidade das larvas nas duas formas de manutenção da solução (ambiente e geladeira), mostrou que a diferença entre ambas não é significativa em todas as comparações, exceto na cafeína 2,0 mg/mL, testada com 150 dias pós-preparo da solução (Tabelas 9 e 10).

A análise estatística envolvendo a comparação dos testes realizados em diferentes idades da solução, teve a avaliação de sua significância nos níveis $p = 0,05$ e $p = 0,10$ (Tabela 11). No nível 0,05, entre as comparações com diferença significativa, destacamos as de 30 dias *versus* 90, 120, 180 e 210 dias, e também as de 150 dias *versus* 180 e 210 dias, que apresentaram número maior de comparações significantes. Considerando-se todas as diferenças significantes nesse nível de p , oito comparações envolviam a concentração 1,0 mg/mL, 17, a concentração 2,0 mg/mL e oito, a concentração 2,5 mg/mL. Pode-se observar que embora essas comparações sejam significantes, do ponto de vista da disseminação da doença, muitas delas não diferem, porque é indiferente, sob esse aspecto, por exemplo, se 100% das larvas morrem em 48h ou 72h.



Tabela 9 - Estatísticas descritivas referentes à mortalidade de *Aedes aegypti* em soluções de cafeína mantidas à temperatura ambiente e em geladeira, sem adição de alimento, testadas a cada 30 dias (referentes à Tabela 7). Número de larvas em cada tratamento igual a 10.

Teste	Solução de Cafeína			Tempo Médio de 100% de Mortalidade (horas)	Desvio-Padrão
	Idade do meio (dias)	Concentração (mg/mL)	Manutenção		
1	1	1,0	ab	43,2	24,12
		2,0	ab	24	12,00
		2,5	ab	24	12,00
2	30	1,0	ab	64,8	29,30
			ge	62,4	7,20
		2,0	ab	48	24,60
			ge	52,8	18,75
		2,5	ab	28,8	15,37
			ge	43,2	15,37
3	60	1,0	ab	70,8	52,15
			ge	43,2	33,60
		2,0	ab	38,4	27,26
			ge	38,4	16,80
		2,5	ab	28,8	11,00
			ge	31,12	17,96
4	90	1,0	ab	48	28,90
			ge	50,4	24,50
		2,0	ab	24	12,00
			ge	31,2	17,96
		2,5	ab	21,6	11,76
			ge	24	12,00
5	120	1,0	ab	74,4	58,99
			ge	40,8	42,32
		2,0	ab	26,4	11,75
			ge	28,8	11,00
		2,5	ab	21,6	11,76
			ge	19,2	11,00
6	150	1,0	ab	78	56,09
			ge	75,6	33,10
		2,0	ab	33,6	12,92
			ge	48	12,00
		2,5	ab	28,8	15,37
			ge	38,4	16,80
7	180	1,0	ab	38,4	12,92
			ge	40,8	25,85
		2,0	ab	24	12,00
			ge	24	12,00
		2,5	ab	24	12,00
			ge	21,6	11,76
8	210	1,0	ge	46,8	19,93
		2,0	ge	14,4	7,20
		2,5	ge	19,2	11,00

Tabela 10 - Valores calculados para estatística t de Student, valor P e significância (nível 0,05) para comparação da mortalidade nas soluções de cafeína (CAF), em três concentrações, mantidas no ambiente (ab) e na geladeira (ge), sem adição de alimento, ao longo da manutenção (dados das Tabelas 7 e 9). S = Significante; NS = Não-significante.

Comparações	Concentração de CAF (mg/mL)	t-Student calculado	Valor P	Significância
30 dias (ab x ge)	1,0	0,2515	0,8070	NS
	2,0	-0,4907	0,6295	NS
	2,5	-2,0949	0,0506	NS
60 dias (ab x ge)	1,0	0,0000	1,0000	NS
	2,0	0,0000	1,0000	NS
	2,5	-0,3483	0,7316	NS
90 dias (ab x ge)	1,0	-0,2003	0,8435	NS
	2,0	-1,0541	0,3058	NS
	2,5	-0,4517	0,6569	NS
120 dias (ab x ge)	1,0	-0,8241	0,4312	NS
	2,0	-0,4713	0,6431	NS
	2,5	0,4713	0,6431	NS
150 dias (ab x ge)	1,0	0,1407	0,8897	NS
	2,0	-2,5825	0,0188	S
	2,5	-1,3332	0,1991	NS
180 dias (ab x ge)	1,0	-0,2626	0,7958	NS
	2,0	0,0000	1,0000	NS
	2,5	0,4517	0,6569	NS

Tabela 11 - Valores calculados para estatística t de Student, valor P e significância para comparação da mortalidade nas soluções de cafeína (CAF), em três concentrações, ao longo do tempo de manutenção, sem adição de alimento (dados das Tabelas 7 e 9). S = Significante; NS = Não-significante.

(continua)

Comparações	Concentração de CAF (mg/mL)	Manutenção	t-Student calculado	Valor P	Significância	
					0,05	0,10
1 dia x 30 dias	1,0	ab	-1,7998	0,0887	NS	S
	2,0	ab	-2,7728	0,0217	S	S
	2,5	ab	-0,7784	0,4464	NS	NS
1 dia x 60 dias	1,0	ab	-1,5190	0,1631	NS	NS
	2,0	ab	-1,5289	0,1606	NS	NS
	2,5	ab	-0,9324	0,3635	NS	NS
1 dia x 90 dias	1,0	ab	-0,4032	0,6915	NS	NS
	2,0	ab	0,0000	1,0000	NS	NS
	2,5	ab	0,4517	0,6569	NS	NS
1 dia x 120 dias	1,0	ab	-1,5481	0,1560	NS	NS
	2,0	ab	-0,4517	0,6569	NS	NS
	2,5	ab	0,4517	0,6569	NS	NS
1 dia x 150 dias	1,0	ab	-1,8024	0,1050	NS	NS
	2,0	ab	-1,7216	0,1023	NS	NS
	2,5	ab	-0,7784	0,4464	NS	NS
1 dia x 180 dias	1,0	ab	0,5547	0,5859	NS	NS
	2,0	ab	0,0000	1,0000	NS	NS
	2,5	ab	0,0000	1,0000	NS	NS
30 dias x 60 dias	1,0	ab	-0,3172	0,7547	NS	NS
		ge	1,7669	0,1110	NS	NS
	2,0	ab	0,8268	0,4192	NS	NS
		ge	1,8088	0,0872	NS	S
	2,5	ab	0,0000	1,0000	NS	NS
		ge	1,6160	0,1235	NS	NS
30 dias x 90 dias	1,0	ab	1,2712	0,2198	NS	NS
		ge	1,4860	0,1714	NS	NS
	2,0	ab	2,7728	0,0217	S	S
		ge	2,6308	0,0170	S	S
	2,5	ab	1,1765	0,2547	NS	NS
		ge	3,1137	0,0060	S	S
30 dias x 120 dias	1,0	ab	-0,4609	0,6558	NS	NS
		ge	1,5912	0,1460	NS	NS
	2,0	ab	2,5051	0,0336	S	S
		ge	3,4913	0,0026	S	S
	2,5	ab	1,1765	0,2547	NS	NS
		ge	4,0154	0,0008	S	S
30 dias x 150 dias	1,0	ab	-0,6596	0,5178	NS	NS
		ge	-1,2323	0,2491	NS	NS
	2,0	ab	1,6388	0,1186	NS	NS
		ge	0,6819	0,5040	NS	NS
	2,5	ab	0,0000	1,0000	NS	NS
		ge	0,6666	0,5135	NS	NS



Tabela 11 - Valores calculados para estatística t de Student, valor P e significância para comparação da mortalidade nas soluções de cafeína (CAF), em três concentrações, ao longo do tempo de manutenção, sem adição de alimento (dados das tabelas 7 e 9). S = Significante; NS = Não Significante.

(continua)

Comparações	Concentração de CAF (mg/mL)	Manutenção	t-Student calculado	Valor P	Significância	
					0,05	0,10
30 dias x 180 dias	1,0	ab	2,6071	0,0284	S	S
		ge	2,5455	0,0314	S	S
	2,0	ab	2,7728	0,0217	S	S
		ge	4,0911	0,0007	S	S
	2,5	ab	0,7784	0,4464	NS	NS
		ge	3,5295	0,0024	S	S
30 dias x 210 dias	1,0	ge	2,3280	0,0449	S	S
	2,0	ge	6,0459	0,0002	S	S
	2,5	ge	4,0154	0,0008	S	S
60 dias x 90 dias	1,0	ab	1,2093	0,2422	NS	NS
		ge	-0,5475	0,5907	NS	NS
	2,0	ab	1,5289	0,1606	NS	NS
		ge	0,9258	0,3668	NS	NS
	2,5	ab	1,4139	0,1744	NS	NS
		ge	1,0424	0,3110	NS	NS
60 dias x 120 dias	1,0	ab	-0,1446	0,8866	NS	NS
		ge	0,1405	0,8899	NS	NS
	2,0	ab	1,2782	0,2332	NS	NS
		ge	1,5118	0,1479	NS	NS
	2,5	ab	1,4139	0,1744	NS	NS
		ge	1,7898	0,0903	NS	S
60 dias x 150 dias	1,0	ab	-0,2973	0,7697	NS	NS
		ge	-2,1723	0,0434	S	S
	2,0	ab	0,5032	0,6269	NS	NS
		ge	-1,4704	0,1587	NS	NS
	2,5	ab	0,0000	1,0000	NS	NS
		ge	-0,9361	0,3616	NS	NS
60 dias x 180 dias	1,0	ab	1,9070	0,0889	NS	S
		ge	0,1790	0,8599	NS	NS
	2,0	ab	1,5289	0,1606	NS	NS
		ge	2,2056	0,0406	S	S
	2,5	ab	0,9324	0,3635	NS	NS
		ge	1,4023	0,1778	NS	NS
60 dias x 210 dias	1,0	ge	2,6467	0,0266	S	S
	2,0	ge	4,1523	0,0025	S	S
	2,5	ge	1,7898	0,0903	NS	S
90 dias x 120 dias	1,0	ab	-1,2709	0,2356	NS	NS
		ge	0,6208	0,5425	NS	NS
	2,0	ab	-0,4517	0,6569	NS	NS
		ge	0,3604	0,7228	NS	NS
	2,5	ab	0,0000	1,0000	NS	NS
		ge	0,9324	0,3635	NS	NS

Tabela 11 - Valores calculados para estatística t de Student, valor P e significância para comparação da mortalidade nas soluções de cafeína (CAF), em três concentrações, ao longo do tempo de manutenção, sem adição de alimento (dados das Tabelas 7 e 9). S = Significante; NS = Não-significante.

(conclusão)						
Comparações	Concentração de CAF (mg/mL)	Manutenção	t-Student calculado	Valor P	Significância	
					0,05	0,10
90 dias x 150 dias	1,0	ab	-1,5035	0,1500	NS	NS
		ge	-1,9351	0,0688	NS	S
	2,0	ab	-1,7216	0,1023	NS	NS
		ge	-2,4592	0,0243	S	S
	2,5	ab	-1,1765	0,2547	NS	NS
		ge	-2,2056	0,0406	S	S
90 dias x 180 dias	1,0	ab	0,9590	0,3626	NS	NS
		ge	0,8524	0,4052	NS	NS
	2,0	ab	0,0000	1,0000	NS	NS
		ge	1,0541	0,3058	NS	NS
	2,5	ab	-0,4517	0,6569	NS	NS
		ge	0,4517	0,6569	NS	NS
90 dias x 210 dias	1,0	ge	4,4581	0,0016	S	S
	2,0	ge	2,7456	0,0226	S	S
	2,5	ge	0,9324	0,3635	NS	NS
120 dias x 150	1,0	ab	-0,1399	0,8903	NS	NS
		ge	-2,0483	0,0554	NS	S
	2,0	ab	-1,3032	0,2089	NS	NS
		ge	-3,7297	0,0015	S	S
	2,5	ab	-1,1765	0,2547	NS	NS
		ge	-3,0236	0,0073	S	S
120 dias x 180	1,0	ab	1,8852	0,0920	NS	S
		ge	0,0000	1,0000	NS	NS
	2,0	ab	0,4517	0,6569	NS	NS
		ge	0,9324	0,3635	NS	NS
	2,5	ab	-0,4517	0,6569	NS	NS
		ge	-0,4713	0,6431	NS	NS
120 dias x 210	1,0	ge	-0,4056	0,6945	NS	NS
	2,0	ge	3,4637	0,0028	S	S
	2,5	ge	0,0000	1,0000	NS	NS
150 dias x 180	1,0	ab	2,1756	0,0576	NS	S
		ge	2,6203	0,0173	S	S
	2,0	ab	1,7216	0,1023	NS	NS
		ge	4,4721	0,0003	S	S
	2,5	ab	0,7784	0,4464	NS	NS
		ge	2,5906	0,0185	S	S
150 dias x 210	1,0	ge	2,3572	0,0299	S	S
	2,0	ge	7,5926	0,0000	S	S
	2,5	ge	3,0236	0,0073	S	S
180 dias x 210	1,0	ge	-0,5813	0,5603	NS	NS
	2,0	ge	2,1693	0,0437	S	S
	2,5	ge	0,4713	0,6431	NS	NS

Considerando-se o nível 0,10, há um aumento no número de comparações significantes, de modo que 14 delas envolveram a concentração 1,0 mg/mL, 18, a concentração 2,0 mg/mL e 10, a concentração 2,5 mg/mL. Neste nível de significância, portanto, o maior número de diferenças significantes envolveu a concentração de 2,0 mg/mL, o que poderia indicar que essa concentração foi a mais sensível às variações de tempo pós-preparo. Contudo, da mesma forma que no nível 0,05, as comparações significantes não alteraram a eficiência das soluções no controle do *Aedes*, pois não houve produção de adultos.

Experimento 7: Mortalidade de larvas de *A. aegypti*, em soluções de cafeína de diferentes concentrações, mantidas à temperatura ambiente e na geladeira, analisadas em intervalos de 30 dias, com adição de alimento.

Foram testadas três concentrações de cafeína (1,0, 2,0 e 2,5 mg/mL), agora com adição de alimento. As soluções foram analisadas quanto ao efeito na mortalidade das larvas, em intervalos de um mês (dados na Tabela 12 e resumo dos mesmos, na Tabela 13).

As concentrações que produziram mortalidade mais precoce das larvas também foram as de 2,0 e 2,5 mg/mL, nas quais o tempo máximo de viabilidade das larvas tratadas, com as soluções mantidas no ambiente, foi de 120h e 72h, respectivamente, e na geladeira, de 96h e 72h (Tabela 13). Na solução a 2,5 mg/mL, a mortalidade do total de larvas ocorreu predominantemente nas primeiras 48h de tratamento, tanto com a solução mantida no ambiente, como na mantida na geladeira, nos sete testes mensais realizados. A 2,0 mg/mL, a



Tabela 12- Mortalidade (%) de *Aedes aegypti* em soluções de cafeína, mantidas à temperatura ambiente (ab) e em geladeira (ge), com adição de alimento, testadas a cada 30 dias. Concentrações utilizadas: 1,0, 2,0 e 2,5 mg/mL. TM = Tempo máximo (em dias) de sobrevivência dos mosquitos no meio. Cada teste foi iniciado com 10 larvas L3 e L4. O controle refere-se a 80 larvas. Asteriscos indicam testes em que as observações foram interrompidas no dia assinalado.

Teste	Solução de Cafeína			Tempo de tratamento (horas)										TM (dias)	Nº adultos
	Idade do meio (dias)	Concen- tração (mg/mL)	Manu- ten- ção	24	48	72	96	120	144	168	192	216	240		
1	1	1,0	ab	20	20	20	0	0	0	0	0	10	10	19	47
		2,0	ab	40	50	0	0	10							
		2,5	ab	70	30										
		Água	ab	9	20	1	0	1	1	1	0	0	0	53	
2	30	1,0	ab	0	50	10	0	0	0	0	0	10	0	19	
			ge	20	20	10	0	10	0	0	0	0	0	21*	
		2,0	ab	50	50										
			ge	30	70										
3	60	1,0	ab	10	0	0	0	0	10	0	0	10	10	22*	
			ge	10	0	10	0	0	10	10	0	0	10	22*	
		2,0	ab	40	50	10									
			ge	40	60										
4	90	1,0	ab	20	80										
			ge	10	90										
		2,0	ab	20	70	10									
			ge	40	40	20									
5	120	1,0	ab	0	0	60	10	0	10	0	10	10			
			ge	10	40	10	0	10	10	10	10				
		2,0	ab	30	30	30	0	10							
			ge	0	60	40									
6	150	1,0	ab	40	0	0	0	10	0	10	0	0	0	17	
			ge	30	10	10	0	0	10	10	0	0	0	16	
		2,0	ab	30	50	10	0	10							
			ge	10	80	10									
7	180	1,0	ab	10	30	30	30								
			ge	10	20	50	10	0	0	0	0	10			
		2,0	ab	60	30	10									
			ge	10	70	20									
8	210	1,0	ab	50	40	10									
			ge	40	50	10									
		2,0	ab	30	30	30	10								
			ge	0	90	10									

Tabela 13 - Tempo de tratamento (horas) em que ocorreu a mortalidade do total de larvas de *Aedes aegypti* nos diferentes tratamentos (resumo a partir dos dados da Tabela 12). Em cada teste foram utilizadas 10 larvas L3 e L4. ab = solução mantida no ambiente; ge = solução mantida na geladeira.

Solução de Cafeína		Idade da solução (dias)							
Concentração (mg/mL)	Manutenção	1	30	60	90	120	150	180	210
1,0	ab	456	456	528	48	216	408	96	-
2,0	ab	120	48	72	72	120	120	72	-
2,5	ab	48	48	48	48	72	48	72	-
1,0	ge	-	504	528	48	192	384	216	408
2,0	ge	-	48	48	72	72	72	72	96
2,5	ge	-	48	48	48	72	48	72	72

mortalidade do total, em 72h e 120h foi igualmente freqüente, na solução mantida no ambiente; na solução mantida na geladeira predominou a mortalidade do total das larvas em 72h.

Quanto à concentração de 1,0 mg/mL, os dados mostraram que a mortalidade do total de larvas ocorreu no máximo em 528h (22 dias), nas duas formas de manutenção das soluções. Neste experimento, também não houve produção de adultos.

No teste utilizando água, houve produção de 47 adultos a partir de 80 larvas iniciais (59%).

A comparação estatística da mortalidade das larvas, nas duas formas de manutenção da solução, mostrou que a diferença entre ambas não é significativa em todas as comparações, exceto na cafeína a 2,5 mg/mL, testada com 150 dias de preparo e na cafeína a 2,0 mg/mL, com 180 dias de preparo (Tabelas 14 e 15).

Experimento 8: Mortalidade de larvas de *A. aegypti*, em soluções de temefós de diferentes concentrações, mantidas à temperatura ambiente e analisadas em intervalos de 15 dias, sem adição de alimento.

Neste experimento as soluções de temefós nas concentrações 0,0025, 0,025 e 0,05 µg/mL, foram estocadas no ambiente do laboratório, em frascos fechados, e analisadas quanto ao efeito na mortalidade das larvas, em intervalos de 15 dias. Não foi adicionado alimento nos testes. Os resultados obtidos são observados na Tabela 16.



Tabela 14 - Estatísticas descritivas referentes à mortalidade de *Aedes aegypti* em soluções de cafeína mantidas à temperatura ambiente e em geladeira, com adição de alimento, testadas a cada 30 dias (referentes à Tabela 12). Número de larvas em cada tratamento igual a 10.

Teste	Solução de Cafeína			Tempo Médio de 100% de Mortalidade (horas)	Desvio-Padrão
	Idade do meio (dias)	Concentração (mg/mL)	Manutenção		
1	1	1,0	ab	64,8	78,54
		2,0	ab	33,6	27,26
		2,5	ab	19,2	11,00
2	30	1,0	ab	44,4	56,55
			ge	26,4	33,43
		2,0	ab	24	12,00
			ge	28,8	11,00
		2,5	ab	24	12,00
			ge	21,6	11,75
3	60	1,0	ab	57,6	88,31
			ge	58,8	79,32
		2,0	ab	28,8	15,37
			ge	26,4	11,75
		2,5	ab	16,8	9,60
			ge	16,8	9,60
4	90	1,0	ab	31,2	9,60
			ge	33,6	7,20
		2,0	ab	33,6	12,92
			ge	31,2	17,95
		2,5	ab	19,2	11,00
			ge	14,44	7,20
5	120	1,0	ab	96	52,85
			ge	79,2	56,60
		2,0	ab	43,2	28,50
			ge	45,6	11,75
		2,5	ab	48	16,10
			ge	33,6	19,94
6	150	1,0	ab	31,2	51,80
			ge	42	54,26
		2,0	ab	38,4	27,26
			ge	36	10,73
		2,5	ab	24	12,00
			ge	36	0,00
7	180	1,0	ab	55,2	23,51
			ge	67,2	49,24
		2,0	ab	24	16,10
			ge	38,4	12,92
		2,5	ab	26,4	15,92
			ge	28,8	15,37
8	210	1,0	ge	43,2	42,32
		2,0	ge	40,8	23,51
		2,5	ge	38,4	7,20

Tabela 15 - Valores calculados para estatística t de Student, valor P e significância (nível 0,05) para comparação da mortalidade nas soluções de cafeína (CAF), em três concentrações, mantidas no ambiente (ab) e na geladeira (ge), com adição de alimento, ao longo da manutenção (dados das Tabelas 12 e 14). S = Significante; NS = Não-Significante.

Comparações	Concentrações de CAF (mg/mL)	t-Student calculado	Valor P	Significância
30 dias (ab x ge)	1,0	0,8665	0,3976	NS
	2,0	-0,9324	0,3635	NS
	2,5	0,4519	0,6567	NS
60 dias (ab x ge)	1,0	-0,0320	0,9748	NS
	2,0	0,3923	0,6995	NS
	2,5	0,0000	1,0000	NS
90 dias (ab x ge)	1,0	-0,6325	0,5350	NS
	2,0	0,3432	0,7355	NS
	2,5	1,1449	0,2672	NS
120 dias (ab x ge)	1,0	0,6860	0,5014	NS
	2,0	-0,2462	0,8111	NS
	2,5	1,7768	0,0925	NS
150 dias (ab x ge)	1,0	-0,4553	0,6544	NS
	2,0	0,2591	0,8014	NS
	2,5	-3,1622	0,0115	S
180 dias (ab x ge)	1,0	-0,6955	0,5043	NS
	2,0	-2,2059	0,0406	S
	2,5	-0,3430	0,7356	NS

Tabela 16- Mortalidade (%) de *Aedes aegypti* em soluções de temefós, mantidas à temperatura ambiente, sem adição de alimento, testadas a cada 15 dias. Concentrações utilizadas: 0,0025, 0,025, 0,05 µg/mL. TM = Tempo máximo (em dias) de sobrevivência dos mosquitos no meio. Cada teste foi iniciado com 10 larvas L3 e L4. O controle refere-se a 70 larvas. Asteriscos indicam testes em que as observações foram interrompidas no dia assinalado. P = pupa morta.

Teste	Solução de Temefós		Tempo de tratamento (horas)										TM (dias)	Nº adul- tos
	Idade do meio (dias)	Concen- tração (µg/mL)	24	48	72	96	120	144	168	192	216	240		
1	1	0,0025	0	0	10	0	10	30	20	0	0	0	13*	(1P)
		0,025	100											
		0,05	100											
		Água	4	9	6	1	0	3	1	0	7	7	27*	4
2	15	0,0025	0	0	0	0	20	0	10	10	10	0	19*	
		0,025	70	30										
		0,05	100											
3	30	0,0025	10	0	10	10	10	10	0	0	10	30	20	1
		0,025	50	0	20	0	0	0	0	0	0	0	17	3
		0,05	100											
4	45	0,0025	0	0	0	0	10	10	10	0	20	20	13*	
		0,025	60	10	20	0	10							
		0,05	60	20	0	0	10	10						
5	60	0,0025	10	10	0	0	10	20	10	0	10	20	14*	1
		0,025	10	0	40	0	20	10	0	0	10	0	12	
		0,05	60	30	0	10								
6	75	0,0025	0	10	0	20	0	20	10	0	10	0	17*	1
		0,025	30	20	20	10	0	0	0	0	0	0	13	1
		0,05	60	30	0	10								
7	90	0,0025	0	10	10	10	0	0	20	0	0	0	27*	2
		0,025	10	20	20	10	0	0	0	0	0	0	16	3
		0,05	30	30	20	0	0	0	0	0	0	0	14	2

A concentração mais eficiente quanto à mortalidade das larvas foi a de 0,05 µg/mL, na qual nos primeiros três testes (com um, 15 e 30 dias de idade da solução), a mortalidade do total de larvas ocorreu nas primeiras 24h de tratamento. No teste realizado com 45 dias de idade da mesma solução, a mortalidade de 100% das larvas foi completada com 144h, e nos testes com 60 e 75 dias, nas 96 primeiras horas. Com 90 dias de idade da solução, a mortalidade do total de larvas prolongou-se até 336h (14 dias), com produção de adultos.

A concentração de 0,025 µg/mL foi eficiente nos dois primeiros testes, realizados com 1 e 15 dias de idade da solução, na qual a mortalidade de 100% das larvas ocorreu com 24h e 48h, respectivamente. A partir de 30 dias de idade da solução, a mortalidade completou-se entre 120h (cinco dias) e 408h (17 dias), variando nos diferentes testes.

A solução de temefós a 0,0025 µg/mL, a menos concentrada de todas as soluções testadas, não foi eficiente desde o início dos experimentos. Após um número de dias de tratamento, que variou de 13 a 27, as larvas desse tratamento foram congeladas para análise do padrão de esterases. As que foram deixadas desenvolver-se produziram adultos.

As soluções de temefós a 0,025 e 0,0025 µg/mL, produziram adultos a partir da idade de 30 dias.

No controle, as observações também foram interrompidas antes que as larvas completassem seu desenvolvimento. Assim, o número de adultos produzidos refere-se apenas às larvas deixadas para se desenvolver.



A análise estatística para comparação das soluções de temefós em diferentes idades (Tabelas 17 e 18), também analisada nos níveis $p=0,05$ e $p=0,10$, mostrou, para o primeiro nível, três comparações com diferença significativa para a menor concentração de temefós utilizada ($0,0025 \mu\text{g/mL}$), seis para a concentração de $0,025 \mu\text{g/mL}$ e nenhuma para a de $0,05 \mu\text{g/mL}$. No nível $0,10$, essas comparações sofreram modificação apenas com referência à concentração $0,025 \mu\text{g/mL}$ (9 comparações significantes) e à concentração $0,05 \mu\text{g/mL}$ (12 comparações). O segundo nível retrata melhor as variações observadas que são significantes e significativas quanto ao seu efeito na transmissão das doenças causadas pelo *A. aegypti*.

Uma comparação entre os tempos de mortalidade do total de larvas nos meios de cafeína a $2,5 \text{ mg/mL}$ (Tabela 7) e temefós a $0,05 \mu\text{g/mL}$ (Tabela 16) mantidas no ambiente, em testes realizados com um dia, 30, 60 e 90 dias, sem adição de alimento, consta da Figura 7. Observa-se que a mortalidade do total de larvas no primeiro teste, ocorreu no segundo dia para a cafeína e no primeiro dia para o temefós; no segundo teste esses tempos foram, respectivamente, terceiro e primeiro dias; no terceiro teste, segundo e quarto dias e, no último teste, realizado com 90 dias de preparo das soluções, segundo dia para a cafeína e 14º dia, com produção de adultos, para o temefós.

II – ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA CAFEÍNA E DA BORRA DO CAFÉ NA ESCOLHA DO LOCAL PARA OVIPOSIÇÃO DE *Aedes aegypti*.



Tabela 17 - Estatísticas descritivas referentes à mortalidade de *Aedes aegypti* em soluções de temefós mantidas à temperatura ambiente, sem adição de alimento, testadas a cada 15 dias (referentes à Tabela 16). Número de larvas em cada tratamento igual a 10.

Teste	Solução de Temefós		Tempo Médio de 100% de Mortalidade (horas)	Desvio-Padrão
	Idade do meio (dias)	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)		
1	1	0,0025	87,6	62,82
		0,025	12	0,00
		0,05	12	0,00
2	15	0,0025	75,6	80,33
		0,025	19,2	11,00
		0,05	12	0,00
3	30	0,0025	128,4	85,20
		0,025	18	21,63
		0,05	12	0,00
4	45	0,0025	126	90,48
		0,025	33,6	31,20
		0,05	38,4	42,19
5	60	0,0025	123,6	80,69
		0,025	80,4	56,80
		0,05	26,4	22,00
6	75	0,0025	82,8	69,03
		0,025	31,12	27,47
		0,05	26,4	22,00
7	90	0,0025	49,2	60,35
		0,025	28,8	29,49
		0,05	26,4	21,33

Tabela 18 - Valores calculados para estatística t de Student, valor P e significância para comparação da mortalidade nas soluções de temefós (TEM), em três concentrações, ao longo da manutenção (dados da Tabelas 16 e 17). S = Significante; NS = Não-significante.

(continua)

Comparações	Concentração de TEM ($\mu\text{g/mL}$)	t-Student calculado	Valor P	Significância	
				0,05	0,10
1 dia x 15 dias	0,0025	0,3721	0,7142	NS	NS
	0,025	-2,0698	0,0684	NS	S
	0,05	0,0000	1,0000	NS	NS
1 dia x 30 dias	0,0025	-1,2188	0,2386	NS	NS
	0,025	-0,8772	0,4032	NS	NS
	0,05	0,0000	1,0000	NS	NS
1 dia x 45 dias	0,0025	-1,1024	0,2848	NS	NS
	0,025	-2,1893	0,0563	NS	S
	0,05	-1,9788	0,0792	NS	S
1 dia x 60 dias	0,0025	-1,1133	0,2802	NS	NS
	0,025	-3,8081	0,0042	S	S
	0,05	-2,0698	0,0684	NS	S
1 dia x 75 dias	0,0025	0,1626	0,8726	NS	NS
	0,025	-2,2010	0,0552	NS	S
	0,05	-2,0698	0,0684	NS	S
1 dia x 90 dias	0,0025	1,3940	0,1803	NS	NS
	0,025	-1,8015	0,1051	NS	NS
	0,05	-2,1348	0,0615	NS	S
15 dias x 30 dias	0,0025	-1,4259	0,1710	NS	NS
	0,025	0,1564	0,8775	NS	NS
	0,05	0,0000	1,0000	NS	NS
15 dias x 45 dias	0,0025	-1,3172	0,2043	NS	NS
	0,025	-1,3765	0,2020	NS	NS
	0,05	-1,9788	0,0792	NS	S
15 dias x 60 dias	0,0025	-1,3331	0,1991	NS	NS
	0,025	-3,3582	0,0084	S	S
	0,05	-2,0698	0,0684	NS	S
15 dias x 75 dias	0,0025	-0,2150	0,8322	NS	NS
	0,025	-1,2739	0,2346	NS	NS
	0,05	-2,0698	0,0684	NS	S
15 dias x 90 dias	0,0025	0,8309	0,4169	NS	NS
	0,025	-0,9645	0,3600	NS	NS
	0,05	-2,1348	0,0615	NS	S

Tabela 18 - Valores calculados para estatística t de Student, valor P e significância para comparação da mortalidade nas soluções de temefós (TEM), em três concentrações, ao longo da manutenção (dados da Tabelas 16 e 17). S = Significante; NS = Não-significante.

(conclusão)

Comparações	Concentração de TEM ($\mu\text{g/mL}$)	t-Student calculado	Valor P	Significância	
				0,05	0,10
30 dias x 45 dias	0,0025	0,0611	0,9520	NS	NS
	0,025	-1,2994	0,2102	NS	NS
	0,05	-1,9788	0,0792	NS	S
30 dias x 60 dias	0,0025	0,1294	0,8985	NS	NS
	0,025	-3,2466	0,0101	S	S
	0,05	-2,0698	0,0684	NS	S
30 dias x 75 dias	0,0025	1,3150	0,2050	NS	NS
	0,025	-1,1866	0,2508	NS	NS
	0,05	-2,0698	0,0684	NS	S
30 dias x 90 dias	0,0025	2,3988	0,0275	S	S
	0,025	-0,9338	0,3627	NS	NS
	0,05	-2,1348	0,0615	NS	S
45 dias x 60 dias	0,0025	0,0626	0,9508	NS	NS
	0,025	-2,2837	0,0348	S	S
	0,05	0,7975	0,4355	NS	NS
45 dias x 75 dias	0,0025	1,2004	0,2456	NS	NS
	0,025	0,1887	0,8525	NS	NS
	0,05	0,7975	0,4355	NS	NS
45 dias x 90 dias	0,0025	2,2330	0,0385	S	S
	0,025	0,3536	0,7278	NS	NS
	0,05	0,8027	0,4326	NS	NS
60 dias x 75 dias	0,0025	1,2150	0,2401	NS	NS
	0,025	2,4699	0,0356	S	S
	0,05	0,0000	1,0000	NS	NS
60 dias x 90 dias	0,0025	2,3349	0,0313	S	S
	0,025	2,5496	0,0201	S	S
	0,05	0,0000	1,0000	NS	NS
75 dias x 90 dias	0,0025	1,1588	0,2617	NS	NS
	0,025	0,1820	0,8576	NS	NS
	0,05	0,0000	1,0000	NS	NS

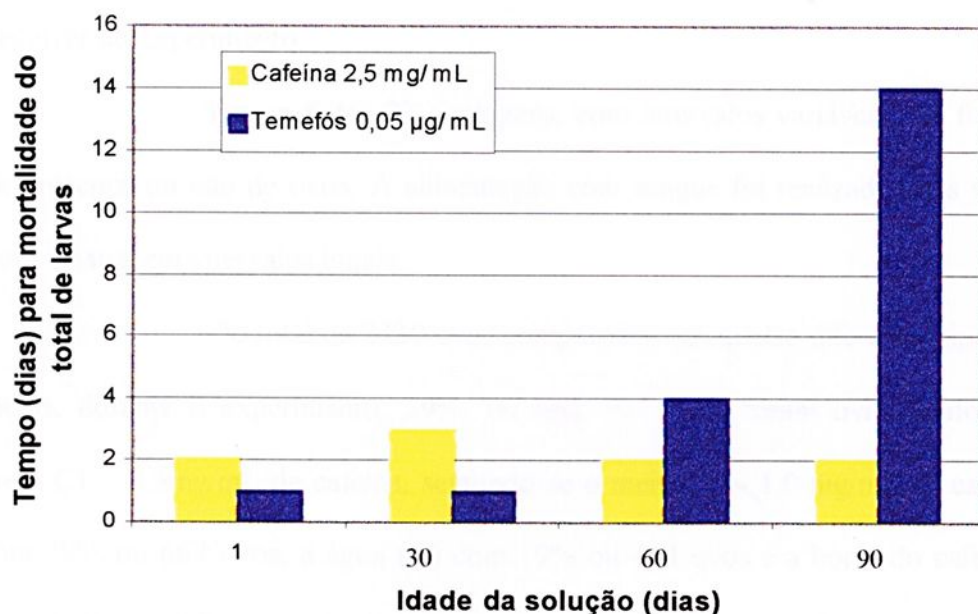


Figura 7 – Tempo em dias para a mortalidade do total de larvas, em soluções de cafeína a 2,5 mg/mL e temefós a 0,05 µg/mL, mantidas no ambiente, em testes realizados a cada 30 dias, ao longo de três meses, sem adição de alimento. Observar que no temefós com 90 dias pós-preparo, foram produzidos dois adultos.

Experimento 1: Preferência, na oviposição, em relação aos meios cafeína, borra de café e água.

A Tabela 19 contém os resultados de oviposição nos meios contendo cafeína, borra de café e água como controle. Foram utilizadas duas concentrações de cafeína (0,5 e 1,0 mg/mL) e uma de borra do café (150 mg/mL). Como foi mencionado em Material e Métodos, houve rodízio dos copos, no decorrer do experimento.

Foram feitas 22 contagens, com intervalos variáveis, em função da presença ou não de ovos. A alimentação com sangue foi realizada duas vezes por semana, em intervalos iguais.

Do total de 2330 ovos computados nos quatro diferentes tipos de meios, durante o experimento, 39%, ou seja, 911 ovos foram ovipositados no meio C1 – 0,5mg/mL de cafeína, seguindo-se o meio C2 – 1,0 mg/mL de cafeína com 29% ou 667 ovos, a água (A) com 19% ou 444 ovos e a borra do café (B) com 13% ou 308 ovos. Os dados mostraram que a diferença foi acentuada nas comparações entre o meio C1 e os demais, e na comparação entre C2 com B e A, mas não foi tão elevada entre B e A.

Considerando-se a predominância de oviposição em cada análise, o meio C1 foi o predileto (o que apresentou número maior de ovos) em 10 análises (45%), C2 em seis (27%), B em três (13%) e A em dois (9%). Em uma das contagens (a de número 20), houve empate no número de ovos ovipositados nos meios C1 e C2.



Tabela 19 - Número de ovos ovipositados nos meios contendo cafeína a 0,5 mg/mL (C1) e 1,0 mg/mL (C2), borra de café a 150 mg/mL (B) e água (A). Os círculos indicam o meio contendo maior número de ovos, em cada contagem.

Seqüência de Contagem	Posição	Meio			
		C1	C2	B	A
1	A (C2) B C1	62	89	5	1
2	A C2 B (C1)	11	3	0	0
3	A (C2) B C1	71	86	8	47
4	B A C1 (C2)	20	290	39	134
5	(C1) B C2 A	111	69	0	4
6	C2 (C1) A B	50	0	0	2
7	C2 C1 (A) B	16	4	45	90
8	C2 C1 A (B)	1	0	57	10
9	A C2 B (C1)	37	0	0	3
10	A (C2) B C1	0	4	0	3
11	A C2 B (C1)	17	7	6	4
12	C1 B (C2) A	0	37	0	0
13	C1 B C2 (A)	43	23	10	70
14	(C2) C1 A B	18	23	17	9
15	C2 C1 A (B)	0	5	34	0
16	A C2 B (C1)	222	3	4	58
17	B A (C1) C2	20	7	0	0
18	B A (C1) C2	51	3	10	3
19	B A (C1) C2	150	0	20	6
20	(C1) B (C2) A	2	2	1	0
21	(C1) B C2 A	9	0	3	0
22	C1 (B) C2 A	0	12	49	0
Total		911	667	308	444

No total de 22 análises, em quatro não ocorreu oviposição no meio C1, em cinco no meio C2, em sete nos meios B e A.

A localização dos copos na gaiola mostrou não ter relação com a preferência, pois o meio com predominância de ovos variou de posição entre as análises. Designando-se a posição dos quatro copos, na gaiola, como posterior esquerdo – PE, posterior direito – PD, anterior esquerdo – AE e anterior direito – AD, tem-se a seguinte distribuição de predominância para os quatro meios, nas 22 análises:

C1 – 3 PE; 1 PD; 3 AE e 4 AD;

C2 – 1 PE; 3 PD; 2 AE e 1 AD;

B – 1 PD; 2 AD;

A – 1 AE e 1 AD.

Experimento 2: Preferência, na oviposição, em relação aos meios cafeína, borra de café e água, utilizando os mesmos meios, com variação na concentração de cafeína.

Esse experimento foi realizado da mesma maneira que o anterior, porém diferenciou-se por ser utilizada cafeína a 2,0 mg/mL em substituição à cafeína a 1,0 mg/mL. Os demais meios mantiveram a mesma concentração: cafeína a 0,5 mg/mL, borra de café a 150 mg/mL e água (controle). A Tabela 20 contém os resultados.

Foram feitas 28 contagens, com intervalos variáveis em função da presença ou não de ovos, como no experimento anterior. A alimentação com sangue também foi realizada duas vezes por semana.



Tabela 20 - Número de ovos ovipositados nos meios contendo cafeína a 0,5 mg/mL (C1) e 2,0 mg/mL (C3), borra de café a 150 mg/mL (B) e água (A). Os círculos indicam o meio contendo maior número de ovos, em cada contagem.

(continua)

Seqüência de Contagem	Posição	Meio			
		C1	C3	B	A
1	$\begin{matrix} \textcircled{A} & \text{C3} \\ B & C1 \end{matrix}$	3	0	0	7
2	$\begin{matrix} B & \textcircled{A} \\ C1 & C3 \end{matrix}$	5	0	0	22
3	$\begin{matrix} \textcircled{C1} & B \\ C3 & A \end{matrix}$	32	0	0	1
4	$\begin{matrix} C3 & \textcircled{C1} \\ A & B \end{matrix}$	27	0	1	8
5	$\begin{matrix} A & \textcircled{C3} \\ B & C1 \end{matrix}$	0	73	0	18
6	$\begin{matrix} A & \textcircled{C3} \\ B & C1 \end{matrix}$	6	116	104	41
7	$\begin{matrix} B & A \\ C1 & \textcircled{C3} \end{matrix}$	69	82	20	60
8	$\begin{matrix} B & A \\ \textcircled{C1} & C3 \end{matrix}$	89	3	7	50
9	$\begin{matrix} B & A \\ C1 & \textcircled{C3} \end{matrix}$	0	9	0	0
10	$\begin{matrix} B & A \\ C1 & \textcircled{C3} \end{matrix}$	64	79	0	48
11	$\begin{matrix} C1 & B \\ C3 & \textcircled{A} \end{matrix}$	94	28	5	125
12	$\begin{matrix} C1 & B \\ \textcircled{C3} & A \end{matrix}$	1	74	0	65
13	$\begin{matrix} \textcircled{C1} & B \\ C3 & A \end{matrix}$	106	89	0	77
14	$\begin{matrix} C3 & C1 \\ \textcircled{A} & B \end{matrix}$	0	0	0	5

Tabela 20 - Número de ovos ovipositados nos meios contendo cafeína a 0,5 mg/mL (C1) e 2,0 mg/mL (C3), borra de café a 150 mg/mL (B) e água (A). Os círculos indicam o meio contendo maior número de ovos, em cada contagem.

(conclusão)

Seqüência de Contagem	Posição	Meio			
		C1	C3	B	A
15	$\begin{matrix} C3 & C1 \\ \textcircled{A} & B \end{matrix}$	21	0	3	63
16	$\begin{matrix} \textcircled{C3} & C1 \\ A & B \end{matrix}$	118	290	95	27
17	$\begin{matrix} C3 & C1 \\ \textcircled{A} & B \end{matrix}$	0	3	2	56
18	$\begin{matrix} \textcircled{A} & C3 \\ B & C1 \end{matrix}$	10	14	3	58
19	$\begin{matrix} A & C3 \\ B & \textcircled{C1} \end{matrix}$	15	7	0	0
20	$\begin{matrix} A & C3 \\ B & \textcircled{C1} \end{matrix}$	1	0	0	0
21	$\begin{matrix} B & A \\ C1 & \textcircled{C3} \end{matrix}$	0	4	0	0
22	$\begin{matrix} B & \textcircled{A} \\ C1 & C3 \end{matrix}$	0	0	0	37
23	$\begin{matrix} B & A \\ \textcircled{C1} & C3 \end{matrix}$	57	0	0	0
24	$\begin{matrix} B & A \\ \textcircled{C1} & C3 \end{matrix}$	24	0	0	11
25	$\begin{matrix} B & A \\ C1 & \textcircled{C3} \end{matrix}$	5	48	32	0
26	$\begin{matrix} C1 & B \\ \textcircled{C3} & A \end{matrix}$	0	1	0	0
27	$\begin{matrix} C1 & B \\ C3 & \textcircled{A} \end{matrix}$	0	8	0	20
28	$\begin{matrix} C1 & B \\ \textcircled{C3} & A \end{matrix}$	0	32	0	0
Total		747	960	272	799



Do total de 2778 ovos, 960 (35%), foram coletados no meio C3 – 2,0 mg/mL, seguindo-se 799 ovos (29%) no meio controle (A), 747 (27%) no meio C1 – 0,5 mg/mL e 272 ovos (10%) na borra de café (B). Os dados mostraram que não houve diferença proeminente entre os meios C1, C3 e A, mas todos diferiram acentuadamente de B, quanto a essa característica.

Considerando-se a preferência em cada análise, computada pela predominância de ovos, a oviposição prevaleceu no meio C3 em 11 análises (39%), em C1 em oito análises (29%), em A em nove análises (32%), e em nenhuma análise no meio B.

Do total de 28 análises, não ocorreu oviposição no meio C1 em nove análises, no meio C3, em 10, no meio B, em 18 e no controle, em oito análises.

Computando-se a posição dos copos no interior da gaiola, também verifica-se que não houve preferência relacionada com esse aspecto. Seguindo a mesma nomenclatura para as posições, utilizada no experimento anterior, temos:

C1 – 2 PE; 1 PD; 3 AE e 2 AD;

C3 – 1 PE; 2 PD; 3 AE e 5 AD;

A – 2 PE; 2 PD; 3 AE e 2 AD.

III – ESTUDO DO EFEITO DA CAFEÍNA NA ECLOSÃO DAS LARVAS DE *A. aegypti*.

Foram realizados três experimentos sem sucesso, em virtude do abaixamento da temperatura ambiente (julho e agosto). Dois outros experimentos



realizados posteriormente, utilizando estufa regulada a $32^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$, permitiram obter os resultados descritos a seguir.

Experimento 1: Taxa de eclosão das larvas em uma única concentração de cafeína.

A Tabela 21 mostra o resultado da eclosão de larvas na cafeína 1,0 mg/mL e na água, no decorrer de 96h. Em nenhum dos meios ocorreu eclosão nas 24 primeiras horas. Nas 48h, a eclosão na cafeína superou a da água, o inverso ocorrendo às 72h. Também às 96h, a eclosão na cafeína superou a da água. Considerando-se, porém, o total de eclosão nas 96h, não houve diferença acentuada entre os dois meios.

Experimento 2: Taxa de eclosão das larvas em diferentes concentrações de cafeína.

A Tabela 22 refere-se à análise da taxa de eclosão em quatro concentrações de cafeína (2,0, 1,0, 0,5 e 0,2 mg/mL) e na água. Considerando-se as primeiras 24h, houve predominância da taxa de eclosão na cafeína a 0,5 mg/mL e na água. Nas 48h, a predominância foi para a cafeína a 1,0 mg/mL; nas 72h, na cafeína a 0,2 e a 1,0 mg/mL, e nas 96h, na cafeína a 2,0 mg/mL.

Considerando-se a eclosão total, nas 96h, não houve diferença acentuada entre as cafeínas 1,0, 0,5, 0,2 mg/mL e água. Mas a taxa total de eclosão foi bem menor na cafeína a 2,0 mg/mL.

Os dados da análise estatística referentes às Tabelas 21 e 22 constam das Tabelas 23 e 24.



Tabela 21 - Número e porcentagem de larvas de *Aedes aegypti* eclodidas na cafeína a 1,0 mg/mL e na água (controle). NO = número de ovos colocados nos diferentes meios; NE = número de larvas eclodidas.

Horas	Cafeína 1,0 mg/mL			Água		
	NO	NE	(%)	NO	NE	(%)
24	100	0	(0)	100	0	(0)
48		41	(41)		9	(09)
72		33	(33)		67	(67)
96		11	(11)		3	(03)
Total		85	(85)		79	(79)

Tabela 22 - Número e porcentagem de larvas de *Aedes aegypti* eclodidas na cafeína (concentrações 2,0, 1,0, 0,5 e 0,2 mg/mL) e na água (controle). NO = número de ovos colocados nos diferentes meios; NE = número de larvas eclodidas.

Horas	Cafeína (mg/mL)												Água		
	2,0			1,0			0,5			0,2					
	NO	NE	(%)	NO	NE	(%)	NO	NE	(%)	NO	NE	(%)	NO	NE	(%)
24	100	18	(18)	100	31	(31)	100	50	(50)	100	39	(39)	100	46	(46)
48		11	(11)		29	(29)		5	(05)		7	(07)		19	(19)
72		10	(10)		14	(14)		6	(06)		17	(17)		5	(05)
96		7	(07)		2	(02)		2	(02)		4	(04)		0	(00)
Total		46	(46)		76	(76)		63	(63)		67	(67)		70	(70)

Tabela 23 - Estatísticas descritivas referentes ao número de larvas de *Aedes aegypti* eclodidas na cafeína (concentrações 2,0, 1,0, 0,5 e 0,2 mg/mL) e na água (referentes às Tabelas 21 e 22). Número de ovos em cada meio igual a 100.

Experimento	Meio	Tempo médio para eclosão das larvas (horas)	Desvio-Padrão
1	Cafeína 1,0 mg/mL	43,80	24,02
	Água	45,96	25,06
2	Cafeína 2,0 mg/mL	18	26,42
	Cafeína 1,0 mg/mL	24,24	21,86
	Cafeína 0,5 mg/mL	13,08	17,97
	Cafeína 0,2 mg/mL	20,76	24,70
	Água	15,36	16,02

Tabela 24 - Valores calculados para estatística t de Student, valor P e significância para comparação da taxa de eclosão, ao longo de 96h, em soluções de cafeína (CAF) com diferentes concentrações (mg/mL) e água (dados das Tabelas 21, 22 e 23). S = Significante; NS = Não-significante.

Experi- mento	Comparações	t-student calculado	Valor P	Significância	
				0,05	0,10
1	CAF 1,0 x Água	-0,6223	0,5338	NS	NS
2	Água x CAF 2,0	-0,8544	0,3929	NS	NS
	Água x CAF 1,0	-3,2766	0,0011	S	S
	Água x CAF 0,5	0,9471	0,3436	NS	NS
	Água x CAF 0,2	-1,8342	0,0666	NS	S
	CAF 2,0 x CAF 1,0	-1,8197	0,0688	NS	S
	CAF 2,0 x CAF 0,5	1,5398	0,1236	NS	NS
	CAF 2,0 x CAF 0,2	-0,7631	0,4454	NS	NS
	CAF 1,0 x CAF 0,5	3,9437	0,0001	S	S
	CAF 1,0 x CAF 0,2	1,0551	0,2914	NS	NS
	CAF 0,5 x CAF 0,2	-2,5143	0,0119	S	S

Com relação ao primeiro experimento (Tabela 21), a taxa de eclosão nos dois meios não diferiu significativamente, nos dois níveis de significância considerados.

Quanto ao segundo experimento (Tabela 22), a análise estatística para a eclosão ao longo das 96h (Tabela 24), mostrou que no nível de significância $p=0,05$ as comparações água *versus* cafeína 1,0; e cafeína 0,5 *versus* cafeína 1,0 e cafeína 0,2 diferiram significativamente. No nível $p=0,10$ foram significantes as comparações entre a água *versus* cafeína 1,0 e cafeína 0,2; cafeína 1,0 *versus* cafeína 2,0 e cafeína 0,5; e cafeína 0,5 *versus* cafeína 0,2.

IV – ESTUDO DO EFEITO DA CAFEÍNA NA VIABILIDADE DOS ADULTOS.

Experimento 1: Mortalidade dos adultos de *A. aegypti* alimentados com solução de açúcar contendo cafeína.

Neste experimento, foram preparadas duas gaiolas, sendo que em uma foi colocada solução de açúcar preparada com cafeína a 3,0 mg/mL e na outra, solução de açúcar em água (0,08 gr/mL). Os experimentos foram iniciados com 40 adultos. A Tabela 25 contém os resultados.

Em 10 dias, apareceram mortos, no piso da gaiola, 26 adultos (65%) alimentados com solução de açúcar contendo cafeína, e 16 adultos (40%) na gaiola controle. Os demais mosquitos alimentados com cafeína (14 adultos) morreram presos na solução açucarada que escorre normalmente do frasco de alimentação. Entre os alimentados com solução de açúcar normal, nove morreram



Tabela 25 - Número de mosquitos adultos de *Aedes aegypti* mortos na gaiola teste contendo solução açucarada de cafeína a 3,0 mg/ml e na gaiola controle. O experimento foi iniciado com 40 mosquitos em cada gaiola e os dados se referem a mosquitos mortos no piso das gaiolas e na solução açucarada.

Dias	Gaiola Teste				Gaiola Controle			
	Piso	Açúcar	Total	(%)	Piso	Açúcar	Total	(%)
1	1	0	1		1	0	1	
2	1	0	1		3	0	3	
3	4	5	9		0	4	4	
4	5	4	9		1	3	4	
5	6	2	8		4	1	5	
6	4	2	6		1	1	2	
7	1	1	2		2	0	2	
8	3	0	3		1	0	1	
9	1	0	1		3	0	3	
10	0	0	0		0	0	0	
Total	26	14	40	100	16	9	25	62,5

presos na solução escorrida. Até o 10º dia de experimento, permaneciam vivos na gaiola controle, 15 adultos ou 37,5%.

Uma observação adicional a respeito deste experimento, é que após dois dias de tratamento com cafeína, os mosquitos aparentavam uma dificuldade de movimentação, permanecendo pousados no piso da gaiola, debatendo-se e com dificuldade para voar. Isto provavelmente explica a mortalidade maior na solução açucarada escorrida do frasco de alimentação.

V – PADRÃO DE ESTERASES EM LARVAS TRATADAS COM CAFEÍNA E TEMEFÓS.

O padrão de esterases de larvas mantidas por tempos diferentes na cafeína 1,0 mg/mL, observado na Figura 8, mostra que no início dos tratamentos há uma redução ou bloqueio da expressão das esterases e que, à medida que o tempo de exposição na cafeína aumenta, algumas bandas esterásicas aumentam o seu grau de atividade ou expressão. Isto acontece especialmente com as bandas EST-20, EST-13 e EST-1. Com relação à EST-20, o aumento de frequência e expressão mostrou-se mais acentuado a partir de 15 dias de tratamento. A banda EST-13 aumentou sua expressão a partir dos 10 dias de exposição e a EST-1, a partir de 15 dias.

A Figura 9 mostra o padrão de esterases de larvas tratadas com temefós a 0,0025 µg/mL por tempos diferentes. Observa-se que, em todas as larvas tratadas, a banda EST-1 expressou-se acentuadamente, inclusive nas duas tratadas por apenas três dias (amostras 16 e 17). A banda EST-13, porém, nesses



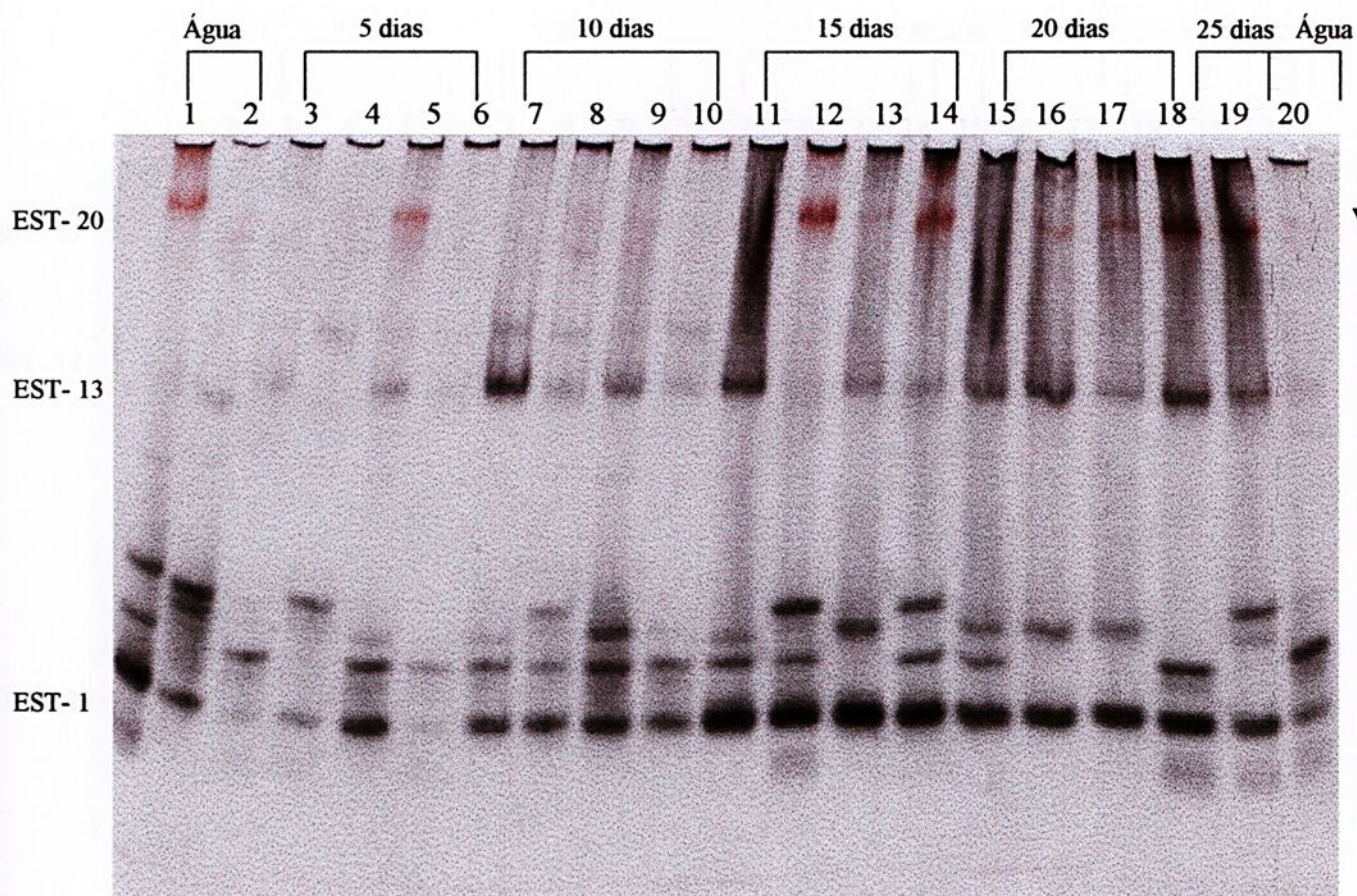


Figura 8 – Padrão de esterases de larvas mantidas, por tempos diferentes, em soluções de cafeína a 1,0 mg/mL.

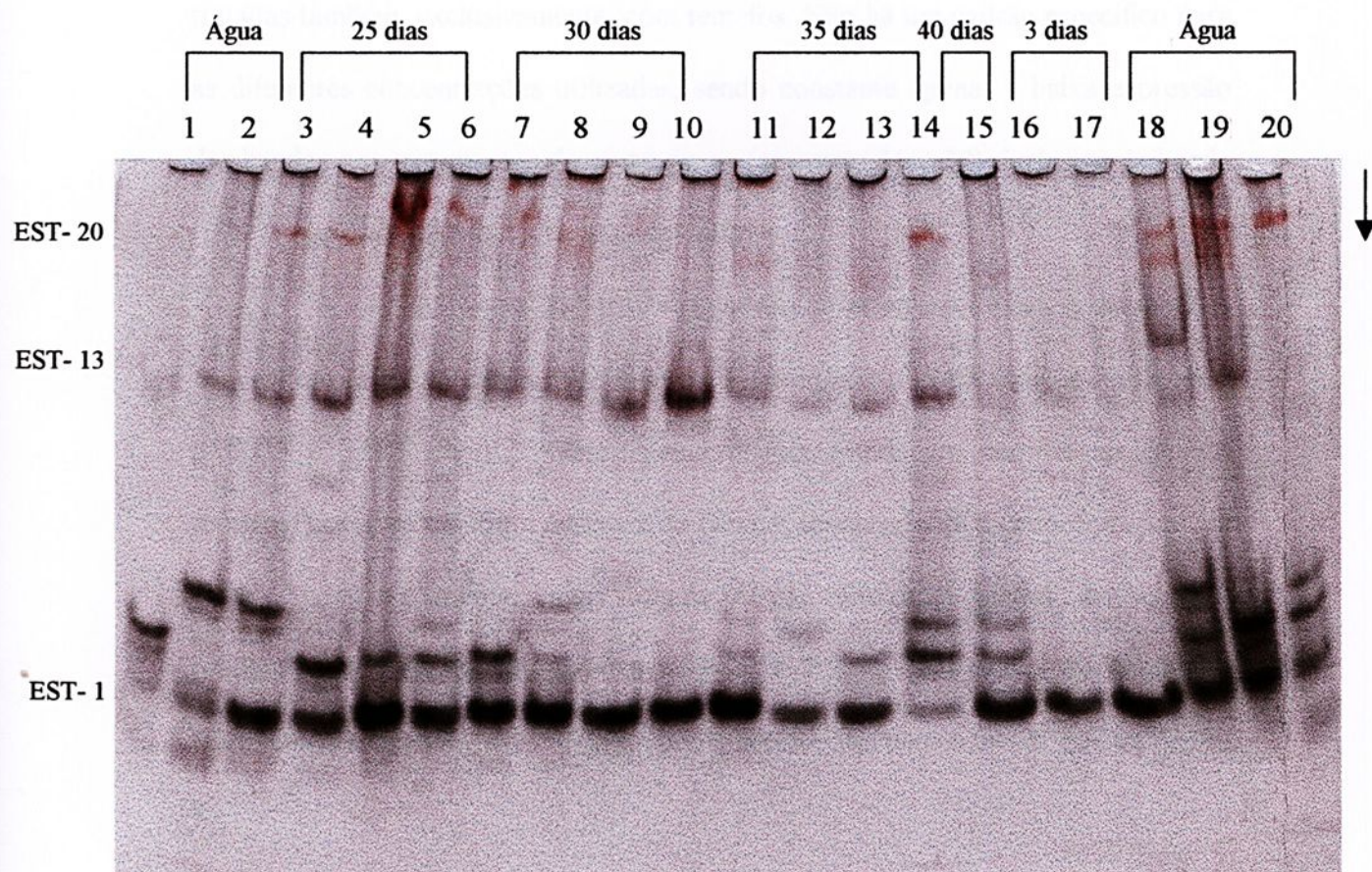


Figura 9 – Padrão de esterases de larvas mantidas, por tempos diferentes, em soluções de temefôs a 0,0025 $\mu\text{g/mL}$.

indivíduos tratados por pouco tempo, apresentou baixa expressão, e a EST-20 não se expressou, como as demais.

A Figura 10 refere-se ao padrão de esterases de larvas e pupas, tratadas também, exclusivamente, com temefós. Não há um padrão específico para as diferentes concentrações utilizadas, sendo constante apenas a baixa expressão das bandas nos tratamentos de curto prazo (amostras 16 a 20), inclusive da banda EST-1, que é normalmente de alta expressão.

A Figura 11 mostra o padrão de esterases de larvas submetidas aos meios água, cafeína a 1,0 mg/mL e temefós em concentrações diferentes (0,0025 e 0,005 µg/mL). Observa-se novamente que, em curta exposição ao temefós, as larvas mostram ausência de bandas, independente da concentração. Na cafeína com tratamentos mais longos e nas diferentes idades da solução, predomina a presença das bandas EST-20 e EST-13 com nível de expressão relativamente elevado, e da EST-1, com expressão um pouco menor que na Figura 8.



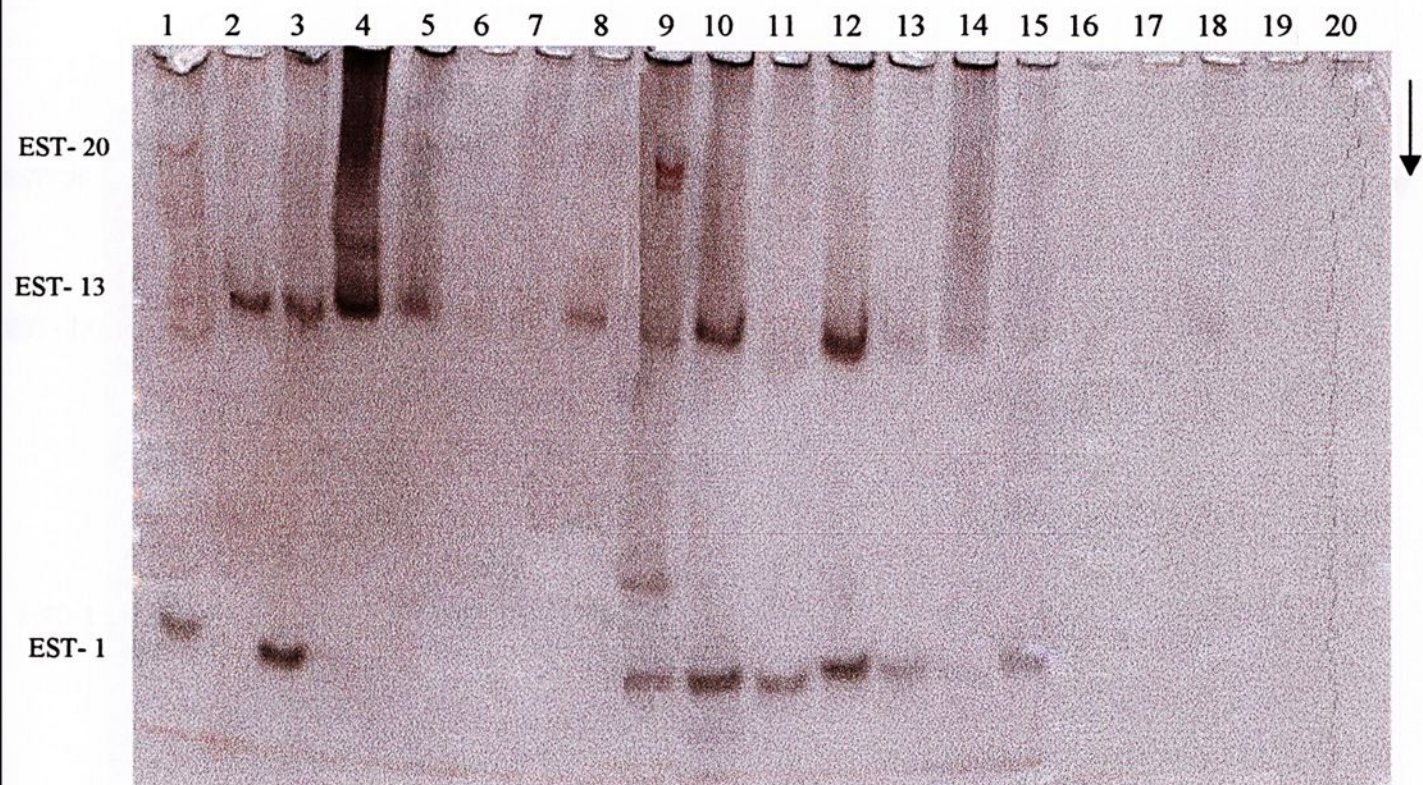


Figura 10 – Padrão de esterases de larvas e pupas mantidas, por tempos diferentes, em soluções de temefós com diferentes concentrações. Ver abaixo a descrição das amostras.

Amostra	Estádio	Concentração (µg/mL)	Idade da Solução (dias)	Nº de dias de tratamento
1	L	0,0025	1	14
2	L	0,0025	1	14
3	P	0,0025	1	14
4	L	0,0025	15	20
5	L	0,0025	45	14
6	L	0,0025	45	14
7	L	0,005	60	04
8	L	0,0025	60	15
9	L	0,0025	75	18
10	L	0,0025	75	18
11	L	0,025	1	08
12	P	0,005	1	16
13	P	0,005	1	16
14	L	0,0025	1	16
15	L	0,0025	1	16
16	L	0,025	1	02
17	L	0,005	1	02
18	L	0,005	1	02
19	L	0,005	1	02
20	L	0,005	1	02

L = larva; P = pupa

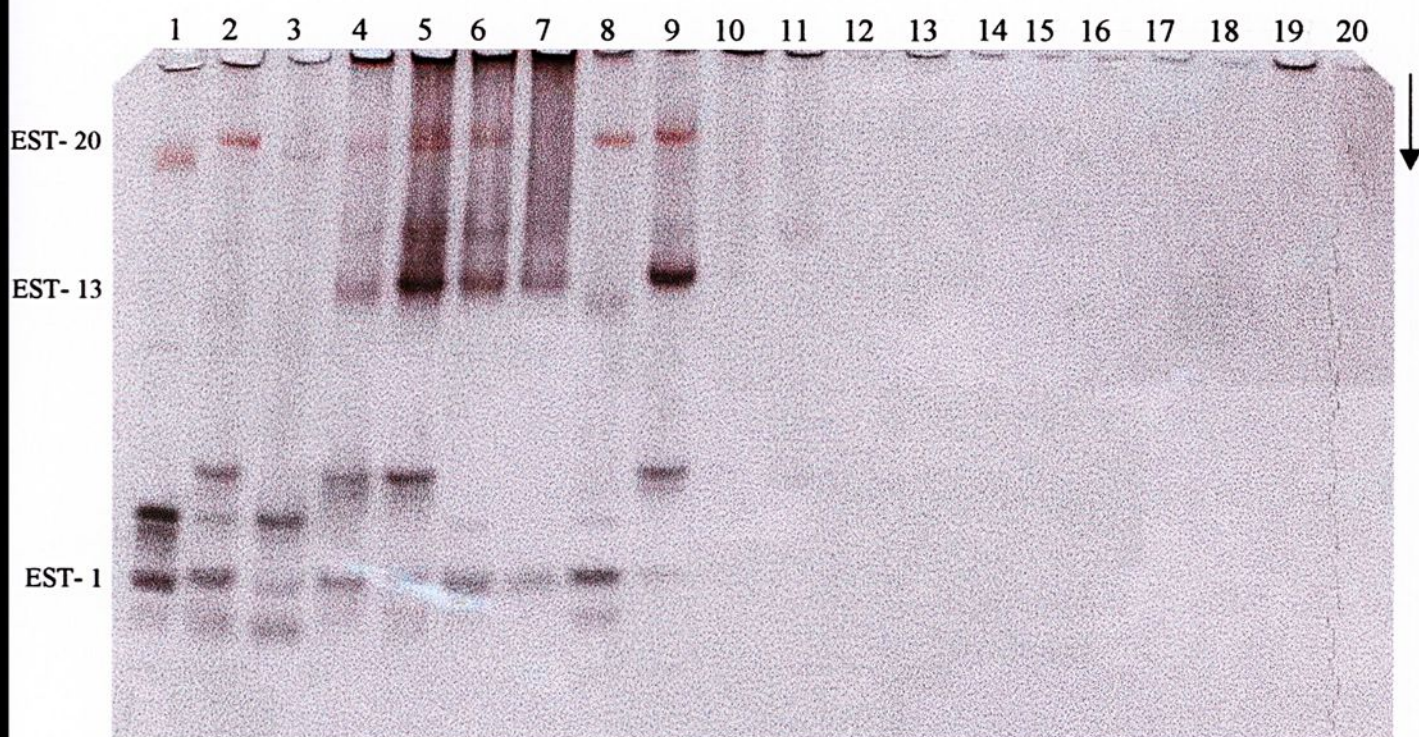


Figura 11 – Padrão de esterases de larvas, mantidas, por tempos diferentes, em soluções de temefós e cafeína com diferentes concentrações. Ver abaixo a descrição das amostras.

Amostra	Solução	Concentração	Idade da Solução (dias)	Nº de dias de tratamento
1	Água	-	-	20
2		-	-	20
3		-	-	20
4	Cafeína	1,0	30	22
5	(mg/mL)	1,0	60	23
6		1,0	60	23
7		1,0	60	23
8		1,0	150	18
9		1,0	150	18
10		1,0	60	18
11		1,0	60	18
12	Temefós	0,005	1	2
13	(µg/mL)	0,0025	1	5
14		0,005	1	2
15		0,0025	1	2
16		0,005	1	4
17		0,0025	1	4
18		0,005	1	5
19		0,005	1	6
20		0,005	1	6

The first step in the process of developing a curriculum is to identify the needs of the community. This involves a thorough analysis of the social, economic, and cultural context in which the curriculum will be implemented. Once the needs are identified, the next step is to select the content and methods that will best address these needs. This process is iterative and requires ongoing communication and collaboration with stakeholders. The final step is to implement the curriculum and evaluate its effectiveness. This involves collecting data on student learning and satisfaction, and using this information to make adjustments as needed.

V. DISCUSSÃO

The discussion in this section focuses on the challenges and opportunities associated with curriculum development. One of the main challenges is the need to balance the demands of the community with the requirements of the educational system. Another challenge is the need to ensure that the curriculum is culturally relevant and responsive to the needs of all students. Despite these challenges, there are many opportunities for innovation and improvement in curriculum development. By working together, educators and community members can create a curriculum that truly meets the needs of the community and prepares students for the future.

No Brasil, os programas de controle do *Aedes aegypti* têm apresentado dificuldade em alcançar os seus objetivos e, como consequência, a dengue e a dengue hemorrágica têm atingido níveis preocupantes, em muitas regiões. Hoje, o controle desse mosquito é basicamente realizado pelo uso de inseticidas, cuja toxicidade, para o homem e o meio ambiente, é conhecida. A situação torna-se mais grave pela ocorrência do desenvolvimento de resistência dos mosquitos aos inseticidas, levando à necessidade de aplicação de doses mais elevadas dessas substâncias, ao uso indevido de misturas e até mesmo à substituição de um inseticida por outro mais forte. Esses fatos têm tornado necessária a busca de formas alternativas de controle do *Aedes*.

No presente trabalho, objetivou-se obter informações adicionais que tornassem mais conhecidos os efeitos de duas substâncias que vêm sendo testadas quanto à mortalidade de insetos, no Departamento de Biologia, do IBILCE/UNESP, a cafeína e a borra do café. A cafeína mostrou afetar a reprodução e outros parâmetros biológicos de *Drosophila* (Itoyama & Bicudo, 1992; Itoyama et al., 1995; Itoyama et al. 1997; Itoyama et al, 1998; Itoyama et al, 2000) e ambas as substâncias mostraram-se eficientes na mortalidade de larvas de *A. aegypti* (Laranja et al., 2003).

Uma das informações adicionais relevantes a respeito da ação dessas substâncias na mortalidade de *A. aegypti*, visando à sua aplicação como auxiliar no controle desse vetor, é a durabilidade do seu efeito. Esse conhecimento é importante para nortear as ações no sentido de realizar trocas em intervalos seguros e estocagem adequada das soluções, no caso de utilização das mesmas



para controle alternativo. Esse aspecto foi analisado considerando diferentes concentrações da borra do café e da cafeína, mantidas no ambiente, nos criadouros experimentais e, para a cafeína, o tempo de manutenção da solução em frascos fechados, no ambiente e na geladeira. Finalmente, também foi feito um experimento com o temefós para obter um parâmetro de comparação, quanto à durabilidade do efeito na mortalidade larval, entre a cafeína e esse inseticida utilizado pela SUCEN no controle de *Aedes*. Alguns testes foram realizados com adição de alimento e outros sem, uma vez que no ambiente, os *Aedes* vivem em águas limpas ou sujas.

Suspensões de borra do café, sem adição de alimento, na concentração 300 mg/ml, mostraram-se eficientes nos sete testes realizados, no experimento piloto, até o sétimo dia de idade da suspensão, causando mortalidade de 100% das larvas. Em seis desses testes, essa mortalidade ocorreu nas primeiras 24h e em um teste, completou-se nas 96h (Tabela 2). Na comparação de várias concentrações da suspensão, a eficiência aumentou com o aumento das mesmas, mas a eficiência na porcentagem de mortalidade das larvas diminuiu com o aumento da idade da suspensão. Mais uma vez a concentração de 300 mg/ml mostrou-se eficiente, pois adultos foram produzidos apenas quando a suspensão atingiu 12 dias pós-preparo. As larvas que sobreviveram maior tempo, antes da suspensão atingir essa idade, não prosseguiram seu desenvolvimento até a fase adulta (Tabela 3).

A adição de alimento em algumas suspensões de borra do café não alterou substancialmente os resultados. Algum atraso na mortalidade ou o



desenvolvimento de pequeno número de adultos foi observado nas concentrações menores que 300 mg/ml (Tabela 4).

Na concentração de 300 mg/ml, a adição de alimento não alterou a eficiência da suspensão para o fim pretendido; apenas atrasou de um dia a mortalidade do total de larvas, comparando-se com dados das Tabela 3 e 4. Esse resultado pode ser devido a que as larvas já utilizavam a borra do café como alimento. Laranja et al. (2003) sugeriram que o pó de café, devido aos seus componentes de aminoácidos, óleos essenciais e outros, pode servir de alimento para o *Aedes*. É interessante observar que nos testes de 15 dias de idade da suspensão, para as três concentrações menores (75, 150 e 225 mg/ml) e na concentração de 300 mg/ml, a partir de 13 dias de idade, não houve produção de adultos, o que talvez possa ser atribuído à evaporação, nos criadouros experimentais, cobertos apenas com tecido de malha fina, aumentando a concentração das suspensões e reduzindo a quantidade de água necessária para a sobrevivência das larvas (Tabela 4).

Esses dados reforçam os obtidos por Laranja et al. (2003) que indicaram a borra do café como agente alternativo potencial de controle, quando utilizada na concentração adequada (300 mg/ml) e com adição de nova suspensão de borra em intervalos adequados (sete dias para maior segurança).

No que se refere à cafeína, um aspecto interessante é que a eficiência da solução aumenta com a sua idade, contrariamente ao que acontece com a borra do café.



Sem adição de alimento, as soluções mais eficientes foram as de 1,0 e 2,0 mg/ml (Tabela 5). Nestas concentrações nenhum adulto foi produzido. Embora na concentração de 1,0 mg/ml as larvas tenham sobrevivido longamente (até 20 dias), não ocorreu evolução no desenvolvimento para as fases seguintes. A ausência de adultos garante a não transmissão dos vírus causadores das doenças transmitidas pelo *A. aegypti*. Mesmo a concentração de 0,5 mg/ml produziu apenas um adulto, no teste utilizando a solução no dia do preparo, que atribuímos ao uso inicial, no teste, de uma larva L4 prestes a empupar. Laranja e colaboradores (2003) já haviam considerado a concentração igual ou superior a 0,5 mg/ml como sendo indicados para controle alternativo de *Aedes*.

A adição de alimento altera substancialmente o efeito da concentração 0,5 mg/ml, com produção de adultos do primeiro ao último teste, com 18 dias de idade da solução (Tabela 6), o que, portanto, reforça a indicação das concentrações de 1,0 e 2,0 mg/mL como mais adequadas ao referido controle, pois mesmo com alimento, elas mantiveram os efeitos observados no experimento sem alimento.

Na natureza, espera-se que ocorram as duas situações do meio de criação, com e sem alimento, dependendo do tipo de água em que os ovos se desenvolvem. Assim, é preciso que se escolha para controle alternativo, uma concentração que envolva menor risco.

O aumento da eficiência da cafeína, com a idade da solução, já mencionado, foi um comportamento geral para todas as concentrações utilizadas. A razão pela qual essa eficiência aumenta, pode ser atribuída à evaporação da



água, aumentando a concentração da solução no copo destampado e, conseqüentemente, sua eficiência.

Experimentos realizados com o objetivo de verificar qual a durabilidade do efeito de soluções de cafeína preparadas e estocadas em frascos fechados, e se manter na geladeira ou ambiente faz diferença, mostraram que as soluções testadas, de concentração 1,0, 2,0 e 2,5 mg/ml, mantiveram-se igualmente eficientes no decorrer das observações, que se realizaram até sete meses após o preparo da solução, com ou sem alimento (Tabelas 7 e 12).

Embora o teste estatístico tenha mostrado algumas diferenças significantes, na comparação entre diferentes idades da solução de cafeína sem alimento (Tabela 11), não houve uma coerência no significado das mesmas, e, além disso, em qualquer dos testes, nos experimentos com e sem alimento, não houve produção de adultos, nem mesmo de pupas, o que assegura o controle eficiente, nessas concentrações, pelo menos no tempo analisado. Sob o mesmo ponto de vista, também não importa se a mortalidade do total de larvas ocorre em 24h, 48h ou 72h, embora essas diferenças possam produzir resultados significantes estatisticamente, como foi observado.

Também a comparação entre as formas de manutenção, no ambiente e na geladeira, mostrou que não há diferença entre os dois procedimentos, nos experimentos sem (Tabela 10) e com alimento (Tabela 15). Mesmo as comparações que mostraram resultado significativo, não têm significado do ponto de vista biológico, pelas mesmas razões já referidas.



Foi realizado um experimento objetivando verificar também o comportamento das soluções de temefós em relação à mortalidade das larvas ao longo do envelhecimento das soluções, mantidas em frascos fechados no meio ambiente, até 90 dias pós-preparo (Tabela 16). Entre as três soluções de temefós utilizadas (0,0025, 0,025 e 0,05 $\mu\text{g/mL}$), a concentração mais eficiente foi a de 0,05 $\mu\text{g/mL}$, que nos testes realizados com a solução testada nas idades de um dia, 15 e 30 dias, causou a mortalidade de 100% das larvas nas primeiras 24h de tratamento. Nos testes realizados com 45, 60 e 75 dias de idade da solução, já não houve o mesmo desempenho: a porcentagem de mortalidade das larvas, nas primeiras 24h, reduziu-se para 60% sendo que o total de 100% de mortalidade ocorreu de 96h a 144h de tratamento. Porém não houve produção de adultos. O teste realizado com a solução aos 90 dias de preparo mostrou nova redução de mortalidade nas primeiras 24h, que passou a ser de 30%, prolongamento do tempo para a mortalidade do restante das larvas até o 14º dia tratamento e produção de adultos.

A análise estatística para comparação do efeito das soluções de temefós nos diferentes dias de preparo (Tabela 18), mostrou diferenças significantes, no nível de $p = 0,10$ para as comparações entre as soluções de um dia *versus* 45, 60 e 75 dias, para as concentrações 0,025 e 0,05 $\mu\text{g/mL}$. Mas a concentração que melhor mostrou estatisticamente o efeito do envelhecimento foi a de 0,05 $\mu\text{g/mL}$, com diferenças significantes também nas comparações de um dia *versus* 90 dias, 15 dias *versus* 45, 60, 75 e 90 dias e também, 30 dias *versus* 45, 60, 75 e 90 dias.



Portanto, diferentemente do observado com a cafeína, que manteve sua eficiência nos sete meses de análise, esses resultados mostram que aos três meses já há alteração da solução de temefós, na mortalidade, pelo menos na manutenção no ambiente, e nas concentrações utilizadas. Lembremos que o *Bacillus thuringiensis* tem a desvantagem de apresentar baixo efeito residual devido à inativação da toxina sob a radiação ultravioleta do sol (Polanczyk et al., 2003).

Outra abordagem realizada foi referente à possibilidade de influência da cafeína e da borra do café na escolha do local para oviposição. Se observássemos preferência de oviposição nesses meios tóxicos, significaria, também, um encaminhamento para a morte das larvas. Por outro lado, a rejeição desses meios para oviposição poderia representar uma desvantagem. No experimento em que os adultos foram colocados em gaiola contendo soluções de cafeína a 0,5 e a 1,0 mg/ml, borra do café a 150 mg/ml e água (Tabela 19), a oviposição ocorreu predominantemente na cafeína a 0,5 mg/ml. O número de ovos colocados nesse meio foi aproximadamente um terço maior do que os colocados na cafeína a 1,0 mg/ml, aproximadamente dois terços maior do que os colocados na borra do café e mais do que o dobro dos colocados na água. No total de contagens, esse meio foi o preferido em 11, enquanto que o meio de cafeína a 1,0 mg/ml foi preferido em sete, a borra do café em três e a água em duas. Esses resultados foram indicativos de preferência por ovipositar nos meios com cafeína, especialmente a 0,5 mg/ml.



Já no segundo experimento, utilizando a cafeína a 2,0 mg/ml em substituição à cafeína a 1,0 mg/ml, e mantendo as demais condições (Tabela 20), o maior número de ovos obtido, em 28 contagens, ocorreu na cafeína a 2,0 mg/ml, mas o número de ovos postos na cafeína a 0,5 mg/ml praticamente não diferiu do obtido na água. A borra do café manteve o baixo número de ovos que havia sido observado no primeiro experimento. Assim, com relação a esse aspecto, se não houve preferência, não houve também rejeição da cafeína para oviposição. Se somarmos, porém, os ovos colocados nos dois frascos com cafeína, o número de ovos supera em muito o dos outros meios, nos dois experimentos.

Procurou-se também verificar se a cafeína é estimulante da eclosão. Segundo Gadelha & Toda (1985), os fatores conhecidos que atuam assim são redução do teor de oxigênio, agitação da água, presença de microorganismos e de compostos químicos entre os quais se incluem o permanganato de potássio e o hipoclorito de sódio. Segundo os mesmos autores, não existe uma interpretação exata desses estudos, mas a eclosão deve ser tomada como envolvendo também fatores hereditários, sendo, portanto, sujeita a condições individuais dificilmente detectáveis. Ainda de acordo com os mesmos autores, o período crítico na fase de ovo é o das primeiras 48 horas. Se nesse período o teor de umidade e os limites de temperatura forem mantidos, eles podem ser muito resistentes à dessecação e conservarem-se viáveis por até 12 meses.

Os resultados obtidos no presente trabalho, também não são fáceis de interpretar. Contudo, as diferenças significantes ao nível de $p = 0,10$ envolvem predominantemente a cafeína a 1,0 mg/ml (Tabela 24). Esse foi o meio



em que ocorreu a maior taxa de eclosão em 96h de tratamento (Tabelas 21 e 22). Outras diferenças também envolveram a cafeína 0,5 mg/ml na qual ocorreu a maior taxa de eclosão nas primeiras 24h. Contudo, essa taxa não diferiu significativamente da eclosão na água (Tabela 22). Portanto, também permanece a dúvida quanto à influência da cafeína, na eclosão. Caso ocorresse uma ativação da eclosão na cafeína 1,0 mg/ml, essa ativação causaria uma alta mortalidade das larvas recém eclodidas, o que também favoreceria o uso da cafeína como controle alternativo. Consideramos necessário repetir esse experimento.

Após resultados reiterados, mostrando que a cafeína e a borra do café atuam como larvicida, procurou-se verificar também, se a ingestão de cafeína pode interferir na sobrevivência dos mosquitos adultos. A ingestão ocorreu juntamente com a solução açucarada, que normalmente é colocada na gaiola para alimentação dos adultos. A comparação entre os mosquitos tratados e o controle (água açucarada sem cafeína) mostrou que após 48h de tratamento, os mosquitos alimentados com cafeína a 3,0 mg/ml, apresentavam pouca movimentação, mantendo-se no piso da gaiola, debatendo-se e apresentando dificuldade para voar. Em nove dias de observação, 65% dos adultos (26) tratados morreram enquanto, no controle, a porcentagem foi de 40% (16) (Tabela 25). Os demais mosquitos (14) alimentados com cafeína, nesse mesmo período, morreram presos na solução açucarada que escorre normalmente do frasco de alimentação, enquanto que na gaiola controle esse número foi nove, o que pode confirmar a dificuldade de movimentação dos mosquitos que ingeriram a cafeína. Dez dias depois do início do experimento, 15 mosquitos ainda permaneciam vivos na

gaiola controle, enquanto que na gaiola em que os mosquitos ingeriram cafeína, 100% dos adultos estavam mortos.

Esses resultados mostram que a cafeína na concentração utilizada também interfere na viabilidade dos adultos. Provavelmente, outros parâmetros biológicos, não avaliados neste estudo, são também afetados, como por exemplo, a oviposição. Itoyama & Bicudo (1992) verificaram redução da oviposição de fêmeas de *Drosophila* tratadas com cafeína.

Como último experimento, foi analisado o padrão de esterases de larvas submetidas aos diferentes tratamentos com cafeína e temefós, visando a detectar alterações que pudessem ser comparadas a resultados anteriores obtidos no Laboratório de Vetores do IBILCE (Laranja et al., 2003; Lima-Catelani et al, *in press*; Sousa-Polezzi & Bicudo, *in press*).

O padrão de esterases de *A. aegypti* foi descrito por Lima-Catelani e colaboradores (*in press*), tendo sido detectadas no período larval, desta espécie, 23 bandas esterásicas, tentativamente distribuídas pelos autores em oito *loci* genéticos.

Laranja et al. (2003), utilizando baixas concentrações de cafeína (0,1 e 0,2 mg/ml) e borra do café (25 mg/ml), observaram em larvas L4 desenvolvidas desde ovo, nesses meios, que ocorreram principalmente modificações do padrão de expressão das bandas EST1 e EST-20. No presente trabalho, utilizando apenas cafeína em concentração maior (1,0 mg/ml) e variação nos tempos de tratamento, as mesmas bandas foram afetadas, incluindo-se uma terceira, a banda EST-13. Contudo, com relação às bandas EST-1 e EST-20, os



resultados agora obtidos foram diferentes. No trabalho de Laranja et al (2003), a expressão da banda EST-1 diminuiu na cafeína, e a da banda EST-20, aumentou. Os dados do presente trabalho, porém, mostraram redução ou bloqueio da expressão das bandas no início do tratamento e aumento de sua expressão, com o aumento do tempo de exposição. No temefós, que também foi analisado, os resultados foram semelhantes.

O trabalho de Lima-Catelani et al (*in press*) mostrou alta atividade de bandas esterásicas em larvas L3 e L4. Assim, aparentemente, ambas as substâncias utilizadas no presente trabalho (cafeína e temefós), bloqueiam a expressão das esterases, no início do tratamento, mas de alguma forma, ativam essa expressão com o passar do tempo. Como as larvas utilizadas em ambos os testes, foram as que permaneceram vivas por mais tempo, é possível que essa sobrevivência maior seja decorrente desse aumento de expressão. Entretanto, essa sugestão, depende de outros estudos para ser confirmada.

É difícil também verificar, nos presentes dados, detalhes das diferenças que possam ter ocorrido com o uso de diferentes idades das soluções de diferentes concentrações, porque a análise envolveu um número grande de variáveis. Para isto, os experimentos devem ser repetidos, focalizando diferentes idades para cada concentração.

Lima-Catelani e colaboradores (*in press*), classificaram, com base no uso de inibidores, as bandas esterásicas EST-1 e EST-20 como carboxilesterases, e a EST-13, como uma provável colinesterase. Ambas as categorias de esterases, estão envolvidas na resistência a inseticidas como mostra



a literatura (Pasteur *et al.*, 1981; Raymond *et al.*, 1989; Mouchès *et al.*, 1990; Poirié *et al.*, 1992; Vaughan & Hemingway, 1995; Vaughan *et al.*, 1997; Hemingway & Ranson, 2000). Assim, da mesma maneira que foi proposto por Laranja *et al.* (2003), os dados do presente trabalho sugerem que a cafeína e o temefós ativam a mesma via de resposta no *Aedes aegypti*. O mesmo pode ser verdadeiro para a banda EST-13, cuja ativação foi também demonstrada, no tratamento com fenobarbital, juntamente com a banda EST-14 (também uma colinesterase, talvez incluída no mesmo loco de EST-13) e a banda EST-1, por Sousa-Polezzi & Bicudo (*in press*).

Pode-se supor, portanto, que, de modo geral, a resposta a xenobióticos em *A. aegypti* utiliza basicamente as mesmas enzimas.

No seu conjunto, os resultados do presente trabalho reforçam os obtidos anteriormente quanto à eficiência da borra do café e da cafeína, como bioinseticidas, aplicáveis ao *A. aegypti*, como forma auxiliar, no controle alternativo, acrescentando informações que podem ser importantes na sua aplicação, e também para o conhecimento dos mecanismos subjacentes ao seu efeito sobre esses organismos.

VLQCNCLNGLS

VI. CONCLUSÕES

Os resultados do presente trabalho permitiram chegar as seguintes conclusões:

1 - Nos experimentos de envelhecimento no criadouro experimental, a suspensão de borra do café na concentração de 300 mg/mL mostrou melhor desempenho, com e sem alimento, até o 9º dia de idade, não permitindo a produção de adultos a partir das larvas utilizadas nos testes. Em relação à cafeína, as concentrações de 1,0 e 2,0 mg/mL, com e sem alimento, foram as mais eficientes, não permitindo a produção de adultos, nas idades testadas da solução, até 25 dias.

2 - Deve-se destacar o fato de que, no criadouro experimental, com o passar do tempo, a suspensão de borra do café perde a eficiência enquanto a cafeína ganha eficiência. Com relação à cafeína possível que a evaporação e o acúmulo de detritos sejam responsáveis por esse resultado.

3 - Soluções de cafeína mantidas em frascos fechados, no ambiente e na geladeira, mantiveram a sua eficiência na mortalidade larval no período analisado de sete meses. As três concentrações testadas (2,5, 2,0 e 1,0 mg/mL) não produziram adultos nos experimentos com e sem adição de alimento, embora a solução a 1,0 mg/mL, tenha aumentado consideravelmente o tempo para mortalidade de 100% das larvas.



4 - Soluções de temefós, analisadas quanto ao envelhecimento, mostraram uma perda da eficiência na mortalidade das larvas com o passar do tempo, sendo que a maior concentração testada de 0,05 ug/mL, com três meses de idade permitiu a produção de adultos.

5 - Nos experimentos de preferência de oviposição, os dados sugeriram que existe uma atração maior pelo meio com cafeína, o que pode ser uma característica importante para fins de controle.

6 - No que se refere ao efeito da cafeína na eclosão, os resultados não foram conclusivos.

7 - Quanto ao efeito da cafeína sobre os adultos, sua ingestão causou redução da viabilidade e alterações no comportamento.

8 - A cafeína e o temefós afetaram o padrão de três bandas esterásicas (EST-1, EST-13 e EST-20) de larvas L4, as quais apresentaram redução da expressão no início do tratamento e aumento da expressão com o passar do tempo de exposição, sugerindo que as duas substâncias podem estar utilizando as mesmas vias de resposta, em *Aedes aegypti*.

9 - Portanto, as informações do presente trabalho reforçam os dados obtidos anteriormente quanto à possibilidade de uso da cafeína e da borra



do café como auxiliares no controle de *Aedes aegypti*, ampliando a confiabilidade em seu efeito.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARAL, D. B., DAS, P. B. Efeito da ingestão de proteínas no metabolismo da glicose e da lipídios. *Rev. Bras. Med. Trop. Parasitol.* v. 29, n. 1, p. 17-21, 1995.

AMARAL, D. B., DAS, P. B. Efeito da ingestão de proteínas no metabolismo da glicose e da lipídios. *Rev. Bras. Med. Trop. Parasitol.* v. 29, n. 1, p. 17-21, 1995.

AMARAL, D. B., DAS, P. B. Efeito da ingestão de proteínas no metabolismo da glicose e da lipídios. *Rev. Bras. Med. Trop. Parasitol.* v. 29, n. 1, p. 17-21, 1995.

AMARAL, D. B., DAS, P. B. Efeito da ingestão de proteínas no metabolismo da glicose e da lipídios. *Rev. Bras. Med. Trop. Parasitol.* v. 29, n. 1, p. 17-21, 1995.

AMARAL, D. B., DAS, P. B. Efeito da ingestão de proteínas no metabolismo da glicose e da lipídios. *Rev. Bras. Med. Trop. Parasitol.* v. 29, n. 1, p. 17-21, 1995.

AMARAL, D. B., DAS, P. B. Efeito da ingestão de proteínas no metabolismo da glicose e da lipídios. *Rev. Bras. Med. Trop. Parasitol.* v. 29, n. 1, p. 17-21, 1995.

AMARAL, D. B., DAS, P. B. Efeito da ingestão de proteínas no metabolismo da glicose e da lipídios. *Rev. Bras. Med. Trop. Parasitol.* v. 29, n. 1, p. 17-21, 1995.

AMARAL, D. B., DAS, P. B. Efeito da ingestão de proteínas no metabolismo da glicose e da lipídios. *Rev. Bras. Med. Trop. Parasitol.* v. 29, n. 1, p. 17-21, 1995.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARAL, D. B., DAS, P. B. Efeito da ingestão de proteínas no metabolismo da glicose e da lipídios. *Rev. Bras. Med. Trop. Parasitol.* v. 29, n. 1, p. 17-21, 1995.

AMARAL, D. B., DAS, P. B. Efeito da ingestão de proteínas no metabolismo da glicose e da lipídios. *Rev. Bras. Med. Trop. Parasitol.* v. 29, n. 1, p. 17-21, 1995.

AMALRAJ D. D.; DAS P. K. Estimation of predation by the larvae of *Toxorhynchites splendens* on the aquatic stages of *Aedes aegypti*. **J. Trop. Med. Public Health**, v. 29, n. 1, p. 177-183, 1998.

AMALRAJ, D. D.; DAS, P. K. Frequency-dependent prey selection by larvae of *Toxorhynchites splendens* (Diptera: Culicidae). **J. Insect Physiol.**, v. 49, n. 3, p. 249-260, 1996.

BARBOSA, M. L. Dengue: Revisão. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 56, n. 1, p. 27-45, 1996.

BERRY, W. J.; NOVAK, M. G.; KHOUNLO, S.; ROWLEY, W. A.; MELCHIOR, G. L. Efficacy of *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* var. israelensis for control of *Culex pipiens* and floodwater *Aedes* larvae in Iowa. **J. Am. Mosq. Control. Assoc.**, v. 3, n. 4, p. 579-582, 1987.

BESANSKY, N. J.; COLLINS, F. H. The mosquito genome: organization, evolution and manipulation. **Parasitol. Today**, v. 8, n. 6, 1992.

CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA "Porf. Dr. Alexandre Vranjac" (São Paulo). Divisão de Zoonoses. **Informe Técnico sobre Dengue**. Disponível em: <http://www.cve.saude.sp.gov.br/html/dengue_inf2103.htm>. Acesso em: 29 set. 2003a.

CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA "Porf. Dr. Alexandre Vranjac" (São Paulo). Divisão de Zoonoses. **Propostas de Vigilância Epidemiológica do Dengue**. Disponível em: <ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/zoo/dengue_proj0203.pdf>. Acesso em: 29 set. 2003b.

CERON, C. R.; SANTOS, J. R.; BICUDO, C. R. The use of gelatin to dry cellophane wound slab gels in an embroidering hoop. **Braz. J. Genet.**, v. 15, n. 1, p. 201-203, 1992.

CHIARAVALLOTI 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. 270 - 285, 1997.

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

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

DIREÇÃO REGIONAL DE SAÚDE (DIR-XXII). **Distribuição de casos de dengue por município de residência.** Disponível em:

<http://www.sucen.sp.gov.br/base_dados/tab_dengue_Sr8.htm>

Acesso em: 15 jan. 2004.

ITOYAMA, M. M.; BICUDO, H. E. M. C.; CORDEIRO, J. A. Effects of caffeine on mitotic index in *Drosophila prosaltans* (Diptera). **Rev. Brás. Genet.**, v. 20, p. 655-658, 1997.

ITOYAMA, M. M.; BICUDO, H. E. M. C. Effects of caffeine on fecundity, egg laying capacity, development time and longevity in *Drosophila prosaltans*. **Rev. Brás. 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. Effect of the stannous chloride combined with caffeine on productivity of *Drosophila prosaltans*. **Genet. and Mol. Biol.**, Ribeirão Preto, v. 23, p. 105-107, 2000.

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.

FERREIRA, P. P. **O vetor da dengue.** Disponível em:

<http://www.fiocruz.br/ccs/glossario/dengue_vetor.htm>. Acesso em: 11 set. 2003.

FORATINI, O.P. Gêneros *Aedes* e *Psorophora*. In: _____. **Entomologia médica:** Culiini: *Culex*, *Aedes* e *Psorophora*. São Paulo: EDUSP, 1965. p. 230-496, v. 2.



FUNDAÇÃO NACIONAL DA SAÚDE (Brasil). Ministério da Saúde. **Dengue instruções para pessoal de combate ao vetor: manual de normas técnicas.** Brasília, 2001. 84 p.

FUNDAÇÃO NACIONAL DA SAÚDE (Brasil). Ministério da Saúde. **Guia de Vigilância Epidemiológica.** 5.ed. Brasília: FUNASA, 2002. 842 p.

FUNDAÇÃO NACIONAL DA SAÚDE (Brasil). Ministério da Saúde. **Manual de Dengue: vigilância epidemiológica e atenção ao doente.** Brasília: DEOPE, 1996. 79 p.

FUNASA. **Dengue: medidas de controle.** Disponível em:
< http://www.funasa.gov.br/guia_epi/htm/doencas/dengue/medidas_control.htm >
Acesso em: 16 ago. 2003a.

FUNASA. **Vigilância Epidemiológica: Programa Nacional de Controle da Dengue.** Disponível em: < <http://www.funasa.gov.br/epi/dengue/dengue0.htm> >
Acesso em: 23 set. 2003b.

GADELHA, D. P.; TODA A. T. Biologia e comportamento do *Aedes aegypti*. **Rev. Bras. Malar. Doenças Trop.**, v. 37, p. 29-36, 1985.

GEORGHIOU, G. P.; TAYLOR, C. E. Genetic and biological influences in the evolution of insecticide resistance. **J. Econ. Entomol.**, v. 70, p. 319-323, 1977.

GEORGHIOU, G. P.; WIRTH, M.; TRAN, H.; SAUM, F.; KNUDSEN, A. B. Potential for organophosphate resistance in *Aedes aegypti* in the Caribbean area and neighbouring countries. **J. Med. Entomol.**, v. 24, p. 290-294, 1987.

GRATZ, N.G.; JANY, W. C. What role for insecticides in vector control programs? **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 50, n. 6, p. 11-20, 1994.

GUBLER, D. J.; TRENT, D. W. Emergence of epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health problem in the Americas. **Infect. Agents Dis.**, v. 2, p. 383-393, 1994.

HALSTEAD, S. B. Pathogenesis of dengue: Challenges to molecular biology. **Science**, v. 239, n. 4839, p. 476-481, 1988.

HEMINGWAY, J.; RANSON, H. Insecticide resistance in vectors of human disease. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 45, p. 371-391, 2000.

HERRERA-BASTO, E. et al. First reported outbreak of classical dengue fever at 1700 meters above sea level in guerrero state, Mexico, June 1988. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 46, n. 6, p. 649-653, 1992.

INTERNATIONAL TRAVEL AND HEALTH (WHO). **Disease maps: dengue**. Disponível em: < http://www.who.int/ith/chapter05_m02_dengue.html >. Acesso em: 17 nov. 2003.

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

KHAWALED, K.; BEN-DOV, E.; ZARISTKY, A.; BARAK, Z. The fate of *Bacillus thuringiensis* var. israelensis in *B. thuringiensis* var. israelensis-killed pupae of *Aedes aegypti*. **J. Invertebr. Pathol.**, v. 56, n. 3, p. 312-316, 1990.

KHAWALED, K.; COHEN, T.; ZARISTKY, A. Digestion of *Bacillus thuringiensis* var. israelensis spores by larvae of *Aedes aegypti*. **J. Invertebr. Pathol.**, v. 59, n. 2, p. 186-189, 1992.

LARANJA, A. T.; BICUDO, H. E. M. C.; MANZATO, A. J. Effects of caffeine and used coffee grounds on biological features of *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) and their possible use in alternative control. **Genet. and Mol. Biol.**, Ribeirão Preto, v. 26, n. 4, p. 419-430, 2003.

LIMA-CATELANI, A. R.; CERON, C. R.; BICUDO, H. E. M. C. Genetic Variation during development, revealed by esterase patterns of *Aedes aegypti*. **Biochem. Genet.** No prelo.

MARINOTTI, O.; JAMES, A. A.; RIBEIRO, J. M. C. Diet and salivation in female *Aedes aegypti* mosquitoes. **J. Insect Physiol.**, v. 36, n. 8, p. 545-548, 1990.

MARTEN, G. G.; BORJAS G.; CUSH M.; FERNANDEZ E.; REID J. W. Control of larval *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) by cyclopoid copepods in peridomestic breeding containers. **J. Med. Entomol.**, v. 31, n. 1, p. 36-44, 1994.

MARTINEZ-TORREZ, E. **Dengue hemorrágico en niños**. Bogotá: Ministério de Salud, Colombia, 141 p. 1990.

MARZOCHI, K. B. F. Dengue in Brasil – situação, transmissão e controle: a proposta para controle ecológico. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 89, n. 2, p. 235-245, 1994.

MELO-SANTOS, M. A.; SANCHES, E. G.; JESUS, F. J.; REGIS, L. Evaluation of a new tablet formulation based on *Bacillus thuringiensis* sorovar. israelensis for larvicidal control of *Aedes aegypti*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 6, p. 859-860, 2001.

MONATH, T. P. Yellow fever and dengue: the interactions of virus, vector and host in the re-emergence of epidemic disease. **Virology**, v. 5, p. 133-145, 1994.

MOORE, C. G.; CLINE, B. L.; RUIZ-TIBÉN, E.; LEE, D.; ROMNEY-JOSEPH, H.; RIVERA-CORREA, E. *Aedes aegypti* in Puerto Rico: environmental determinants of larval abundance and relation to dengue virus transmission, **The Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 27, n. 6, p. 1225-1231, 1978.

MOUCHÈS, C.; PAUPLIN, Y.; AGARWAL, M.; LEMIEUX, L.; HERZOG, M.; ABADON, M.; BEYSSAT-ARNAOUTY, V.; HYRIEN, O.; VICENT, B. R. V.; GEORGHIOU, G. P.; PASTEUR, N. Characterization of amplification core and esterase B1 gene responsible for insecticide resistance in *Culex*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 87, p. 2574-2578, 1990.

MOURYA, D. T.; HEMINGWAY, J.; LEAKE, C. J. Changes in enzyme titres with age in four geographical strains of *Aedes aegypti* and their association with insecticide resistance. **Med. Vet. Entomol.**, v. 7, p. 11-16, 1993.

NENG, W.; SHUSEN, W.; GUAGXIN, H.; RONGMAN, X.; GUANGKUN, T.; CHEN, Q. Control of *Aedes aegypti* larvae in household water containers by Chinese cat fish. **Bull. World Health Org.**, v. 65, n. 4, p. 503-506, 1987.



OLSON, K. E. et al. Genetically engineered resistance to Dengue-2 virus transmission in mosquitoes. **Science**, v. 272, p. 884-886, 1996.

ORDUZ, S. et al. Transfer of toxin genes to alternate bacterial hosts for mosquito control. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 1, p. 97-107, 1995.

PASTEUR, N.; GEORGHIU, G. P. Filter paper test for rapid determination of phenotypes with high esterase activity in organophosphate resistant mosquitoes. **Mosq. News**, v. 41, p. 181-183, 1981.

PEREIRA, M.; SANTUCCI, S. G. **Dengue: vigilância epidemiológica.**

Disponível em:

<http://www.sucen.sp.gov.br/doencas/dengue_f_amarela/texto_dengue_pro3.htm

Acesso em: 27 jul. 2003.

PÊSSOA, 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.

POIRIÉ, M.; RAYMOND, M.; PASTEUR, N. Identification of two distinct amplifications of the esterase B locus in *Culex pipiens* (L.) mosquitoes from Mediterranean countries. **Biochem. Genet.**, v. 30, p. 13-26, 1992.

POLANCZYK, R. A.; GARCIA, M. O.; ALVES, S. B. Potential of *Bacillus thuringiensis israelensis* Berliner for controlling *Aedes aegypti*. **Rev. Saúde Pública**, v. 37, n. 6, p. 813-816, 2003.

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

RAYMOND, M.; BEYSSAT-ARNAOUTY, V.; SIVASUBRAMANIAN, N.; MOUCHES, C.; GEORGHIU, G. P.; PASTEUR, N. Amplification of various esterase B's responsible for organophosphate resistance in *Culex* mosquitoes. **Biochem. Genet.**, v. 27, p. 417-423, 1989.



RAWLINS, S. C.; WAN, J. O. H. W. Resistance in some Caribbean populations of *Aedes aegypti* to several insecticide. **J. Am. Mosq. Control. Assoc.**, v. 11, p. 59-65, 1995.

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

RODHAIN, F. La situation de la dengue dans le monde: La situation de la dengue et de la dengue hémorragique dans le monde, dans les Amériques et en Guyane Française. **Bull. Soc. Pathol. Exot.**, v. 89, n. 2, p. 87-90, 1996.

SANTOS, L. U.; ANDRADE, C. F. Survey of cyclopids (Crustacea, Copepoda) in Brazil and preliminary screening of their potential as dengue vector predators. **Rev. Saude Publica**, v. 31, n. 3, p. 221-226, 1997.

SCHAPER, S. Evaluation of Costa Rican copepods (Crustacea: Eudecapoda) for larval *Aedes aegypti* control with special reference to *Mesocyclops thermocyclopoides*. **J. Am. Mosq. Control. Assoc.**, v. 15, n. 4, p. 510-519, 1999.

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

SHERRATT, T. N.; TIKASINGH E. S. A laboratory investigation of mosquito larval predation by *Toxorhynchites moctezuma* on *Aedes aegypti*. **Med. Vet. Entomol.**, v. 3, n. 3, p. 239-246, 1989.

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.

SOUSA-POLEZZI, R. C.; BICUDO, H. E. M. C. Effect of phenobarbital on inducing insecticide tolerance and esterase changes in *Aedes aegypti*. **Genet. and Mol. Biol.**, Ribeirão Preto, 2003. No prelo.

TAUIL, P. L. Critical aspects of dengue control in Brazil. **Cad. Saúde Pública**, v. 18, n. 3, p. 867-871, 2002.



TAUIL, P. L. Urbanization and dengue ecology. **Cad. Saúde Pública**, v. 17, p. 99-102, 2001. Supplement.

TIKASINGH, E. S.; EUSTACE, A. Suppression of *Aedes aegypti* by predatory *Toxorhynchites moctezuma* in an island habitat. **Med. Vet. Entomol.**, v. 6, n. 3, p. 272-280, 1992.

TRIOLA, M. F. **Introdução à Estatística**. 7.ed. Rio De Janeiro: LTC, 1998. 410 p.

UNIVERSIDADE DE CAMPINAS. Prefeitura da Cidade Universitária. **Ciclo de vida do *Aedes aegypti***. Disponível em:

<http://www.prefeitura.unicamp.br/prefeitura/CA/DENGUE/3dengue_unicamp.html>. Acesso em: 15 abr. 2003.

USSUI, C. A.; BARATA, E. A. **Dengue**: medidas de controle e profilaxia. Disponível em: <<http://www.sucen.sp.gov.br/doencas/index.htm>>. Acesso em: 27 jul. 2003.

VANDERLEY, D. M. V.; GUTIERREZ, E. B.; ANDRADE, J. C.; 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. 23 p.

VAUGHAN A.; HEMINGWAY J. Mosquito carboxylesterase Est α 2¹ (A₂): cloning and sequence of the full-length cDNA for a major insecticide resistance gene worldwide in the mosquito *Culex quinquefasciatus*. **J Biol Chem.**, v. 270, n. 28, p. 1744-1749, 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.

VEZZA, A. C. et al. Characterization of the viral RNA species of prototype dengue viruses. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 29, p. 643-652, 1980.



VU, S. N.; NGUYEN, T.Y.; KAY, B. H.; MARTEN, G. G.; REID, J. W.
Eradication of *Aedes aegypti* from a village in Vietnam, using copepods and
community participation. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 59, n. 4, p. 657-660, 1998.

WHO. Dengue and dengue haemorrhagic fever.

Disponível em: < <http://www.who.int/inf-fs/em/fact117.html> >.

Acesso em: 17 maio 2003a.

WHO. Dengue: infectious Diseases Home.

Disponível em: < <http://www.who.int/ctd/dengue/index.html> >.

Acesso em: 03 out. 2003b.



VIII. RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo ampliar o conhecimento do efeito da cafeína e da borra do café como possíveis elementos de controle alternativo para o *Aedes aegypti*, na fase larval. A abordagem para verificar a durabilidade do efeito, na mortalidade larval, da suspensão da borra do café pós-preparo, colocada no criadouro experimental, foi realizada utilizando as concentrações 75, 150, 225 e 300 mg/mL. A concentração de 300 mg/mL mostrou-se mais eficiente, pois adultos foram produzidos, a partir de larvas tratadas, apenas quando a suspensão atingiu 12 dias pós-preparo, tanto nos testes realizados com adição de alimento, como nos sem alimento. Nos experimentos para verificar a durabilidade do efeito da solução de cafeína, também colocada no criadouro experimental, usando as concentrações 0,2, 0,5, 1,0 e 2,0 mg/mL, as duas últimas mostraram-se mais eficientes, sem produção de adultos, nos experimentos com e sem alimento. Foi comparado o efeito da cafeína estocada em frasco fechado e mantida em temperatura ambiente e em geladeira. As soluções a 1,0, 2,0 e 2,5 mg/mL mantiveram-se igualmente eficientes até sete meses pós-preparo das soluções, diferentemente do que ocorreu com as soluções de temefós (0,0025, 0,025 e 0,05 µg/mL), que aos três meses pós-preparo apresentaram redução da eficiência, indicada principalmente pela produção de adultos. Outra abordagem realizada visou a verificar se a cafeína e a borra do café exercem alguma atração ou rejeição, sobre as fêmeas, para oviposição, na presença do meio controle (água). Em relação à cafeína, embora tenha havido variação dos resultados, talvez seja possível interpretá-los como indicação de preferência, o que é muito interessante para fins de controle. A fêmea ovipõe em um meio onde suas

larvas morrerão. De qualquer forma, os dados mostraram que, se não há preferência, não há também rejeição em relação à cafeína. A borra do café, porém, apresentou número consistentemente baixo de ovos, nos dois experimentos realizados. Procurou-se, também, verificar se há efeito da cafeína na eclosão larval. Em testes usando as concentrações 0,2, 0,5, 1,0 e 2,0 mg/mL, a maior taxa de eclosão, em 96h de tratamento, ocorreu na cafeína a 1,0 mg/mL, na qual predominaram as diferenças estatisticamente significantes. A cafeína a 0,5 mg/mL apresentou a maior taxa de eclosão em 24h de tratamento, contudo esta não diferiu significativamente da eclosão na água. A administração, aos adultos, de cafeína a 3,0 mg/mL adicionada na solução de açúcar, afetou a mobilidade e a viabilidade dos mosquitos. Foi, ainda, analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida, o efeito da cafeína (1,0 mg/mL) e do temefós (0,0025 e 0,005 µg/mL) no padrão de esterases em larvas L4 e algumas pupas, observando-se que ocorreu alteração do padrão de expressão das bandas EST-1, EST-13 e EST-20, que tiveram redução da sua expressão no início do tratamento, e aumento da mesma, com o tempo passar do de exposição, em ambas as substâncias. De modo geral, os dados reiteram que a cafeína e a borra do café podem ser auxiliares no controle do *Aedes*, se utilizados de forma adequada e na concentração indicada.

Palavras-chaves: Controle alternativo do *Aedes aegypti*; cafeína; borra do café; esterases; mortalidade do *Aedes aegypti*.



IX. ABSTRACT



The aim of the present work was to increase the knowledge of the effect of caffeine and of the used coffee ground as possible elements for alternative control of *Aedes aegypti* larvae. The study of the durability of the effect on mortality, of used coffee ground suspension, put in the experimental breeding sites, in different times after preparation was carried out using the concentrations 75, 150, 225 and 300 mg/mL. The concentration of 300 mg/mL was the most efficient, because adults were produced from treated larvae, only when the suspension reached 12 days after preparation, in tests with or without food. In the experiments to verify the durability, in the experimental breeding sites, of the effect of caffeine solutions at the concentrations 0.2, 0.5, 1.0 and 2.0 mg/mL, the last two showed the greatest efficiency, without production of adults, in the experiments with and without addition of food. The effect of the caffeine solution maintained in bottles at room temperature and in the refrigerator was compared. The solutions at 1.0, 2.0 and 2.5 mg/mL kept equally their efficiency during the time of tests, up to seven months after preparation, differently from temephos solutions (0.0025, 0.025 and 0.05 µg/mL), which at three months after preparation had their efficiency reduced, detected mainly by production of adults. Other approach aimed to verify if caffeine and used coffee ground attract or reject females for oviposition in the presence of water (control). The results of different experiments varied. There was some indication of preference, but, if there is no preference, there is also no rejection of caffeine, by females, for oviposition, what is important for control. The used coffee ground, however, showed low number of eggs in every experiment. In the approach to verify if there is effect of the caffeine in the eclosion, the concentrations 0.2, 0.5, 1.0 and 2.0 mg/mL were used. The greatest eclosion rate, in 96h of treatment, occurred in the caffeine at 1.0 mg/mL, which showed most of the statistically significant differences. Caffeine at 0.5

mg/mL showed the greatest eclosion rate in 24h of treatment; however it did not differ significantly from the control medium. The administration to adult mosquitoes of caffeine at 3.0 mg/mL added to the sugar solution affected their mobility and viability. Another analysis involved electrophoresis in polyacrylamide gels, in order to study the effect of caffeine (1.0 mg/mL) and of temephos (0.0025 and 0.005 µg/mL) in the expression level of esterases from L4 larvae and pupae. Changes were observed in the bands EST-1, EST-13 and EST-20, which had initial reduction or blockade of expression in the treatment, but increased their expression with the increase of treatment time, in both substances. In general, the data of the present work reinforces that caffeine and used coffee ground can be used as auxiliaries in *Aedes aegypti* control, if the recommendations about concentration and interval of new preparation addition are followed.

Words-keys: Alternative control of *Aedes aegypti*; caffeine; used coffee ground; esterases; *Aedes aegypti* mortality.



