

LARISSA DE CÁSSIA BASILIO

**ÓLEO ESSENCIAL DE *Laurus nobilis* L. (LOURO) INDUZ A ATIVAÇÃO DE
ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E VIAS DE SINALIZAÇÕES CELULARES
DURANTE A AÇÃO LARVICIDA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Leandro Licursi de Oliveira

Coorientadores: Michelle D. de O. Teixeira
Kenner de M. Fernandes

**VIÇOSA – MINAS GERAIS
2022**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

B312o
2022 Basílio, Larissa de Cássia, 1994-
Óleo essencial de *Laurus nobilis* L. (louro) induz a ativação de espécies reativas de oxigênio e vias de sinalizações celulares durante a ação larvicida / Larissa de Cássia Basílio. – Viçosa, MG, 2022.

1 dissertação eletrônica (56 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Leandro Licursi de Oliveira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Biologia Geral, 2022.

Referências bibliográficas: f. 51-56.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2023.070>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. *Laurus nobilis*. 2. Louro. 3. Essências e óleos essenciais. 4. Espécies reativas de oxigênio. 5. Larvicidas. I. Oliveira, Leandro Licursi de, 1975-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Geral. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural. III. Título.

CDD 22. ed. 583.23


LARISSA DE CÁSSIA BASILIO

ÓLEO ESSENCIAL DE *Laurus nobilis* L. (LOURO) INDUZ A ATIVAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E VIAS DE SINALIZAÇÕES CELULARES DURANTE A AÇÃO LARVICIDA


Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 14 de dezembro de 2022

Assentimento:

Documento assinado digitalmente
 LARISSA DE CASSIA BASILIO
Data: 08/03/2023 10:48:54-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Larissa de Cássia Basílio
Autora

Documento assinado digitalmente
 LEANDRO LICURSI DE OLIVEIRA
Data: 08/03/2023 14:11:16-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Leandro Licursi de Oliveira
Orientador

*Dedico esta dissertação a minha
família por todo suporte e apoio.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente a Deus, por se fazer presente sempre em todos os momentos da minha vida, por iluminar meus caminhos, por ter colocado pessoas incríveis na minha vida que são como anjos e por ter me dado forças para sempre continuar em frente mesmo quando eu queria desistir.

Agradeço à minha mãe Sandra Basílio, uma mulher incrível que sempre fez tudo o que podia para me ajudar. Agradeço também ao meu pai Luiz Basílio por todo apoio e incentivo a sempre continuar correndo atrás dos meus objetivos. As minhas irmãs, cunhados, sobrinhos e padrinhos por sempre estarem comigo. Amo vocês!

Agradeço ao meu querido orientador Prof. *Dr.* Leandro Licursi, por ter me acolhido com muita boa vontade no LIQ-UFV, por todo ensinamento, companheirismo, ajuda e incentivo para continuar minha caminhada na área de pesquisa e servindo de exemplo para mim do profissional que quero me tornar um dia. Meu muito obrigado!

Agradeço a minha amadíssima coorientadora Prof^a. *Dr^a.* Michelle Dias, meu anjinho, por quem tenho uma imensa gratidão por tudo que fez por mim, por acreditar no meu potencial, por sempre estar me apoiando, me incentivando e me ensinando novos assuntos. Meu muito obrigada!

Agradeço ao meu coorientador (mestre Jedi), *Dr.* Kenner de Moraes, por toda paciência que teve comigo ao me ensinar um assunto tão diferente do que estou acostumada a estudar, por todo puxão de orelha e também por todas as risadas, meu muito obrigada!

Às meninas do LIQ-UFV, com quem dividi todo esse tempo junto, onde passamos por apertos e dificuldades, mas sempre nos mantivemos rindo e transformando essa caminhada bem mais leve, sem vocês não seria nada!

À Franciane, Cliver e Davi, por toda ajuda durante o mestrado, por todo ensinamento, companheirismo e por toda paciência, com certeza aprendi muito com vocês!

Agradeço aos meus amigos, especialmente Felipe Santos, Ana Carolina, Camila Andrade, por sempre estarem comigo, me ouvindo, me aconselhando, por todos os abraços e choros compartilhados. Amo vocês!

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realizar a pós-graduação.

Ao departamento do Biologia Geral, aos professores da Pós-graduação de Biologia Celular e Estrutural, pelo compartilhamento do conhecimento, e a todos os funcionários do departamento, em especial ao professor Gustavo Ferreira Martins por disponibilizar o insetário, ao professor Serrão por disponibilizar o seu laboratório para o desenvolvimento dos experimentos e Raquel Maia da Fiocruz pela disponibilidade da desova do mosquito *Aedes aegypti* utilizado no trabalho, muito obrigada!

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos, por onde tive a oportunidade de desenvolver meu projeto e me inserir ainda mais na área científica.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Muito obrigada!

*“Prefiram a minha instrução à prata,
e o conhecimento ao ouro puro,
pois a sabedoria é mais preciosa do que rubis;
nada do que vocês possam desejar compara-se a ela.”
Provérbios 8:10-11*

RESUMO

BASÍLIO, Larissa de Cássia, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2022. **Óleo essencial de *Laurus nobilis* L. (louro) induz a ativação de espécies reativas de oxigênio e vias de sinalizações celulares durante a ação larvicida.** Orientador: Leandro Licursi de Oliveira. Coorientadores: Michelle Dias de Oliveira Teixeira e Kenner de Moraes Fernandes.

Devido ao aumento da resistência aos inseticidas químicos pelos insetos e também pela poluição da fauna e flora local causado pelo seu uso, é observado um aumento do número de estudos sobre plantas medicinais com atividades inseticidas/larvicidas. Alguns desses trabalhos indicam que os compostos derivados de plantas medicinais apresentam atividades biológicas inseticidas. Assim, dada a importância da busca por novas alternativas que visem o controle dos insetos, principalmente dos vetores de doenças como é o caso do *Aedes aegypti*, propõe-se para estudo a verificação da ação larvicida do óleo essencial de louro (*Laurus nobilis*) sobre larvas de *A. aegypti*. Dessa forma, as larvas em estágio L3 foram expostas a diferentes diluições do óleo essencial de louro, onde a diluição 1:10.000, cuja a concentração é 0,08870 mg/mL foi utilizada nos testes posteriores, uma vez que foi a mais se aproximou do CL₅₀ (0,1226 mg/mL). As larvas tratadas com o óleo essencial apresentaram diversas alterações histológicas, como vacúolos nas células, desorganização do epitélio intestinal, ausência de borda estriada entre outros. Além disso, também foi observado um aumento de enzimas envolvidas no estresse oxidativo dosado no intestino médio posterior das larvas L3 de *A. aegypti*, assim como em alguns marcadores de oxidação lipídica e proteica. Através de imunofluorescência, constatou-se uma supressão das vias de proliferação celular, reorganização tecidual, diferenciação celular e uma ativação das vias de apoptose e autofagia. Portanto, o óleo essencial de louro mostrou-se um ótimo composto a ser utilizado como inseticida/larvicida natural.

Palavras-chave: *Laurus nobilis* L. Louro. Óleo Essencial. Espécies Reativas de Oxigênio.

ABSTRACT

BASÍLIO, Larissa de Cássia, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, December, 2022. **Essential oil of *Laurus nobilis* L. (laurel) induces activation of reactive oxygen species and cellular signaling pathways during larvicidal action.** Adviser: Leandro Licursi de Oliveira. Co-advisers: Michelle Dias de Oliveira Teixeira and Kenner de Moraes Fernandes.

Due to the increase in resistance to chemical insecticides by insects and also due to the pollution of the local fauna and flora caused by their use, an increase in the number of studies on medicinal plants with insecticidal/larvicidal activities is observed. Some of these studies indicate that compounds derived from medicinal plants have insecticidal biological activities. Hence, given the importance of the search for new alternatives aimed at controlling insects, especially disease vectors such as *Aedes aegypti*, it was proposed to study the verification of the larvicidal action of the essential oil of laurel (*Laurus nobilis* L.) on *A. aegypti* larvae. Thus, larvae in stage L3 were exposed to different dilutions of essential oil of laurel, where the dilution 1:10,000, whose concentration is 0.08870 mg/mL was used in subsequent tests, since it was the closest to of the LC50 (0.1226 mg/mL). The larvae treated with the essential oil showed several histological alterations, such as vacuoles in the cells, disorganization of the intestinal epithelium, absence of a striated border, among others. In addition, an increase in enzymes involved in oxidative stress measured in the posterior midgut of *A. aegypti* L3 larvae was also observed, as well as in some markers of lipid and protein oxidation. Through immunofluorescence, a suppression of cell proliferation pathways, tissue reorganization, cell differentiation and activation of apoptosis and autophagy pathways were observed. Therefore, laurel essential oil proved to be a great compound to be used as a natural insecticide/larvicide.

Keywords: *Laurus nobilis* L. Laurel. Essential Oil. Oxigen Reactive Species.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estágios de desenvolvimento do <i>Aedes aegypti</i>	14
Figura 2 – Larva de <i>Aedes aegypti</i>	15
Figura 3 – Pupa de <i>Aedes aegypti</i>	16
Figura 4 – Árvore do louro.....	21
Figura 5 – Sobrevivência das larvas de <i>Aedes aegypti</i> após exposição à diferentes diluições do óleo essencial de louro.....	30
Figura 6 – Sobrevivência de mosquitos adultos.....	31
Figura 7 – Cortes histológicos do intestino médio de larvas de <i>Aedes aegypti</i>	33
Figura 8 – Efeito do óleo essencial de louro na atividade das enzimas do estresse oxidativo.....	35
Figura 9 – Efeito do óleo essencial de louro na atividade da enzima Glutathione-S-transferase (GST).....	36
Figura 10 – Efeito do óleo essencial de louro na atividade do marcador de oxidação lipídica malonaldeído (MDA).....	36
Figura 11 – Efeito do óleo essencial de louro na atividade do marcador de oxidação proteica: proteína carbonilada.....	37
Figura 12 – Imunomarcção para ERK no intestino médio de larvas de <i>Aedes aegypti</i>	39
Figura 13 – Imunomarcção para PH3 no intestino médio de larvas de <i>Aedes aegypti</i>	40
Figura 14 – Imunomarcção para JNK no intestino médio de larvas de <i>Aedes aegypti</i>	41
Figura 15 – Imunomarcção para FMRF no intestino médio de larvas de <i>Aedes aegypti</i>	42
Figura 16 – Imunomarcção para Armadilho no intestino médio de larvas de <i>Aedes aegypti</i>	43
Figura 17 – Imunomarcção para WNT no intestino médio de larvas de <i>Aedes aegypti</i>	43
Figura 18 – Imunomarcção para Prospero no intestino médio de larvas de <i>Aedes</i>	

<i>aegypti</i>	44
Figura 19 – Imunomarcção para Notch1 no intestino médio de larvas de <i>Aedes aegypti</i>	45
Figura 20 – Imunomarcção para Delta no intestino médio de larvas de <i>Aedes aegypti</i>	46
Figura 21 – Imunomarcção para Caderina no intestino médio de larvas de <i>Aedes aegypti</i>	47
Figura 22 – Imunomarcção para Caspase 3 no intestino médio de larvas de <i>Aedes aegypti</i>	48
Figura 23 - Imunomarcção para LC3/AB no intestino médio de larvas de <i>Aedes aegypti</i>	49

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1 <i>Aedes aegypti</i>	12
2.1.1 Ovos e Larvas	13
2.1.2 Pupas e adultos	15
2.1.3 Doenças transmitidas e o controle da disseminação do <i>A. aegypti</i>	16
2.1.4 Intestino dos mosquitos	20
2.2 LOURO (<i>Laurus nobilis</i> L.)	20
3 OBJETIVOS	23
3.1. OBJETIVO GERAL	23
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
4 METODOLOGIA	24
4.1 PROCEDIMENTOS E TÉCNICAS DE COLETA DOS DADOS	24
4.1.1 Óleo essencial	24
4.1.2 Sobrevivência	24
4.1.3 Morfologia	24
4.1.4 Imunofluorescência	25
4.1.5 Estresse oxidativo.....	26
4.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA	29
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	30
5.1 SOBREVIVÊNCIA.....	30
4.2 ALTERAÇÃO DA MORFOLOGIA DO INTESTINO MÉDIO DAS LARVAS DE <i>A. AEGYPTI</i> APÓS EXPOSIÇÃO AO ÓLEO DE LOURO.....	32
4.3 EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DE LOURO NO ESTRESSE OXIDATIVO	34
4.4 EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DE LOURO SOBRE VIAS CELULARES RELACIONADAS A SOBREVIVÊNCIA	38
5 CONCLUSÃO	50
6 REFERÊNCIAS	51

1 INTRODUÇÃO

De origem africana, o *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) é um mosquito adaptado em regiões urbanas, sendo ele vetor de doenças como Dengue, Febre Amarela, Zika e Chikungunya. Para seu desenvolvimento em fase larval e pupal, utiliza lugares que acumulam água, como por exemplo, tanques de armazenamento de água, caixas d'água sem vedação adequada. (FURTADO et al., 2005; BRAGA e VALLE, 2007; MATTHEWS, 2019; GARCEZ et al., 2013; CHAVES et al., 2020).

Dessa forma, para evitar a disseminação da doença, é importante realizar o controle do vetor. Para que isso ocorra de forma efetiva, o controle deve contar com várias alternativas e não um método apenas. Assim, esse controle pode ser realizado de diversas formas, desde a eliminação do criadouro do mosquito até a eliminação do próprio indivíduo adulto, realizados mais comumente com inseticidas e ou pesticidas. (BRAGA e VALLE, 2007; GARCEZ et al., 2013). Um ponto muito discutido em relação ao uso irracional de inseticidas é que os mesmos são não-seletivos, ou seja, ao serem aplicados no meio ambiente, agirão sobre os mosquitos de *A. aegypti* tanto quanto a outros insetos muitas vezes benéficos para aquele ambiente. (GARCEZ et al., 2013; TABANCA et al., 2013).

Com isso, vem surgindo a necessidade de pesquisas para novos potenciais inseticidas que não sejam muito agressivos ao meio ambiente. Com isso, as plantas medicinais e seus produtos vem sendo muito estudadas como uma possível alternativa aos inseticidas convencionais, por serem consideradas grandes fontes de metabólitos ativos com diferentes atividades biológicas na planta. Esses metabólitos, principalmente os secundários, são em sua maioria, responsáveis pela defesa, proteção da planta contra insetos, predadores, entre outros. (MILLEZI et al., 2012; GARCEZ et al., 2013). O *Laurus nobilis* L., popularmente conhecido como louro e pertencente ao grupo das Lauraceae, é uma planta aromática muito utilizada como condimento, mas que apresenta ações medicinais, como atividade antimicrobiana, inseticida. (EMBRAPA, 2007; SANTOS e COELHO, 2013; PEREIRA et al., 2014).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Aedes aegypti*

O *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) é um mosquito que apresenta como características um corpo de coloração escura a preto com listras brancas espalhadas pelo corpo. O *A. aegypti* foi primeiramente descrito na África, mais precisamente no Egito, por Linnaeus em 1762 e atualmente se encontra em todo o continente americano, na Índia e em partes da Ásia, sendo bem adaptado em regiões tropicais e subtropicais. (CONSOLI e OLIVEIRA, 1994; NATAL, 2002; COSTA, 2019).

Acredita-se que a disseminação do mosquito *A. aegypti* tenha começado a ocorrer ainda durante a época da colonização juntamente com os navios de escravos, onde supostamente os mosquitos se escondiam nos lugares mais escuros para se camuflar. (CONSOLI e OLIVEIRA, 1994). Atualmente, a disseminação do *A. aegypti*, pode ocorrer de modo passivo, onde materiais contendo os ovos do mesmo, como pneus, bacias, vasos de plantas entre outros, são transportados de um lugar para outro, podendo ser de cidade para cidade, de um continente para o outro, e esses ovos, se viáveis, entrarem em contato com a água, eclodem, aumentando dessa forma a população do *A. aegypti* daquele local e conquistando novos territórios. (CONSOLI e OLIVEIRA, 1994; NATAL, 2002).

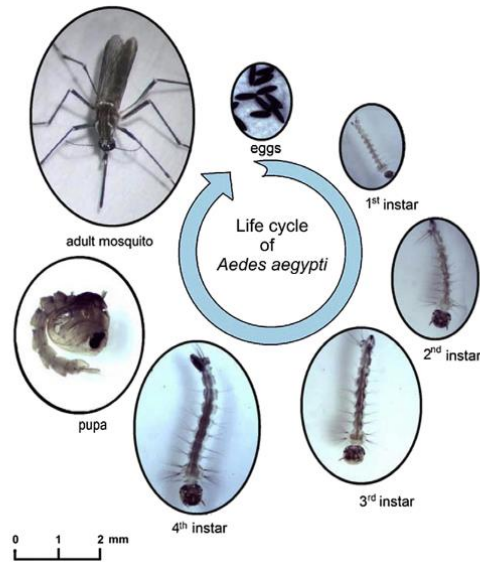
Sendo muito bem adaptado a regiões urbanas, é o vetor de importantes arboviroses (Ar = *arthropod* + bo = *borne* + *viruses*) que são doenças infecciosas ocasionadas por vírus (arbovírus) que replicam em tecidos de artrópodes que se alimentam de sangue (hematófagos) e, dessa forma, são transmitidos para outro hospedeiro suscetível no momento da picada. (CONSOLI e OLIVEIRA, 1994). Como exemplos dessas doenças podemos citar a Dengue, Febre Amarela, Zika e Chikungunya.

O desenvolvimento do *A. aegypti* é compreendido em 4 fases, sendo que as fases iniciais são dependentes de água. Dessa forma, o mosquito utiliza lugares que acumulam água, como por exemplo, tanques de armazenamento de água, caixas d'água sem vedação adequada, potes, vasilhas, pneus, vasos de plantas entre outros objetos, até que emergem para a fase adulta. (FURTADO et al., 2005; BRAGA e VALLE, 2007; GARCEZ et al., 2013; MATTHEWS, 2019; CHAVES et al., 2020).

2.1.1 Ovos e Larvas

Os ovos do *A. aegypti* são estáticos, com um formato geralmente elíptico, fusiforme ou oval, podendo sofrer variações na sua forma e apresentam cerca de um milímetro de comprimento. Após a ovoposição pelas fêmeas, eles apresentam-se com coloração clara a esbranquiçada que, com pouco tempo após serem postos, tornam-se mais escuros. As fêmeas podem colocar ovos de forma separada ou em conjuntos, mas sempre serão postos próximos a água ou sobre sua superfície, em locais com muita umidade e em locais que apresentam capacidade de inundação, como o caso de pneus por exemplo. (CONSOLI e OLIVEIRA, 1994; BRASIL, 2001; NUNES, 2016; COSTA, 2019).

Da ovoposição ao desenvolvimento do embrião, que pode levar cerca de dois a três dias, os ovos tornam-se então resistentes à dessecação, o que consiste em um período de latência próximo de um ano, ou seja, após o amadurecimento dos ovos, os mesmos podem permanecer no local sem contato com água por até um ano, e caso nesse período o recipiente contaminado entre em contato com a água, os ovos serão estimulados a eclodir, dando início a um novo ciclo de vida do *A. aegypti*. No período larval, ocorrem três mudas (L1, L2, L3) até chegar à larva de quarto estágio (L4), que dará origem à pupa, como mostra a figura 1. (BRASIL, 2001; NATAL, 2002).

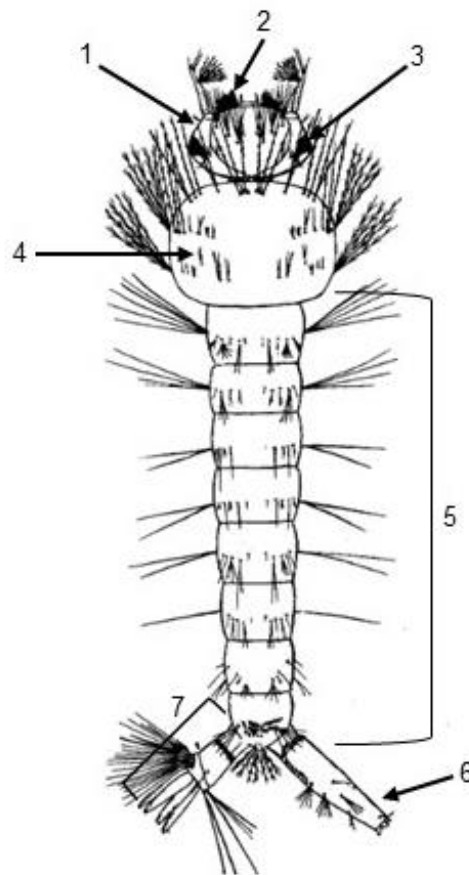


Fonte: Geris et al., 2010.

Figura 1 – Estágios de desenvolvimento do *Aedes aegypti*. A duração do tempo em cada fase de desenvolvimento desde o amadurecimento do ovo, passando pelos 4 estágios de fase larval, pupa e adulto, podem variar dependendo de interferência de fatores, como quantidade da população, disponibilidade de alimento, temperatura entre outros.

O período de duração dessa fase até a pupação é variável, sendo influenciado pela temperatura (24° a 28°C – temperatura ótima), disponibilidade de alimento – geralmente alimentam-se de substâncias orgânicas presentes na água através da escova bucal –, luminosidade e o tamanho da população de larvas presentes no criadouro. Nessa parte do ciclo, as larvas (e as pupas) são aquáticas, mas necessitam do oxigênio do ar para respirarem, precisando sempre ir até a superfície da água para isso, esse processo de respiração, as larvas realizam através do sifão de respiração. (BRASIL, 2001; COSTA, 2019)

As larvas do *A. aegypti* possuem características de serem vermiformes e alongadas, apresentando uma coloração variável entre o esbranquiçado ao enegrecido, podendo também apresentar uma variação de cor esverdeada ou avermelhada. Possuem o corpo dividido em três partes principais, sendo eles a cabeça, o tórax e o abdômen (Figura 2). (CONSOLI e OLIVEIRA, 1994; NUNES, 2016).

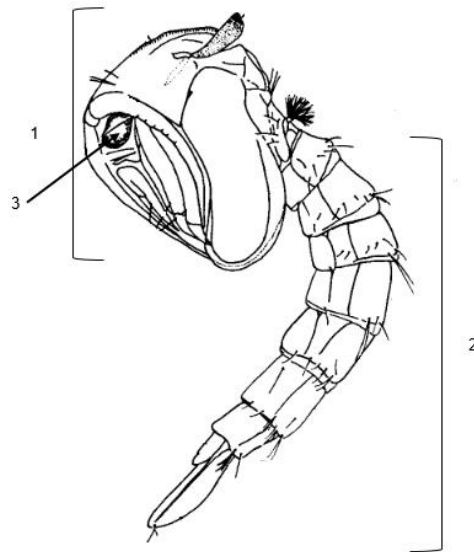


Fonte: Consoli e Oliveira, 1994 modificado

Figura 2 – Larva de *Aedes aegypti*. A larva possui uma (1) cabeça; (2) escova oral; (3) olhos; (4) tórax; (5) abdômen compreende a maior parte do corpo da larva; (6) sifão de respiração; (7) região anal.

1.1.2 Pupas e adultos

As pupas apresentam um formato parecido com o de uma vírgula, são muito móveis e ágeis quando perturbadas e, geralmente em ambiente calmo, se encontram na maior parte do tempo paradas na superfície da água. As pupas não se alimentam e a cor inicial apresentada pela pupa geralmente é a mesma cor da larva de quarto estágio (L4), porém, ao se aproximar da metamorfose para a fase adulta, a pupa apresenta uma coloração mais escura. Seu corpo é dividido em cefalotórax e abdômen e o estágio pupal leva cerca de dois a três dias (Figura 3). (CONSOLI e OLIVEIRA, 1994; BRASIL, 2001).



Fonte: Consoli e Oliveira, 1994, modificado.

Figura 3 – Pupa de *Aedes aegypti*. As pupas apresentam corpo dividido em: **1:** Cefalotórax; **(2)** abdômen e olhos compostos **(3)**.

O mosquito representa a fase adulta do *A. Aegypti*, caracterizando assim a fase reprodutora do inseto. Apresenta coloração escura, com listras brancas distribuídas pelo corpo. Assim que a pupa se transforma em mosquito, o mesmo permanece imóvel nas paredes do recipiente do criadouro por algumas horas, permitindo que haja o endurecimento das asas e exoesqueleto. (BRASIL, 2001). Geralmente se alimentam de néctar de flores ou outras fontes ricas em carboidratos como sucos de frutos. Por outro lado, para que a fêmea seja capaz de colocar seus ovos, ela necessita fazer o repasto sanguíneo para que ocorra o amadurecimento do folículo ovariano. (BRASIL, 2001; COSTA, 2019).

2.1.3 Doenças transmitidas e o controle da disseminação do *A. aegypti*

O *Aedes aegypti* é vetor responsável pela transmissão da Febre Amarela urbana, a qual é causada por um *Flavivirus*, podendo o infectado não apresentar sintomas ou apresentar sintomas leves. Geralmente as apresentações clínicas acontecem de forma repentina, como febre alta, calafrios, vômitos por aproximadamente três dias, dor muscular, cansaço e dor de cabeça. Já na forma grave da doença, apesar de rara, os sintomas clínicos apresentados são icterícia, insuficiências hepáticas e renais, cansaço intenso e manifestações hemorrágicas.

Vale lembrar que existe a vacina contra a febre amarela que é uma forma de prevenção individual que deve ser tomada. (BRASIL, 2022a).

Zika ou febre zika, é uma doença causada pelo vírus Zika (ZV) sendo seu vetor de transmissão o *A. aegypti* e sendo identificado pela primeira vez no Brasil em 2015. Grande parte dos infectados pelo vírus não apresentam manifestações clínicas, porém quando apresentam são dores leves nas articulações, febre baixa, manchas avermelhadas na pele, coceira, dor de cabeça e vermelhidão nos olhos. Sintomas como dor de garganta, tosse, inchaço no corpo e vômitos também podem aparecer, sendo esses menos frequentes. A Zika é em geral leve e branda com o desaparecimento dos sintomas de forma espontânea após 3 a 7 dias, podendo persistir as dores nas articulações por mais tempo. (BRASIL, 2022b). Sabe-se hoje que o vírus Zika também é responsável pelo desenvolvimento de outras doenças neurológicas como o caso da microcefalia e malformações em neonatos e a Síndrome de Guillain-Barré que acomete geralmente os indivíduos adultos. (GARCIA, 2018).

A epidemia da Zika que implicou no aumento dos casos de microcefalia ocorreu no segundo semestre de 2015, com concentração maior em Pernambuco e outros casos em demais estados do Nordeste brasileiro, ocorrendo uma elevação de nove vezes mais casos de microcefalia em 2015 com 1.608 casos, quando comparado com o período de 2000 a 2014 com 2.464 casos de neonatos com microcefalia conforme analisado por Garcia (2018) no registro do Sistema de Informações sobre Nascidos Vivos (Sinasc), tendo uma média de 164 casos por ano. Essa epidemia de microcefalia relacionada ao Zika vírus, se dá pelo fato de as mulheres grávidas contraírem o vírus durante a gestação, principalmente no primeiro trimestre de gravidez, período em que o sistema nervoso do feto está em formação, ocasionando assim a microcefalia ou uma malformação congênita. Dessa forma, a transmissão do vírus ocorre de mãe para o filho, sendo que o vírus já foi detectado em líquidos amnióticos, comprovando essa transmissão transversal ou transplacentária. (GARCIA, 2018).

A Síndrome de Guillain-Barré (SGB) por sua vez tem como característica uma deficiência no desenvolvimento sensório-motor inferior, sendo simétrica e bilateral, podendo ter aspectos clínicos variáveis. Essa doença ocorre geralmente após uma exposição a diferentes patógenos, podendo esses serem vírus ou bactérias, como é o caso dos vírus influenzas, o citomegalovírus, Epstein-Barr, HIV, Hepatites (A, B e C), enterovírus D68 e bactérias como *Campylobacter jejuni* e a *Mycoplasma*

pneumoniae, e o vírus mais recentemente relacionado ao desenvolvimento da doença é o Zika o qual teve seu primeiro caso associado também em 2015. (FILHO, 2016; BRASIL, 2022c). No caso da SGB, o estado brasileiro que mais apresentou casos diagnosticados da doença relacionado ao Zika vírus foi a Bahia. (FILHO, 2016). Conforme estudo feito por Malta e Ramalho (2020), nos anos de 2008 a 2014 houve uma média de 1.344 internações por SGB por ano, e em 2015 houve um aumento de 45% no número de internações por SGB, passando para 1.953 internações, coincidindo com a epidemia do Zika vírus. Ainda em seu estudo, Malta e Ramalho (2020) apontaram que os pacientes mais acometidos pela SGB eram do sexo masculino (58%) com idade média de 40 anos.

Já a Chikungunya ou febre chikungunya apresenta como manifestações clínicas, estado febril (acima de 38,5 °C) com início repentino, dores nas articulações das mãos e dos pés, incluindo dedos, pulsos e tornozelos de forma intensa. Outros sintomas como dores musculares e manchas vermelhas na pele também podem manifestar. (BRASIL, 2015).

Já a dengue por sua vez, é considerada por muitos, a principal doença transmitida pelo *A. aegypti*, sendo uma doença com grande incidência, principalmente em países subtropicais e tropicais, como o Brasil, infectando milhões de pessoas no mundo por ano e responsável por sucessivas epidemias, gerando preocupações aos órgãos de Saúde Pública pelo mundo. (FURTADO et al., 2005; CHAVES et al., 2020). O vírus dengue apresenta quatro sorotipos (DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4), ocasionando diversas manifestações clínicas, dentre elas estão a dengue clássica e a dengue hemorrágica. (GARCEZ et al., 2013; CHAVES et al., 2020).

O primeiro sintoma aparente na dengue clássica é a febre alta sendo ela de forma abrupta e podendo variar de 39° a 40°, logo após apresenta-se cefaleia, cansaço, náuseas, dores musculares, vômitos, dores nas articulações, dor retroorbital, perda ou diminuição da força física, prurido cutâneo, exantema e petéquias. Sintoma como hepatomegalia dolorosa podem ser manifestados juntamente com o início da febre, porém, raramente acontece. Os sintomas clínicos apresentados pelos pacientes variam muito em frequência dependendo da idade do indivíduo infectado. A duração da doença é de 5 a 7 dias, havendo regressão dos sinais e sintomas a partir do desaparecimento da febre. (BRASIL, 2002).

A dengue hemorrágica ou febre hemorrágica da dengue (FHD) apresenta os mesmos sinais e sintomas iniciais ao da clássica, contudo, as evoluções desses

sintomas podem ocorrer rapidamente para manifestações hemorrágicas, derrames cavitários, instabilidade hemodinâmica e/ou choque. Os sintomas típicos da dengue hemorrágica são febre alta, aumento do tamanho do fígado (hepatomegalia), fenômenos hemorrágicos e insuficiência circulatória, além de trombocitopenia. Nos casos mais graves da doença, o paciente pode entrar em choque por conta da permeabilidade vascular aumentada, hemoconcentração e falência circulatória, podendo ocasionar a morte do indivíduo em 12 a 24 horas se não tratado de forma imediata. (BRASIL, 2002).

Dessa forma, para evitar a disseminação das doenças apresentadas é importante realizar o controle do vetor. Para que isso ocorra de forma efetiva, o controle deve contar com várias alternativas e não um método apenas. Assim, esse controle pode ser realizado através de vigilância e redução das fontes utilizadas pelo mosquito para reprodução e desenvolvimento; por meio de controle biológico, no qual são utilizados diversos predadores, como os aquáticos que se alimentam das larvas e pupas; como o peixe *Gambusia affinis*. Além dos predadores aquáticos, há também as bactérias patógenas, como o *Bacillus thuringiensis israelenses* e *Bacillus sphaericus*; e por fim, o meio de controle químico utilizando inseticidas e/ou repelentes. (BRAGA e VALLE, 2007; GARCEZ et al., 2013).

Devido ao uso persistente dos inseticidas e praguicidas, como por exemplo o temefos e a deltametrina, diversas espécies de insetos, incluindo o *A. aegypti*, adquiriram mecanismos de defesa para sobreviverem aos controles químicos, ocorrendo então a queda da eficácia dos inseticidas. (BRAGA e VALLE, 2007; GARCEZ et al., 2013, VALLE et al., 2019). Essa resistência adquirida se deve principalmente às enzimas que estão associadas ao metabolismo oxidativo, principalmente as monooxigenases que se encontram aumentadas. As enzimas das monooxigenases estão em maior concentração no intestino, túbulos de Malpighi e corpo gorduroso, sendo elas as estruturas mais evidentes no processo de resistência a inseticidas. (BRAGA e VALLE, 2007). Outro ponto discutido a respeito sobre o método químico de controle dos insetos, é que além de atingirem os vetores das doenças como o *A. aegypti*, eles também acabam agindo sobre a fauna e a flora do local no qual foi aplicado, causando grande impacto e poluição ao meio ambiente. Com isso, surge a necessidade de desenvolvimento de produtos com habilidades inseticidas que não agridam tanto a fauna e a flora local, mas que ao mesmo tempo sejam eficazes no controle desses vetores de doenças. (GARCEZ et al., 2013;

TABANCA et al., 2013).

2.1.4 Intestino dos mosquitos

O intestino médio do mosquito se apresenta como um importante órgão quanto a aspectos biológicos dos insetos. Ele é responsável por atuar nos procedimentos fisiológicos do animal, está relacionado como porta de entrada para a reprodução e transmissão de patógenos, apresentando uma importante função na susceptibilidade à infecção quando os insetos se tornam adultos. (MIRANDA, 2019). No intestino médio, também são encontradas em maiores concentrações as enzimas das monooxigenases responsáveis pelo metabolismo oxidativo, sendo responsável por inibir e reduzir possíveis danos causados ao inseto principalmente pela ação de radicais livres. (BRAGA e VALLE, 2007; BARBOSA et al., 2010).

O intestino médio das larvas do *A. aegypti*, é formado por um tubo ou ventrículo que abrange praticamente toda a região do órgão, sendo denominada ceco gástrico, havendo projeções em sua região inicial em formato de sacos. Já o tubo ou ventrículo, por sua vez, é dividido em intestino médio anterior e intestino médio posterior. (GODOY, 2019).

Histologicamente o intestino médio é constituído por um epitélio colunar simples, apresenta duas camadas de tecidos musculares responsáveis pelo movimento peristáltico do órgão. A região do epitélio, constitui-se por três tipos celulares distintos, sendo as células digestivas, de formato colunar apresentando microvilosidades na sua parte superior; as células regenerativas ou células-tronco, indiferenciadas, pequenas, com ausência de grânulos de secreção no citoplasma e citoplasma eletrodense que atuam na renovação do epitélio e são encontradas entre células digestivas na região mais basal do epitélio. E por fim, encontra-se também as células enteroendócrinas, situadas na parte basal do epitélio do intestino médio posterior, podendo estar ao lado das células regenerativas, tendo sua quantidade variável conforme o animal desenvolve. (GODOY, 2019; MIRANDA, 2019).

2.2 LOURO (*Laurus nobilis* L.)

Laurus nobilis L., popularmente conhecido como louro, pertence ao grupo das *Lauraceae*. Apesar de possuir como origem a Ásia Menor, é uma planta que se adaptou no solo e clima brasileiro. (EMBRAPA, 2007).

O louro apresenta como características ser uma árvore ou arvoreta

podendo chegar a seus 15 metros de altura, apresenta folhas durante todo o ano, sendo considerada assim como perenifolia e os ramos são dispostos de forma ereta (Figura 4). (EMBRAPA, 2007).



Fonte: Própria autoria

Figura 4 – Árvore do louro (*Laurus nobilis* L.)

Esta planta aromática é muito utilizada como condimento e também apresenta ações medicinais. Segundo Santos e Coelho (2013) estudos fitoquímicos do louro identificaram em seu óleo essencial metabólitos secundários como eugenol, linalool, sabineno, limoneno, pineno, cineol, geraniol e canfeno. Esses metabólitos são responsáveis por desenvolver várias atividades biológicas na planta, como defesa e proteção contra insetos, predadores, entre outros e podem apresentar várias atividades medicinais. (MILLEZI et al., 2012).

O óleo essencial (OE) do *Laurus nobilis* L. apresentam atividade antibacteriana, devido à presença dos compostos voláteis. Esses, por sua vez, apresentam características fenólicas e terpênicas podendo possuir ação em vários sítios bioquímicos presentes nos microrganismos, bloqueando assim, diversos fatores essenciais para eles. (PEREIRA, OLIVEIRA, COUTO, 2014). Ele tem se mostrado inibidor contra *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, sendo o 1,8-cineol como principal responsável pela ação antibacteriana. (SILVEIRA, 2012).

Dessa forma, as plantas medicinais e seus produtos apresentam-se como uma grande alternativa para produção de diversos produtos, incluindo os inseticidas não-convencionais, à base de produtos naturais, por serem consideradas grandes fontes de metabólitos ativos com diferentes atividades biológicas na planta. (GARCEZ et al., 2013).

Assim, escolheu-se o óleo essencial do louro, para analisar sua ação larvicida sobre larvas de *A. aegypti*, o que seria de grande valia para o controle de larvas e insetos de modo a não agredir a fauna e flora ao redor do ambiente onde o óleo for aplicado como inseticida natural.

3 OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Estabelecer os mecanismos larvicidas da ação do óleo essencial de *Laurus nobilis* L. (louro).

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1) Analisar a sobrevivência desde a fase larval até a fase adulta frente à diferentes concentrações do óleo essencial

2) Avaliar alterações histológicas presentes no intestino médio posterior das larvas L3 de *A. aegypti* após serem expostas ao óleo essencial.

3) Avaliar os marcadores do estresse oxidativo nas larvas após serem expostas ao óleo de louro.

4) Analisar vias de sinalização através de imunofluorescência que possivelmente foram ativadas e/ou suprimidas nas larvas quando expostas ao óleo essencial.

4 METODOLOGIA

4.1 PROCEDIMENTOS E TÉCNICAS DE COLETA DOS DADOS

4.1.1 Óleo essencial

O óleo essencial de louro (*Laurus nobilis* L.), foi obtido comercialmente pela Harmonie Aroma Terapia Eireli (Florianópolis, SC, Brasil). Diferentes diluições do óleo essencial foram obtidas após a diluição do mesmo em solução de Tween 20 conforme Mann e Markham, 1997 com modificações, sendo elas 1:1.000, 1:2.500, 1:5.000, 1:7.500, 1:10.000 e 1:100.000.

4.1.2 Sobrevivência

Foram selecionadas 20 larvas (L3) de *A. aegypti* (PP-Campus, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil), obtidas de colônias mantidas no insetário do Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa (UFV), para cada concentração acima descrita. Posteriormente, transferiu-se as larvas para uma placa de 12 poços, sendo distribuídas 5 larvas em cada poço, onde foi adicionado 5 mL da solução de diluição do óleo, conforme descrito anteriormente. A placa foi incubada a 25 ± 5 °C por 24 horas em fotoperíodo de 12 h (claro/escuro). (WHO, 2005). Afim de analisar se ocorreu morte de alguma larva ou transformação em pupa, realizou-se uma contagem de verificação diária. Ao se transformar em pupa, as mesmas foram transferidas para uma gaiola para que os adultos gerados ficassem aprisionados. Tanto as pupas e os adultos da gaiola também foram vistoriados diariamente de modo a contar se todos estavam vivos ou se algum havia morrido. Após todas as pupas originarem adultos, as gaiolas foram fechadas e analisadas diariamente por mais 10 dias para conferir a sobrevivência dos adultos.

4.1.3 Morfologia

Cerca de 200 larvas (L3) de *A. aegypti* (PP-Campus, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil), obtidas de colônias mantidas no insetário do Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa (UFV) foram selecionadas. Transferiu-se as larvas para um recipiente de 250 mL contendo os 200 mL da solução do óleo essencial diluída 1:10.000 em solução de Tween 20, e o recipiente foi incubado a 25 ± 5 °C por 24 horas em fotoperíodo de 12 h (claro/escuro).

(WHO, 2005). Para o controle negativo com a solução de Tween 20, foi utilizado o mesmo número de larvas e quantidade de solução. Após este período, foram coletadas 6 larvas da exposição do óleo e 6 larvas do controle e transferidas para eppendorfs contendo solução fixadora Zamboni (2% de paraformaldeído contendo 15% de ácido pícrico em 0,1 M de tampão de fosfato de sódio) por 2 h em temperatura ambiente (± 24 °C). Posteriormente, seguiu com a desidratação em soluções ascendentes de etanol (70%, 80%, 90% e 100%) e inclusão em Historesin (Leica, Heidelberg, Alemanha). Os blocos histológicos foram seccionados (3 μ m de espessura) e corados com hematoxilina e eosina (HE). Para montagem das lâminas para análise, foi utilizado Eukitt (Fluka, Darmstadt, Alemanha) e as lâminas foram analisadas e fotografadas por microscopia de luz Olympus BX-53, acoplado a uma câmera digital Olympus DP 73 (Olympus Optical Corp., Tóquio, Japão).

4.1.4 Imunofluorescência

A técnica de Imunofluorescência realizada foi a de dupla marcação. Para isso, foram coletadas 36 larvas da exposição com o óleo (1:10.000), conforme descrito anteriormente, e o mesmo número de larvas foi retirado da exposição feita para o controle. As larvas foram dessecadas de modo a coletar o intestino médio das mesmas. Os intestinos médios que continham alimentos foram esvaziados e posteriormente distribuídos em eppendorfs contendo fixador Zamboni seguindo o tempo como descrito anteriormente e então lavados duas vezes com tampão salino de fosfato de sódio (PBS 0,1 M, pH 7,2) por 15 min para cada lavagem e depois lavados mais três vezes com solução de PBST (tampão salino de fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,2 acrescido com Triton X-100 1%, 30 min/lavagem).

Após as lavagens com PBST foram adicionadas, em cada eppendorf, soluções dos anticorpos primários (coelho, policlonal): anti-fosfohistona H3 (PH3) (Cell Signaling Technology, Inc., Beverly, MA, EUA), diluição 1:100; anti-FMRF-amida (Peninsula Laboratories, Inc., San Carlos, CA, EUA), diluição 1:500; anti-caspase 3 clivada (Cell Signaling Technology, Inc., Beverly, MA, USA), diluição 1:500; anti-Notch1 (Cell Signaling Technology, Inc., Beverly, MA, USA), diluição 1:200; p-ERK1/2 (Cell Signaling Technology, Inc., Beverly, MA, USA), diluição 1:200; anti-LC3 (Cell Signaling Thechnology Inc., Beverly, MA, EUA; produzido em coelho), diluição 1:500, com incubação por 24 horas a 4 °C. As amostras foram então lavadas com PBS três vezes por 10 min cada e em seguida, foram adicionadas as soluções dos seguintes

anticorpos primários (mouse): anti-Prospero (Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB), Iowa City, IA, EUA), diluição 1:400; anti- p-SAPK/JNK (Cell Signaling Technology, Inc., Beverly, MA, USA), diluição 1:200; anti-Delta (Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB), Iowa City, IA, EUA), 1:400; anti-Armadillo (Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB), Iowa City, IA, USA), diluição 1:400; anti-Caderina (Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB), Iowa City, IA, EUA), diluição 1:400; anti-Wingless (Wg) (Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB), Iowa City, IA, EUA), diluição 1:400 e incubados por 24 horas a 4 °C. Passado o tempo de incubação, todas as amostras foram lavadas novamente três vezes por 10 min com PBS, e então foi adicionado anticorpo secundário FITC (Sigma-Aldrich Corp., St Louis, MO, USA) diluído 1:500 em 0.1 M PBS, incubado por 24 horas a 4 °C. Após o período de 24 horas, realizou-se uma nova lavagem com PBS de 15 min e então foi adicionado a solução do segundo anticorpo secundário: TRITC (Thermo Fisher-Scientific, Waltham, Mass., EUA) diluído 1:500 em 0.1 M PBS, seguido de nova incubação por 24 horas a 4 °C. Depois foram realizadas três lavagens de 10 min com PBS e então 0,5 µg/mL de 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Biotium, Inc., Hayward, CA, EUA) foi adicionado em cada eppendorf ficando *overnight*. Após esse procedimento, as lâminas para análise foram montadas com solução de mowiol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) e analisadas no microscópio de fluorescência Evos M5000 (Thermo Fisher Scientific, Carls-bad, CA, USA).

4.1.5 Estresse oxidativo

Para avaliação do estresse oxidativo, foram coletados 6 eppendorfs com 5 larvas expostas ao óleo essencial e 6 eppendorfs com 5 larvas incubadas com Tween 20 (controle), como descrito anteriormente. Após coletadas, as amostras foram congeladas imediatamente em nitrogênio líquido e armazenadas em -80 °C. Realizou-se um homogenato simples das larvas utilizando 300 µL tampão fosfato de sódio (PBS), 50 mM pH 7,4. Após centrifugação a 10.000 rpm a 4 °C por 10 min, o sobrenadante foi coletado e utilizado para as análises de SOD, CAT, GST, MDA, proteína carbonilada, NO e proteína total. Para a leitura das amostras foram utilizados espectrofotômetro ou leitor de ELISA.

4.1.5.1 CAT

A determinação da atividade de catalase (CAT) foi realizada conforme

descrito por Aebi (1984). Preparou-se os reagentes que foram utilizados para o teste, sendo eles tampão fosfato (50 mM, pH 7,4), molibdato de amônia (32,4 mmol/L) e o peróxido de hidrogênio (20 mM) que foi preparado apenas no momento da pipetagem para evitar sua decomposição. Na placa de 96 poços, na coluna 1, fez-se a curva com 100 µL de peróxido de hidrogênio no ponto A (primeiro poço da coluna 1), e a partir do segundo ponto da curva (B), adicionou-se aos 100 µL de peróxido, 100 µL de tampão fosfato e prosseguiu com diluição seriada até o ponto G e no último ponto da curva (H), último poço da placa, adicionou-se apenas o tampão. Para cada ponto de teste realizado, foi feito um ponto branco, dessa forma, 10 µL de amostra foram pipetados para o teste e 10 µL de amostra para o branco. Às amostras, foram adicionados 100 µL de peróxido de hidrogênio, já no branco, adicionou-se 100 µL de tampão. Cronometrou-se 3 min e então adicionou 150 µL de molibdato em todos os poços, incluindo a curva e branco, finalizando com a leitura em leitor de Elisa a 374 nm.

4.1.5.2 GST

A atividade da Glutathione S-transferase (GST) foi conduzida de acordo com Habig et al. (1974). Preparou-se as soluções de CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno) 0,1M em etanol (20,3 mg/mL) e GSH 0,1M em tampão (30,7 mg/mL). Primeiramente foi realizado a mensuração do branco no espectrofotômetro utilizando 500 µL de PBS. Toda as leituras foram realizadas com comprimento de onda a 340 nm. Para a realização do branco do teste, pipetou-se em uma cubeta de quartzo 5 µL da solução de CDNB, 490 µL de PBS e 5 µL de solução de GSH, homogeneizou e realizou a mensuração dos resultados nos tempos de 30 s e 90 s. Com o espectrofotômetro devidamente zerado, foram feitas as análises das amostras, sendo a leitura realizada também nos tempos de 30 s e 90 s. Para a reação de análise das amostras, foram utilizados 5 µL de solução de CDNB, 480 µL de PBS, 5 µL de GSH e 10 µL de amostra, homogeneizou e então realizou-se a leitura em 340 nm. Esse procedimento foi feito repetidamente para cada amostra.

4.1.5.3 SOD

Para determinar a atividade de SOD, foi utilizado o método de Dieterich et al. (2000). Foram preparados os tampões fosfatos com pH 5,4 (0,1 M) e pH 7,8 (0,1 M). Para a preparação do pirogallol, utilizou-se 1mg do pirogallol que foi diluído em 1

mL do tampão fosfato de pH 5,4. Dessa solução concentrada pirogalol, foram retirados 125 µL e então diluído em 875 µL do tampão fosfato pH 5,4. Para fazer a curva, pipetou-se 10 µL de PBS, 170 µL de tampão fosfato pH 7,8, repetiu esse procedimento nos poços A – D da coluna 1 da placa de 96 poços. Para o teste, foram pipetados 10 µL de amostra nos poços a partir da coluna 2, foram adicionados 170 µL de tampão pH 7,8 em todos os poços. Levou-se para o leitor de Elisa e leu a 320 nm, após isso, 20 µL da solução diluída de pirogalol foram pipetados em todos os poços (incluindo o padrão) e a placa incubada logo em seguida por 30 min ao abrigo da luz. Feito isso, foi realizada nova leitura a 320 nm.

4.1.5.4 MDA

Já para a determinação do malondialdeído (MDA), foi realizado o protocolo conforme descrito por Buege e Aust (1978). Para identificação do malondialdeído, utilizou-se a solução de TBARS. A 50 µL da amostra foram adicionados 100 µL da solução de TBARS previamente preparada, seguida de agitação em vórtex por cerca de 10 segundos e logo após todos foram incubados a 90 °C onde permaneceram por 40 min. Após isso, as amostras ficaram por 5 min em temperatura ambiente para resfriamento e então 150 µL de n-butanol foram adicionados, seguido de nova agitação utilizando-se o vórtex. As amostras foram centrifugadas por 5 min a 3.500 rpm e o sobrenadante foi transferido para uma placa de 96 poços e a absorbância foi determinada leitor de Elisa a 535 nm.

4.1.5.5 PROTEÍNA CARBONILADA

A determinação da proteína carbonilada foi realizada usando o DNPH (2,4-dinitrofenilhidrazina) conforme Levine et al. (1994). Foram utilizados 100 µL do sobrenadante do homogenato para realizar o teste. Utilizou-se 50 µL para o teste e 50 µL para o branco. Na amostra para o teste, foram adicionados 250 µL de DNPH, já no branco 250 µL de HCl, incubando por 1 hora e então, foi adicionado 250 µL de TCA 10% tanto na amostra quanto no branco, centrifugou por 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e então adicionado 250 µL de acetato de etila, centrifugou novamente e o sobrenadante foi descartado. Por fim, adicionou-se 250 µL de SDS 6% e centrifugou por 10 min a 4 °C. Pipetou-se 200 µL do teste e 200 µL do branco em uma placa de 96 poços e foi realizado a leitura em leitor de Elisa a 320 nm.

4.1.5.6 *PROTEÍNA TOTAL*

Para a determinação de proteína total, foi utilizado o reagente Bradford, conforme Kruger (2009). Para a curva, pipetou-se, na primeira coluna no ponto A, 10 μL do padrão de BSA 1 mg/mL, e no ponto B, 10 μL do padrão mais 10 μL de PBS seguindo com diluição seriada até o ponto G e no último ponto da curva (H), apenas 10 μL de PBS. Para o teste, foram pipetados 10 μL de amostra a partir da coluna 2 e posteriormente, foram adicionados 150 μL de reagente Bradford em todos os poços, incluindo a curva e finalizando com a leitura em 595 nm em leitor de Elisa.

4.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram avaliados estatisticamente por meio da análise de ANOVA para os testes de imunofluorescência e utilizando o teste t para análise do estresse oxidativo dos grupos tratados e controles, ambos os testes estatísticos foram realizados utilizando o software GraphPad Prism 6.0.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 SOBREVIVÊNCIA

O tratamento realizado com o óleo essencial de louro afetou a sobrevivência das larvas (L3) de *Aedes aegypti*. Os tratamentos nas diluições de 1:1.000 e 1:2.500 mataram 100% das larvas com pouco menos de 5 e 15 minutos de exposição, respectivamente. A diluição de 1:7.500, ocasionou a morte de 90% das larvas em 6 dias após a exposição ao óleo essencial de louro. A diluição de 1:10.000 apresentou 70% de letalidade após 6 dias de exposição, como mostra o gráfico 1. Já a diluição de 1:100.000 teve uma letalidade de 25% sobre as larvas depois de 10 dias da exposição. Os controles de água destilada e Tween 20 não interferiram de modo significativo na mortalidade das larvas, tendo respectivamente 5% e 10% de letalidade em um período de 9 dias após a exposição.

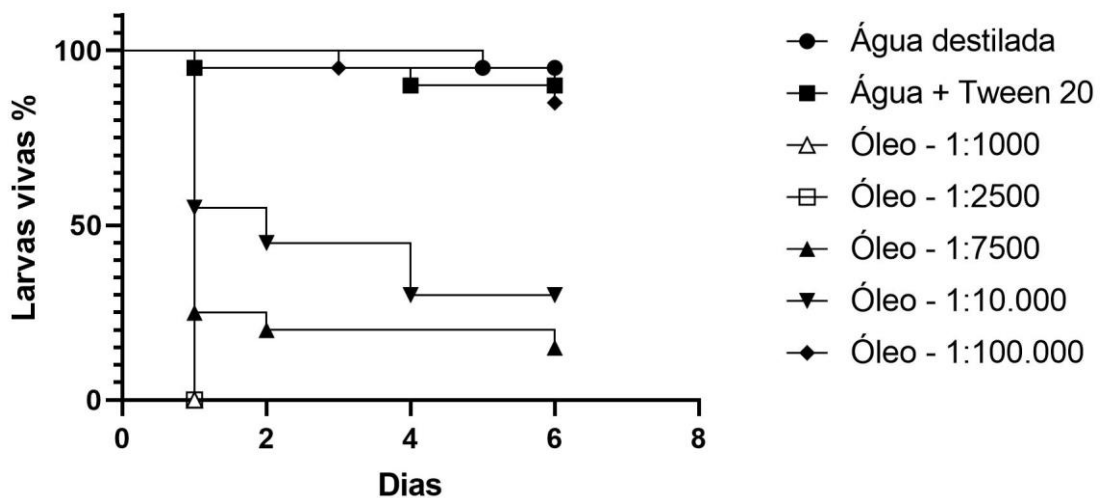


Figura 5 – Sobrevivência das larvas de *Aedes aegypti* após exposição à diferentes diluições do óleo essencial de louro. As larvas L3 de *A. aegypti* foram expostas a diferentes diluições do óleo essencial de louro diluído em solução de Tween 20 por 24 horas. Após esse período retirou-se as soluções do óleo e colocou-se água deionizada (procedimento esse realizado diariamente). O experimento foi checado diariamente a fim de se fazer um controle sobre a letalidade das larvas e também para analisar a metamorfose das mesmas.

Dessa forma, com os resultados obtidos, observa-se a bioatividade larvicida do OE de louro, o que vai de encontro com os resultados apresentados conforme os estudos de Fernandez e colaboradores (2018) que analisaram a ação do

óleo de *Laurus nobilis* L. extraído em diferentes estações do ano sobre as larvas de *A. aegypti*. Segundo ainda Fernandez e colaboradores (2018), o constituinte do OE essencial apontado como responsável pelo efeito larvicida é o linanool, principalmente se coletado na primavera, pois as concentrações dos metabólitos secundários que constituem o óleo essencial podem diferir dependendo da estação do ano, solo e local de quando foi coletado e extraído.

Após se transformarem em adultos e passados os 10 dias de observação sobre a vitalidade dos mosquitos, observou-se que não ocorreu morte de nenhum indivíduo adulto em nenhuma concentração até o último dia de observação como mostra a figura 6.

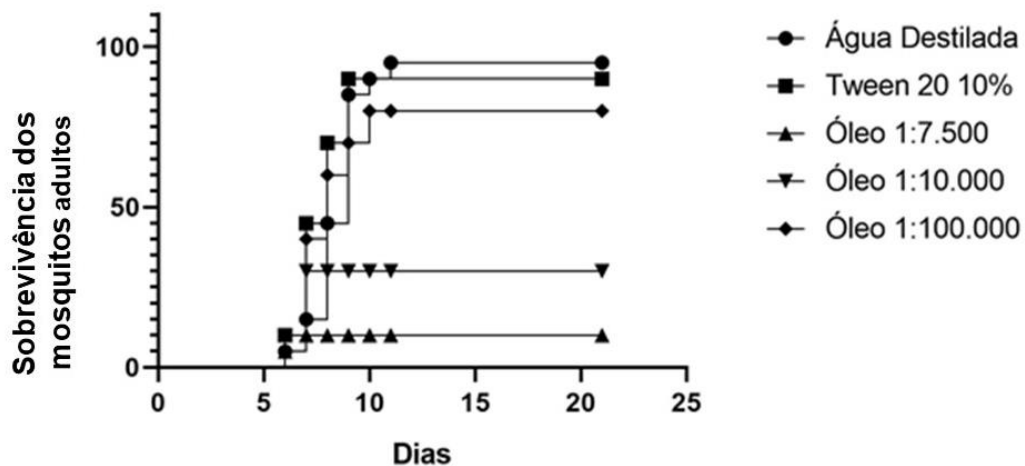


Figura 6 – Sobrevivência de mosquitos adultos. Das larvas expostas viáveis, ao decorrer da transformação para pupa, as mesmas eram transferidas para gaiolas de modo que ao se transformarem em adultos, os mesmos ficassem aprisionados de modo a facilitar a observação. Ao se transformar em adultos as gaiolas também foram analisadas durante 10 dias de modo a acompanhar a sobrevivência dos indivíduos adultos. Ocorreu uma tendência das larvas expostas ao óleo essencial se desenvolverem um pouco mais rápido do que os controles.

Porém, percebeu-se que as gaiolas que continham as larvas expostas ao óleo, a transformação para a fase adulta foi ligeiramente mais rápida se comparada com os controles. Isso pode ter ocorrido devido ao desenvolvimento de um mecanismo seletivo, que segundo Natal (2002) é a rápida mudança das fases imaturas para chegar a fase adulta, sendo uma forma de garantir um aumento na produtividade, e tentar manter a reprodução da espécie. Para os demais testes,

utilizou-se a diluição 1:10.000 do óleo essencial (0,08870 mg/mL), pois das diluições que causaram letalidade significativa nas larvas, essa foi a que mais se aproximou da concentração letal capaz de matar 50% dos indivíduos ($CL_{50} = 0,1226$ mg/mL).

4.2 ALTERAÇÃO DA MORFOLOGIA DO INTESTINO MÉDIO DAS LARVAS DE *A. AEGYPTI* APÓS EXPOSIÇÃO AO ÓLEO DE LOURO

Após a exposição das larvas a solução do OE por 24 horas, os resultados das análises histológicas do controle (figura 7A), mantiveram inalteradas apresentando um epitélio simples com presença de núcleos evidentes, sem rupturas e com presença de uma generosa borda estriada em toda a extensão do intestino, o que vai de encontro com os resultados obtidos por Narciso et al. (2014) no controle negativo.

Ao analisar as lâminas do grupo tratado, notou-se que o óleo essencial de louro afetou a histologia do intestino médio das larvas expostas a ele. Como alterações histológicas encontradas nos 24 cortes, pode-se citar vacuolização das células do epitélio (fig. 7B, C, D), em grande parte da sua extensão, notou-se ausência de borda estriada (fig. 7B, C, D, E), destruição celular (figura 7E), desorganização do tecido epitelial com presença de espaços entre as suas células constituintes, pontos de ruptura do epitélio (fig. 7E), conforme mostrado na figura 7.

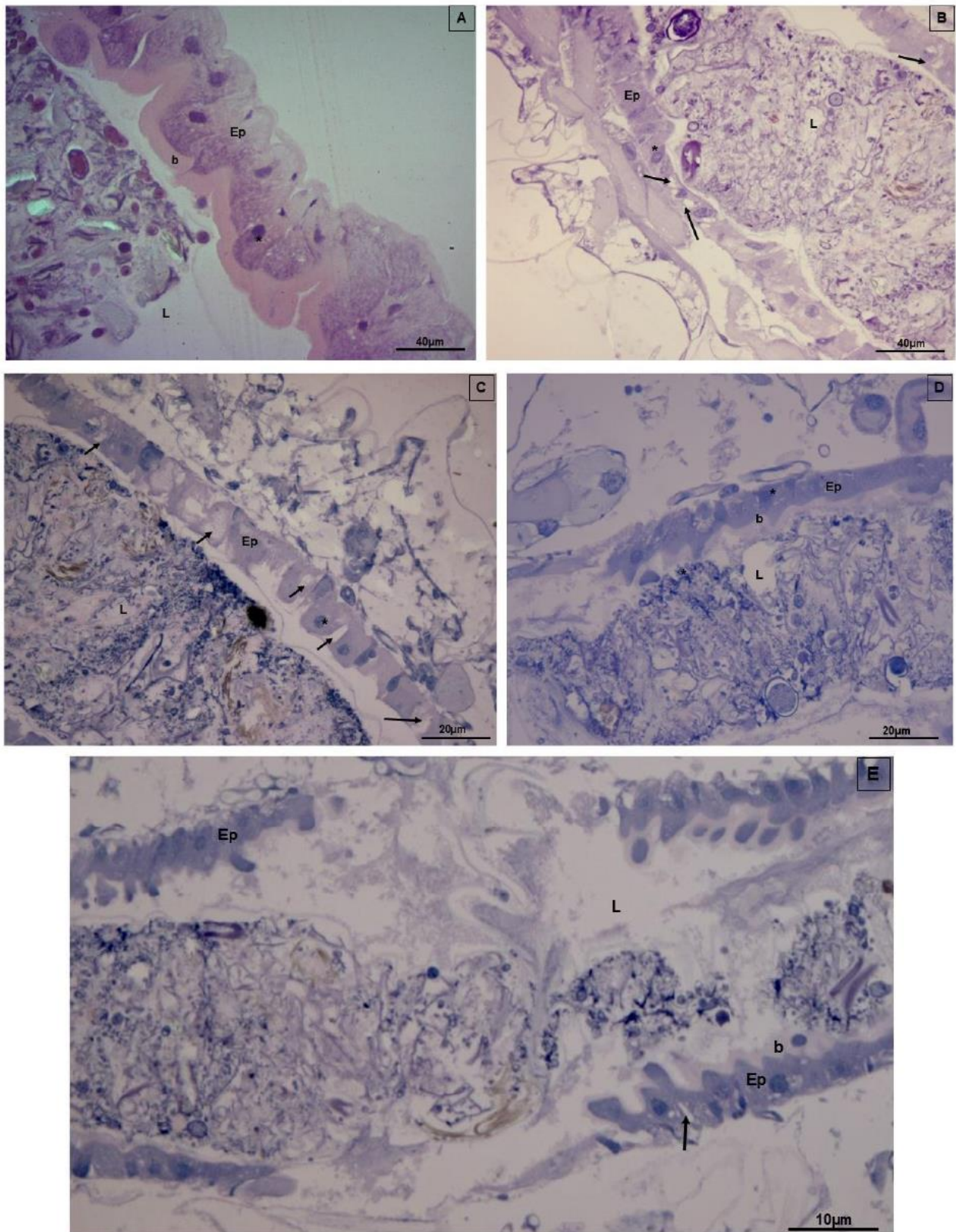


Figura 7 – Cortes histológicos do intestino médio de larvas de *Aedes aegypti*. Ep: Epitélio; b: borda estriada; L: lúmen; setas: vacúolos; Asterisco: núcleo celular. A: Controle (aumento de 40x). Pode-se observar um epitélio organizado, sem vacúolos nas células do epitélio; apresenta bordas estriadas bem evidentes e sem ruptura epitelial. B (aumento de 40x), C (aumento de 20x), D

(aumento de 20x) e E (aumento de 10x): Intestino de larvas expostas ao óleo por 24 horas. Nessas imagens, pode-se observar claramente o dano causado pelo óleo. No epitélio celular nota-se uma desorganização do mesmo com a presença de inúmeros vacúolos celulares (**B**, **D** e **E**), ruptura do epitélio (**C** e **E**) e ausência de borda estriada na grande maioria dos intestinos. Notou-se restos de alimentos no lúmen de todos os intestinos expostos ao óleo e também no controle.

As alterações encontradas no presente trabalho vão de encontro com os achados de Narciso et al. (2014) que analisaram a ação de diferentes concentrações do Burchellin, – sendo as concentrações 15,5 ppm (50% de letalidade) e 30 ppm (100% de letalidade) –, um composto isolado da planta *O. cymbaru* pertencentes à mesma família do louro (*Lauraceae*), frente a larvas de *A. aegypti*, indicando que a família *Lauraceae* apresenta princípios bioativos com potenciais contra insetos. De acordo com Snodgrass (1935), as células digestivas do intestino do inseto podem estar associadas nos processos de absorção e secreção de substâncias e essa desintegração celular pode ocorrer devido ao acúmulo de material nas células. Essas alterações histológicas encontradas, ajudam a entender um pouco mais sobre o como o óleo atua nas larvas de *A. aegypti*, tendo como resultado desordem e desagregação tecidual impedindo a sobrevivência da larva.

4.3 EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DE LOURO NO ESTRESSE OXIDATIVO

As análises do estresse oxidativo foram realizadas nos tempos de 6 horas e 24 horas após a exposição ao óleo essencial para tentar entender como o óleo age sobre as larvas e como as enzimas e marcadores do estresse oxidativo se comportam ao decorrer do tempo. O resultado da análise de proteína total realizada com o reagente de Bradford, foi utilizada para determinar a concentração total de proteínas na solução e seu resultado foi subtraído nos cálculos das demais proteínas de modo a eliminar possíveis interferência nos valores dos demais testes. Dessa forma, percebeu-se que ocorreu um aumento na atividade das enzimas do estresse oxidativo principalmente no tempo de 24 horas. Houve um aumento significativo nas enzimas SOD (figura 8A) e CAT (24hs) (figura 8B) do grupo tratado comparando com o grupo tratado de 6hs e com o grupo controle 24hs.

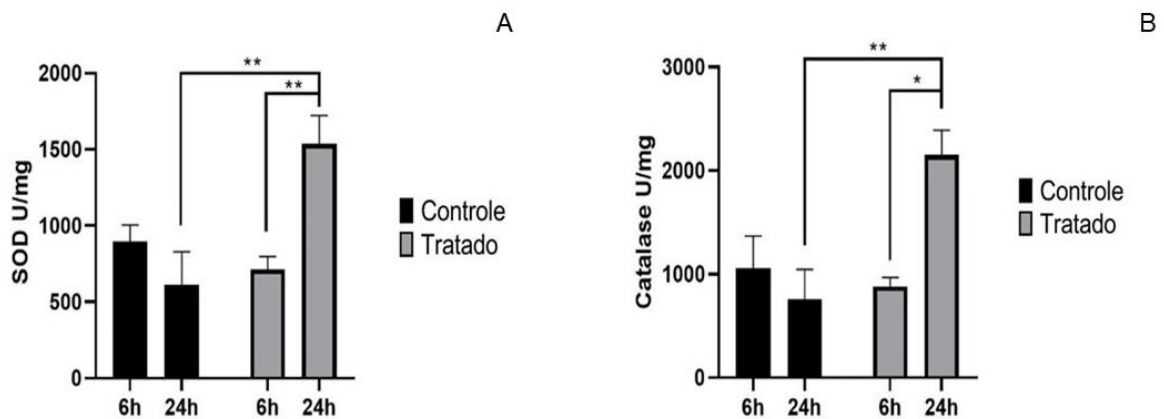


Figura 8 – Efeito do óleo essencial de louro nas atividades das enzimas do estresse oxidativo. A: Superóxido dismutase (SOD); B: Catalase (CAT). Asteriscos denotam diferenças significativas por testes t ($p < 0,05$).

Esse aumento das enzimas pode estar associado ao mecanismo de defesa das larvas, pois além de serem responsáveis por proteger contra radicais livres, segundo Braga e Valle (2007), elas também são marcadores da resistência a inseticidas, ou seja, houve então uma ativação desse mecanismo oxidativo na tentativa agir contra os compostos do óleo, porém não sendo capaz de revertê-lo e manter as larvas vivas.

Já a enzima glutationa-S-transferase também responsável pela catalisação da reação de redução do H_2O_2 a H_2O , diferentemente das outras enzimas, SOD e CAT, mostrou uma diferença significativa entre os grupos controles (figura 9), sendo aumentada no grupo controle (24hs). Esse aumento de atividade da enzima GST no grupo controle pode ter diversos motivos, como quantidade de alimento, luminosidade, entre outros, mas não sendo os mesmos suficientes para ocasionar a morte das larvas do grupo controle, uma vez que possivelmente a ação da GST foi precisa em reduzir o estresse oxidativo dessas larvas, uma vez que só essa enzima se apresentou alterada entre o grupo dos controles. O GST também se mostrou alterado entre o grupo tratado de 24hs quando comparado com o grupo de 6hs. O resultado encontrado ao analisar o GST no grupo tratado vai de encontro com os resultados obtidos do grupo tratado por Fader-Gomes e colaboradores (2021) que expuseram abelhas ao inseticida fipronil (nas concentrações 1; 0,6; 0,3 e 0,1 ng a.i. μL^{-1}) por 24 horas.

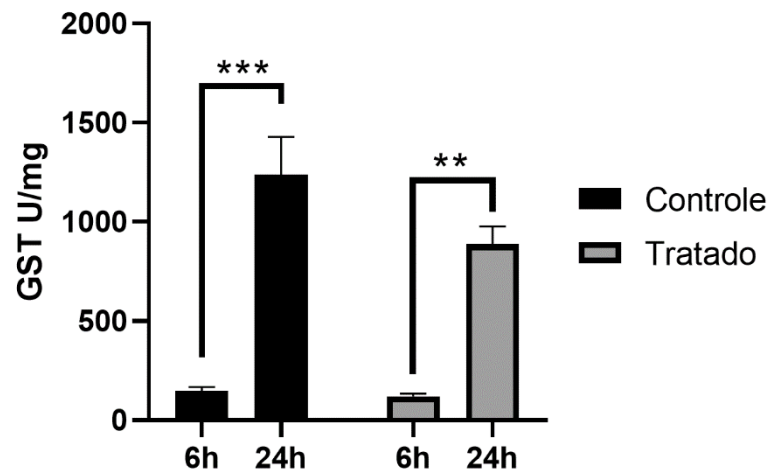


Figura 9 – Efeito do óleo essencial de louro na atividade da enzima Glutathiona-S-transferase (GST). Asteriscos denotam diferenças significativas por testes t ($p < 0,05$).

Percebeu-se também uma diferença significativa no grupo tratado entre os tempos de 6hs e 24hs relacionado aos marcadores malondialdeído (MDA) e proteína carbonilada quando comparados com o grupo tratado no tempo de 6hs, figuras 10 e 11.

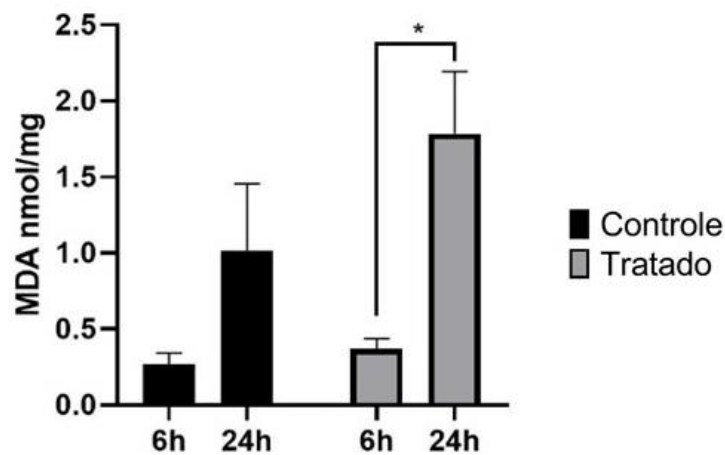


Figura 10 – Efeito do óleo essencial de louro na atividade do marcador de oxidação lipídica malonaldeído (MDA). Asteriscos denotam diferenças significativas por testes t ($p < 0,05$).

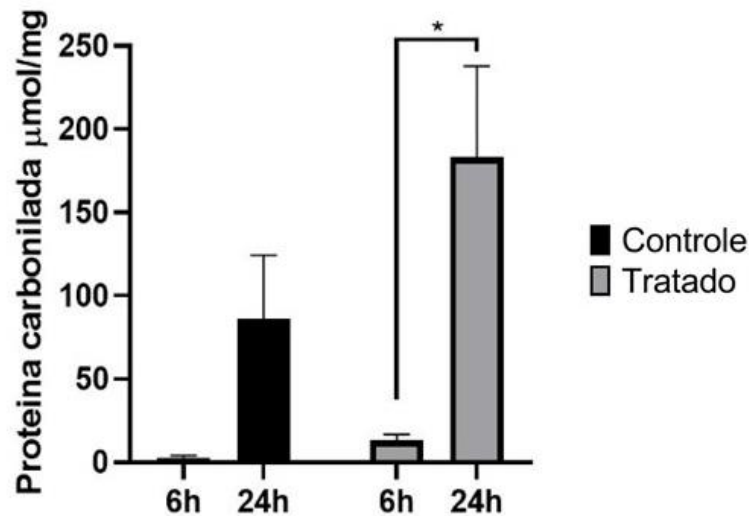


Figura 11 – Efeito do óleo essencial de louro na atividade do marcador de oxidação proteica: proteína carbonilada. Asteriscos denotam diferenças significativas por testes t ($p < 0,05$).

Os resultados vão de encontro com os dados obtidos de Costa et al. (2022) que analisou a indução do estresse oxidativo pelo extrato bruto de *Xylaria sp.* em larvas de *A. aegypti*, obtendo como resultado o aumento das concentrações de MDA e proteína carbonilada nas larvas expostas ao composto. Esses marcadores do estresse oxidativo, são metabólitos específicos produzidos e que podem ser identificados e quantificados quando ocorre uma superprodução de radicais livres ou espécies reativas, onde o mecanismo oxidativo com as moléculas antioxidantes mesmo ativados não conseguem inativar esses radicais. (BARBOSA et al., 2010).

Dessa forma, o MDA é marcador que consegue ser identificado quando ocorre a oxidação de lipídeos, principalmente os ácidos graxos. Já a proteína carbonilada consegue ser identificado quando há oxidação de proteínas, sendo resultado dos radicais livres que agem sobre as cadeias de aminoácidos. (BARBOSA et al., 2010). Conforme Costa et al. (2022), esse aumento de MDA encontrado como resultado da oxidação de lipídeos pode estar associada aos danos causados na membrana celular da larva, também indo de encontro com os achados histológicos desse trabalho.

Percebeu-se então, que ocorreu uma ativação das enzimas CAT, SOD e GST a fim de reverter os danos causados pelo estresse oxidativo promovido pelos compostos do óleo. Apesar de CAT e GST terem o mesmo propósito final, sendo esse o evitar o acúmulo do radical OH no organismo, e ambas terem sido ativadas no grupo

tratado de 24hs, não foi suficiente para reduzir a concentração do mesmo. A hidroxila (OH) é apontada por apresentar um grande potencial reativo e com uma grande instabilidade, sendo apontado como o radical que mais tem capacidade de gerar danos oxidativos no organismo. Entre esses danos pode-se destacar como sendo o principal na peroxidação lipídica, acarretando alterações nas membranas celulares e em suas funções biológicas, o que vai de encontro com os achados histológicos do presente trabalho. (BARBOSA, 2010).

4.4 EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DE LOURO SOBRE VIAS CELULARES RELACIONADAS A SOBREVIVÊNCIA

Os intestinos das larvas expostas ao óleo essencial apresentaram um baixo índice de positividade para PH3, JNK, ERK, Próspero, FMRF e Armadillo após a exposição de 24 hs quando comparado com o grupo controle Tween 20 (T20), mostrando que essas vias não foram ativadas no grupo tratado. Já as células positivas para Casp-3, LC3, encontraram-se aumentadas após as 24 hs de exposição se comparadas com o grupo controle T20, sinalizando que houve uma ativação dessas vias no grupo tratado. Resultados semelhantes foram encontrados por Farder-Gomes e colaboradores (2021), que expôs abelhas ao inseticida fipronil e posteriormente analisou os intestinos médios das mesmas.

A ERK por sua vez, são proteínas com atividades de regulação da proliferação celular, e que também pode estar relacionado com apoptose celular e, no presente trabalho, notou-se que essa via não foi ativada pelas larvas, não corroborando com o encontrado com Farder-Gomes et al. (2021), figura 12.

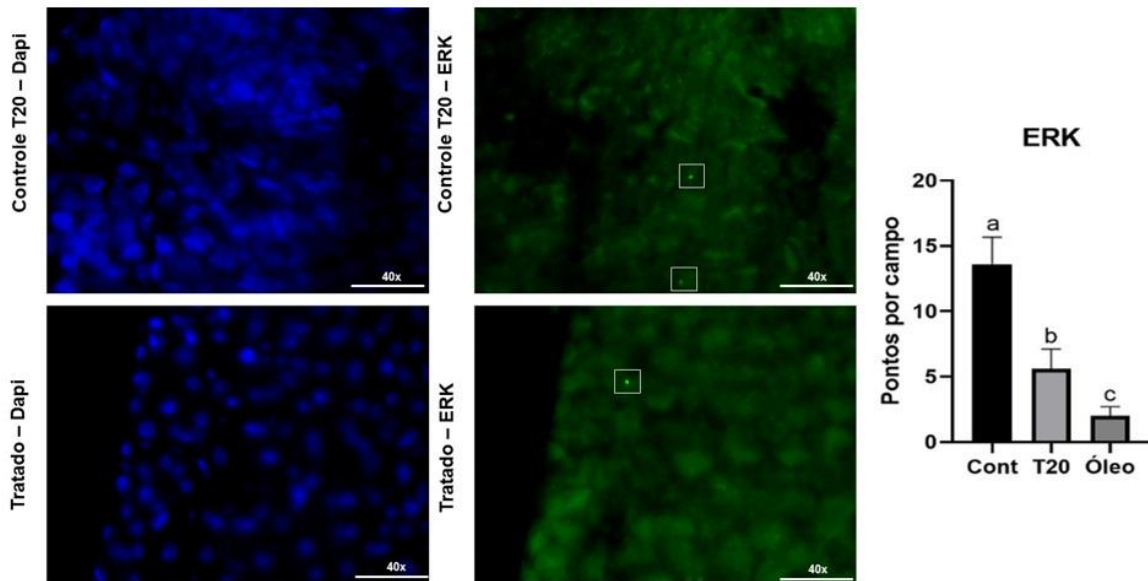


Figura 12 – Imunomarcção para ERK no intestino médio de larvas de *Aedes aegypti*. O Dapi realiza a coloração do núcleo celular. As marcações do ERK encontram-se destacadas na imagem por um quadrado. O número de células positivas para ERK no intestino está sendo retratado no gráfico, onde letras diferentes indicam que ocorreu uma diferença significativa entre os grupos. Imagens no aumento 40x.

Fernandes e colaboradores (2019) também encontraram quantidades reduzidas de células marcadas com PH3 ao expor larvas de *A. aegypti* ao inseticida spinosad. De acordo com os resultados apresentado por esses autores, esse número reduzido pode estar associado à baixa quantidade de células endócrinas no intestino após a exposição, e por essas células endócrinas serem responsáveis por substâncias que ativam a proliferação de células-tronco. Sua baixa concentração implica diretamente nessa proliferação de células tronco no intestino, afetando dessa forma a renovação epitelial do intestino, o que pode justificar também a baixa concentração de ERK do presente trabalho, uma vez que ele é marcador da regulação da proliferação celular.

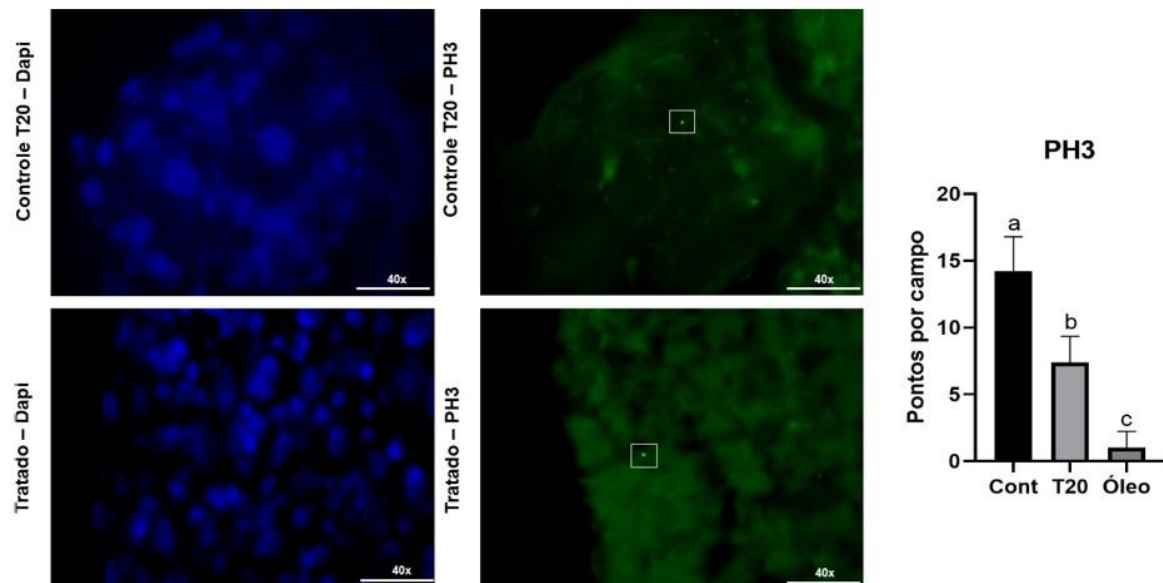


Figura 13 – Imunomarcção para PH3 no intestino médio de larvas de *Aedes aegypti*. O Dapi realiza a coloração do núcleo celular. As marcações do PH3 encontram-se destacadas na imagem por um quadrado. O número de células positivas para PH3 no intestino está sendo retratado no gráfico, onde letras diferentes indicam que ocorreu uma diferença significativa entre os grupos. Imagens no aumento 40x.

A proteína quinase JNK, também foi encontrada em quantidade reduzida (figura 14) nos estudos de Farder-Gomes e colaboradores (2021), que de acordo com os autores, pode estar relacionado ao processo de apoptose por morte celular devido a estresses ambientais. A JNK também foi relacionada com a ativação de genes que expressam citoproteção, assim como uma resposta proliferativa de células tronco intestinais quando ocorre algum tipo de estresse, com isso, os baixos níveis de JNK também implicam sobre essa não reconstituição epitelial após os danos causados pela exposição do óleo por exemplo.

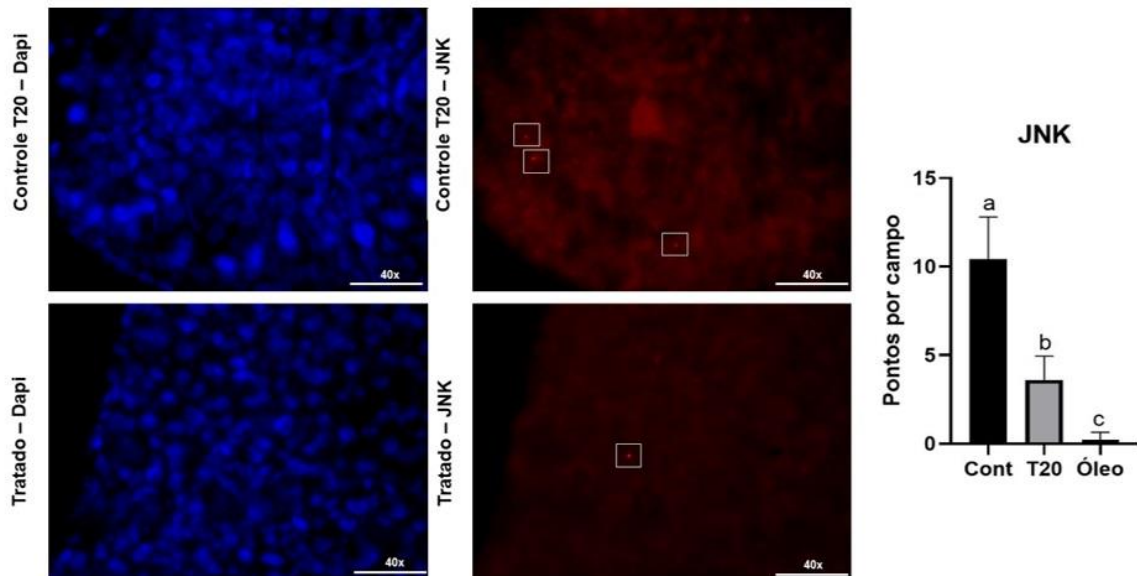


Figura 14 – Imunomarcção para JNK no intestino médio de larvas de *Aedes aegypti*. O Dapi realiza a coloração do núcleo celular. As marcações do JNK encontram-se destacadas na imagem por um quadrado. O número de células positivas para JNK no intestino está sendo retratado no gráfico, onde letras diferentes indicam que ocorreu uma diferença significativa entre os grupos. Imagens no aumento 40x.

Miranda (2019) também obteve como resultado uma redução no número de células positivas para FMRF ao expor larvas de *A. aegypti* a diferentes soluções de borras de café. Conforme descrito, a função apresentada pelas células positivas para FMRF pode-se citar o controle de secreções enzimáticas que atuam na digestão intestinal assim como podem atuar na motilidade do órgão em questão. Com isso, o baixo número dessas células pode acarretar uma homeostase alterada, afetando a remodelação intestinal da larva. (Figura 15).

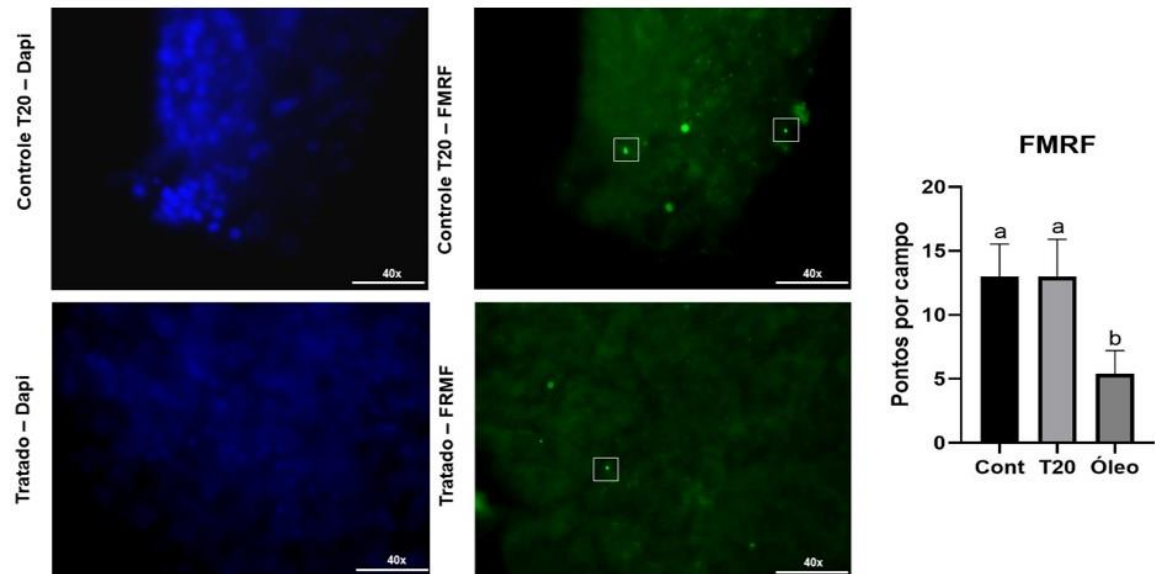


Figura 15 – Imunomarcção para FMRF no intestino médio de larvas de *Aedes aegypti*. O Dapi realiza a coloração do núcleo celular. As marcações do FMRF encontram-se destacadas na imagem por um quadrado. O número de células positivas para FMRF no intestino está sendo retratado no gráfico, onde letras diferentes indicam que ocorreu uma diferença significativa entre os grupos. Imagens no aumento 40x.

As células positivas diminuídas para Armadillo após a exposição ao óleo (figura 16), vai de encontro com os resultados também obtidos por Fader-Gomes e colaboradores (2021), que de acordo com o exposto pelos autores, essa diminuição pode estar relacionada com a falta de sinalização de WNT/Wg, que no presente trabalho se encontra estável não apresentando diferença significativa para o controle (figura 17). Essa falta de sinalização do WNT, levaria a quebra do Armadillo por proteínas quinases, impedindo que ele entre no núcleo celular para ativar o gene-alvo que expressa o WNT, que tem ação relacionada com renovação celular. Desse modo, a redução de Armadillo implica diretamente na quantidade de WNT e justifica a sua concentração estável no momento das análises e também na não regeneração tecidual do epitélio intestinal.

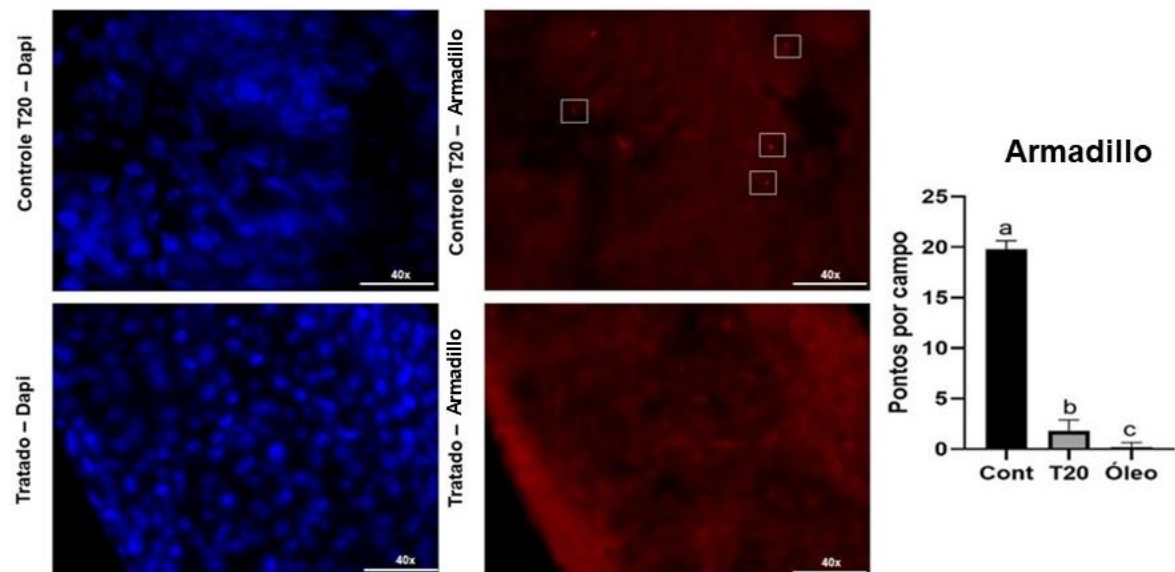


Figura 16 – Imunomarcção para Armadillo no intestino médio de larvas de *Aedes aegypti*. O Dapi realiza a coloração do núcleo celular. As marcações de Armadillo encontram-se destacadas na imagem por um quadrado. O número de células positivas para Armadillo no intestino está sendo retratado no gráfico, onde letras diferentes indicam que ocorreu uma diferença significativa entre os grupos. Imagens no aumento 40x.

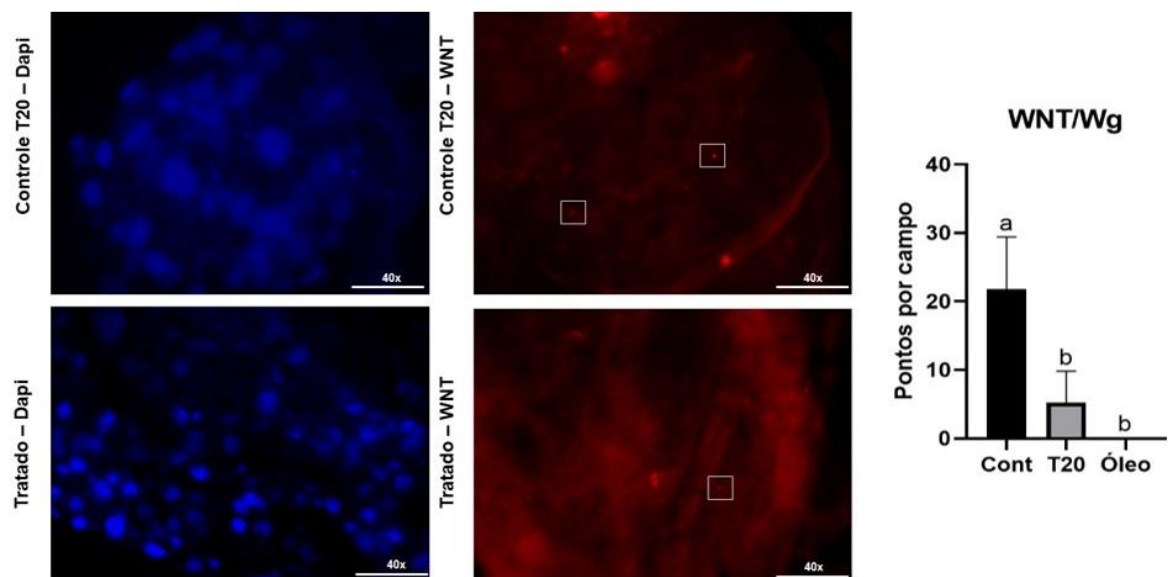


Figura 17 – Imunomarcção para WNT no intestino médio de larvas de *Aedes aegypti*. O Dapi realiza a coloração do núcleo celular. As marcações do WNT encontram-se destacadas na imagem por um quadrado. O número de células positivas para WNT no intestino está sendo retratado no gráfico, onde letras diferentes indicam que ocorreu uma diferença significativa entre os grupos. Imagens no aumento 40x.

Conforme Fader-Gomes (2021), tanto Notch como Prospero apresentam

um papel crucial quando se diz respeito à regulação da auto renovação das células troncos intestinais, assim como na diferenciação. Enquanto Notch atua sobre a diferenciação de células-tronco de células digestivas quando ativado, Prospero age na promoção da diferenciação das células enteroendócrinas. Dessa forma, pode-se dizer que com a baixa concentração de células positivas para Prospero (figura 18), e a quantidade estável de Notch (figura 19) do grupo tratado quando comparado com o controle T20, indicam que as células epiteliais do intestino médio foram afetadas e com isso não foram capazes de realizar a renovação do epitélio como seria esperado quando ocorre uma lesão.

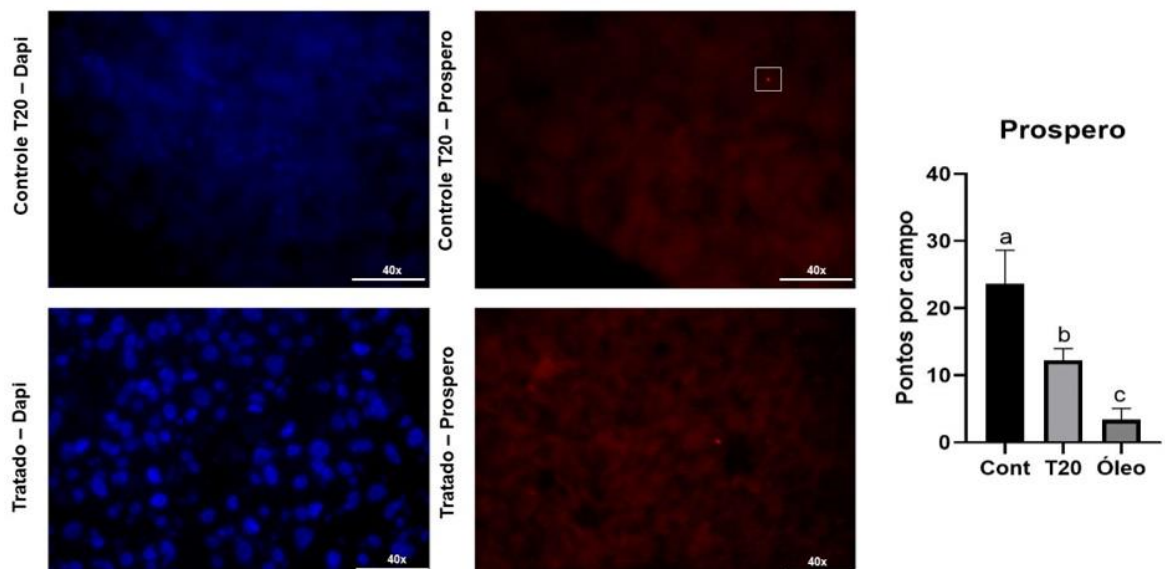


Figura 18 – Imunomarcagem para Prospero no intestino médio de larvas de *Aedes aegypti*. O Dapi realiza a coloração do núcleo celular. As marcações do Prospero encontram-se destacadas na imagem por um quadrado. O número de células positivas para Prospero no intestino está sendo retratado no gráfico, onde letras diferentes indicam que ocorreu uma diferença significativa entre os grupos. Imagens no aumento 40x.

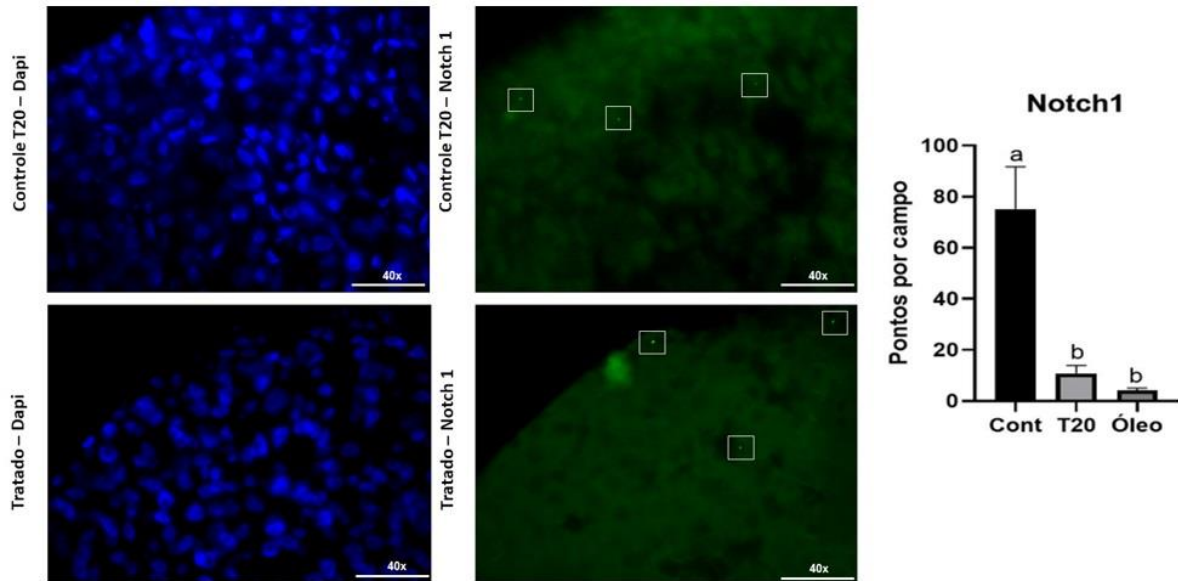


Figura 19 – Imunomarcação para Notch1 no intestino médio de larvas de *Aedes aegypti*. O Dapi realiza a coloração do núcleo celular. As marcações do Notch1 encontram-se destacadas na imagem por um quadrado. O número de células positivas para Notch1 no intestino está sendo retratado no gráfico, onde letras diferentes indicam que ocorreu uma diferença significativa entre os grupos. Imagens no aumento 40x.

Delta assim como Notch1, não mostrou uma diferença significativa entre o grupo tratado e o grupo controle T20 (figura 20). Segundo Bardot et al. (2004), Delta também é uma proteína de superfície e é o ligante para Notch1 exercer diversas funções. Como Delta e Notch1 são ligante-dependentes, ou seja, um depende de estar ligado ao outro para exercer sua função, a não expressão das duas vias é justificada, uma vez que ambos não foram ativados, não sendo capazes de desenvolver sua ação.

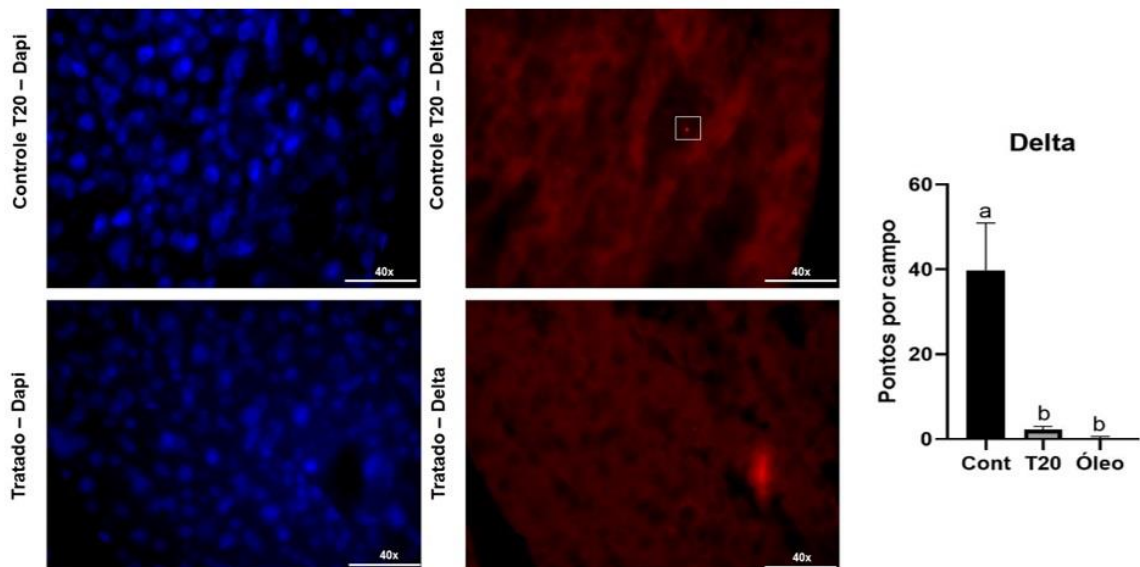


Figura 20 – Imunomarcção para Delta no intestino médio de larvas de *Aedes aegypti*. O Dapi realiza a coloração do núcleo celular. As marcações do Delta encontram-se destacadas na imagem por um quadrado. O número de células positivas para Delta no intestino está sendo retratado no gráfico, onde letras diferentes indicam que ocorreu uma diferença significativa entre os grupos. Imagens no aumento 40x.

As células positivas para marcação da caderina do grupo tratado, não apresentaram diferença significativa em relação ao controle T20 (figura 21). As caderinas são glicoproteínas dependentes de Ca^{2+} que atuam na adesão celular, sua expressão e sua função são essenciais para morfogênese do tecido, pois atuam na formação das camadas epiteliais da pele assim como do intestino. (GOODING et al. 2004). Dessa forma, esperava-se que no grupo tratado ocorresse uma expressão da caderina de forma a promover a adesão celular e reorganização do tecido epitelial lesado, porém o que foi observado é que devido a tantas lesões sofridas pelo óleo, as larvas não foram capazes de ativar essa via. Esse resultado vai de encontro com os achados histológicos, uma vez que no grupo tratado houve a presença de um aumento de espaço entre as células epiteliais, indicando que a via da caderina não foi devidamente ativada.

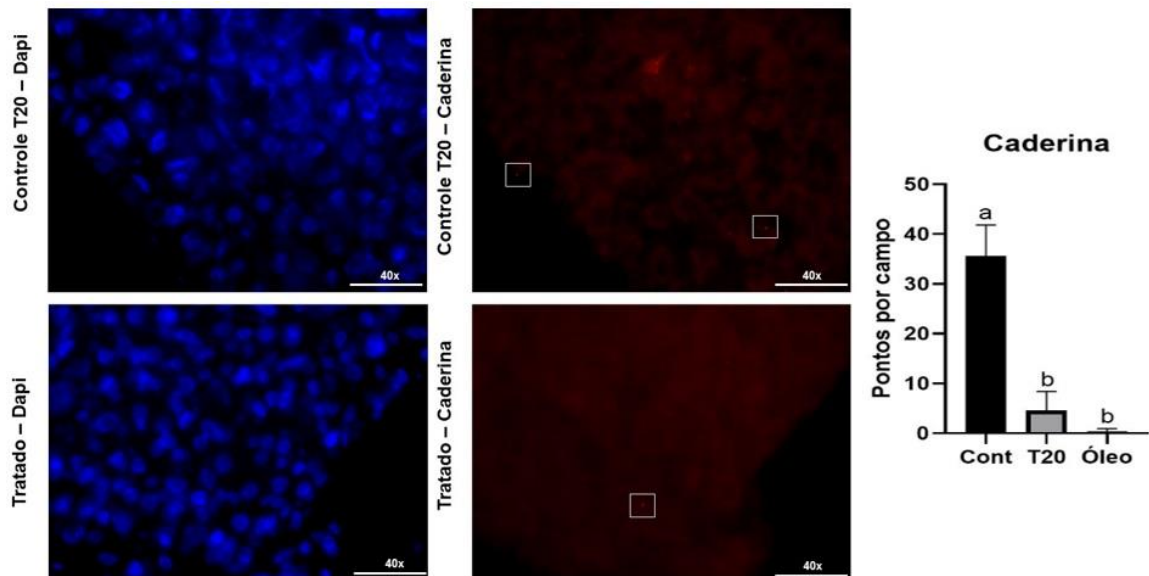


Figura 21 – Imunomarcção para Caderina no intestino médio de larvas de *Aedes aegypti*. O Dapi realiza a coloração do núcleo celular. As marcações do Caderina encontram-se destacadas na imagem por um quadrado. O número de células positivas para Caderina no intestino está sendo retratado no gráfico, onde letras diferentes indicam que ocorreu uma diferença significativa entre os grupos. Imagens no aumento 40x.

O aumento das células positivas para caspase-3 no grupo tratado (figura 22) mostra que as células intestinais das larvas se encontravam em processo de morte celular por apoptose. Tais resultados corroboram os encontrados por Miranda (2019) e Fernandes e colaboradores. (2019). Para Fader-Gomes e colaboradores (2021), esse aumento expressivo das células positivas para caspase-3 no intestino, pode estar associado à falha da atividade antioxidante das enzimas responsáveis pelo controle do estresse oxidativo, não sendo capaz de reduzir a concentração de moléculas reativas de oxigênio, como foi encontrado no presente trabalho, e dessa forma, ativando a via apoptótica, ajudando a explicar a morte das larvas expostas ao óleo essencial.

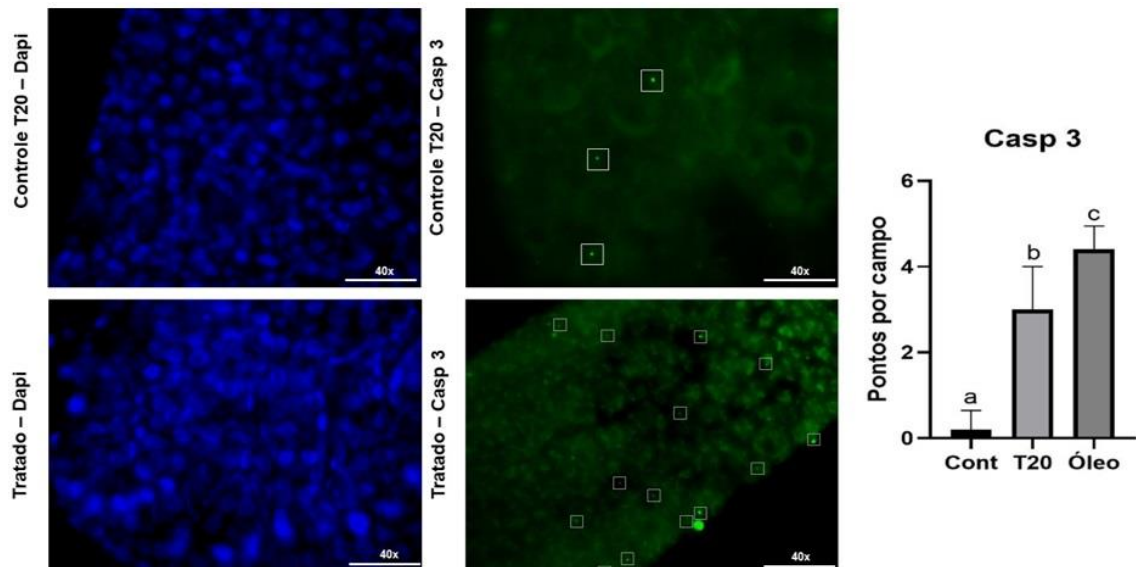


Figura 22 – Imunomarcção para Caspase 3 no intestino médio de larvas de *Aedes aegypti*. O Dapi realiza a coloração do núcleo celular. As marcações de Casp 3 encontram-se destacadas na imagem por um quadrado. O número de células positivas para Casp 3 no intestino está sendo retratado no gráfico, onde letras diferentes indicam que ocorreu uma diferença significativa entre os grupos. Imagens no aumento 40x.

Assim como caspase-3, as células positivas para LC3/AB no grupo tratado tiveram um aumento significativo ao ser comparado com o grupo controle T20 (figura 23). A via LC3/AB é a via da autofagia, que é que um processo catabólico, realizado por autofagossomos e lisossomos, de constituintes citoplasmáticos. Esse processo de autofagia ocorre de forma natural quando há um funcionamento homeostático, porém, pode ser superativado por alguns fatores, e entre eles encontra-se o estresse oxidativo. (LEVINE e YUAN, 2005). Portanto, indo de encontro com os resultados obtidos pelas análises de estresse oxidativo e sendo isso um possível fator de ativação do processo de autofagia e apoptose celular, explica o fato de as vias da caspase-3 e LC3/AB terem sido superativadas ocasionando a morte das larvas expostas ao óleo essencial.

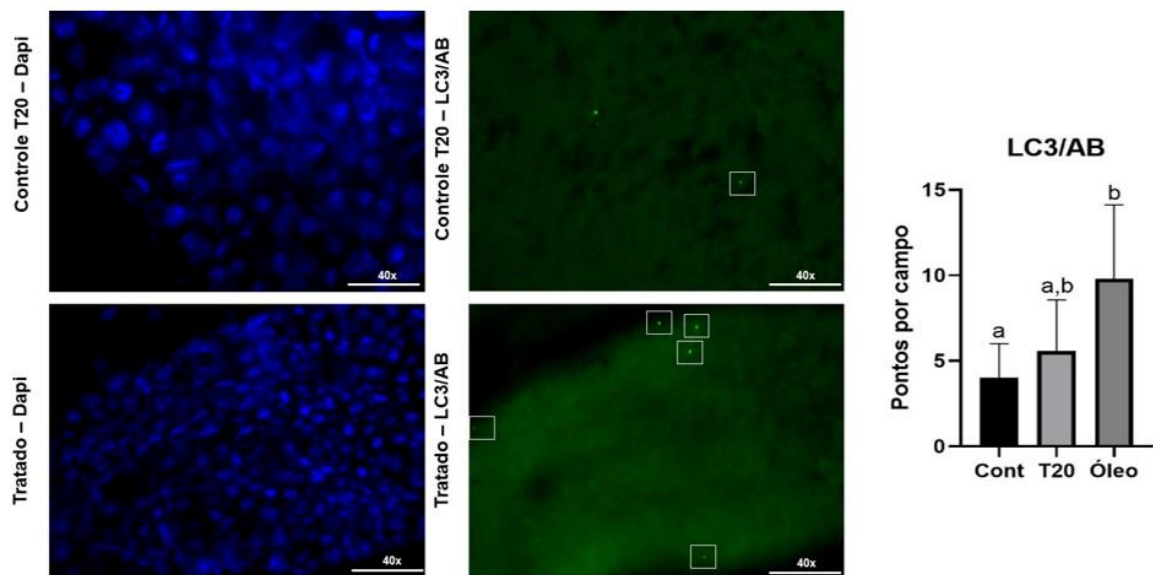


Figura 23 – Imunomarcção para LC3/AB no intestino médio de larvas de *Aedes aegypti*. O Dapi realiza a coloração do núcleo celular. As marcações do LC3/AB encontram-se destacadas na imagem por um quadrado. O número de células positivas para LC3/AB no intestino está sendo retratado no gráfico, onde letras diferentes indicam que ocorreu uma diferença significativa entre os grupos. Imagens no aumento 40x.

Esses danos em células epiteliais indicados pelas proteínas até aqui descritas, vão de encontro com os achados histológicos do trabalho, onde foram visualizados diversos danos e rupturas do tecido epitelial do intestino das larvas expostas ao óleo essencial.

5 CONCLUSÃO

O óleo essencial de louro (*Laurus nobilis* L.), se mostrou promissor para ser utilizado como base para um inseticida natural. Conforme todas as análises realizadas no presente estudo, ele foi capaz de causar danos em níveis celulares e bioquímicos para as larvas expostas, como rompimento do tecido epitelial do intestino, desorganização do mesmo, vacúolos nas células, assim como ocasionou um aumento do estresse oxidativo irreversível para as larvas, além de ativar as vias de autofagia e apoptose e suprimir as vias de reconstituição celular, diferenciação e reorganização tecidual. Portanto, óleo possui uma atividade larvicida e podendo ser utilizado como inseticida natural.

6 REFERÊNCIAS

Aebi, H., 1984. Catalase *in vitro*. **Methods Enzymol.** 105, 121–126.

BARBOSA, Kiriague Barra Ferreira; COSTA, Neuza Maria Brunoro; ALFENAS, Rita de Cássia Gonçalves; PAULA, Sérgio Oliveira de; MINIM, Valéria Paula Rodrigues; BRESSAN, Josefina. **Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios**. Rev. Nutr., Campinas, 23(4):629-643, jul./ago., 2010.

BARDOT, Boris; MOK, Lee-Peng; THAYER, Tristan; AHIMOU, Francois; WESLEY, Cedric. **The Notch amino terminus regulates protein levels and Delta-induced clustering of *Drosophila* Notch receptors**. Experimental Cell Research, 304 (2004) p. 202 – 223. doi:10.1016/j.yexcr.2004.10.030.

BRAGA, Ima Aparecida; VALLE, Denise. **Aedes aegypti: inseticidas, mecanismos de ação e resistência**. Revista Epidemiol. Serv. Saúde, Brasília, 16(4):279-293, out-dez, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Dengue. Instruções para pessoal de combate ao vetor: manual de normas técnicas**. 3. ed. Brasília: Ministério da Saúde/Fundação Nacional de Saúde, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde, Fiocruz, Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos Bio-Maguinhos. **Febre amarela: sintomas, transmissão e prevenção**. 2022a. Disponível em: < <https://www.bio.fiocruz.br/index.php/br/febre-amarela-sintomas-transmissao-e-prevencao>>.

BRASIL. Ministério da Saúde, Fiocruz, Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos Bio-Maguinhos. **Zika: sintomas, transmissão e prevenção**. 2022b. Disponível em: < <https://www.bio.fiocruz.br/index.php/br/zika-sintomas-transmissao-e-prevencao>>.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Síndrome de Guillain Barré**. 2022c. Disponível em:<<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/g/sindrome-de-guillain-barre-1>>.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Febre Chikungunya**. Biblioteca virtual em saúde. 2015. Disponível em: <<https://bvsms.saude.gov.br/febre-de-chikungunya/>>.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Dengue: aspectos epidemiológicos, diagnóstico e tratamento** / Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde. – Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 2002.20p.: il. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos, nº 176). p. 9 – 10. Disponível em: <https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/dengue_aspecto_epidemiologicos_diagnostico_tratamento.pdf>.

BRYAN, N.S.; GRISHAM, M.B. **Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples**. Free Radic Biol Med. 2007 Sep 1;43(5):645-57. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.04.026. Epub 2007 Apr 29.

BUEGE, J.A. & AUST A.D. Microsomal lipid peroxidation methods. **Enzymology** 52, 302–310. 1978

CHAVES, Renata do Socorro Barbosa; MARTINS, Rosany Lopes; RODRIGUES, Alex Bruno Lobato; RABELO, Érica de Menezes; FARIAS, Ana Luiza Ferreira; BRANDÃO, Lethicia Barreto; SANTOS, Lizandra Lima; GALARDO, Allan Kardec Ribeiro; ALMEIDA, Sheylla Susan Moreira da Silva de. Rev. PLOS ONE. **Evaluation of larvicidal potential against larvae of *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) and of the antimicrobial activity of essential oil obtained from the leaves of *Origanum majorana* L**, julho, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235740>>.

CONSOLI, RAGB.; OLIVEIRA, RL. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil [online]. Rio de Janeiro: **Editora FIOCRUZ**, 1994. 228 p. ISBN 85-85676-03-5. Disponível em: <<http://books.scielo.org>>.

COSTA, Maria Beatriz Silva; SIMÕES, Rejane de Castro; SILVA, Márcia de Jesus Amazonas da; OLIVEIRA, André Correa de; ACHO, Leonard Domingo Rosales; LIMA, Emerson Silva; TADEI, Wanderli Pedro; TELES, Helder Lopes; OLIVEIRA, Camila Martins de. Oxidative stress induction by crude extract of *Xylaria* sp. Triggers lethality in the larvae of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). In Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2022, nº 55. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/rsbmt/a/kZcbwzTgNQL4ZJncGJKtSNm/?lang=en#>>.

COSTA, Rafaela de Oliveira Bento. **Influência da temperatura e ciclo circadiano na eclodibilidade, desenvolvimento, características celulares e sexo do mosquito *Aedes aegypti***. 2019. 41 p. Monografia (Graduação) – Centro de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2019. p. 11 – 19.

DIETERICH, S.; BIELIGK, U.; BEULICH, K.; HASENFUSS, G.; PRESTLE, J. 2000. Gene expression of antioxidative enzymes in the human heart: increased expression of catalase in the end-stage failing heart. **Circulation** 101, 33–39. <http://dx.doi.org/10.1161/01.CIR.101.1.33>.

EMBRAPA. **Série Plantas Medicinais, Condimentares e Aromáticas**. Corumbá-MS, 2007. Disponível em:<<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CPAP/56112/1/FOL113.pdf>>.

FADER-GOMES, Cliver Fernandes; FERNANDES, Kenner de Moraes; BERNARDES, Rodrigo Cupertino; BASTOS, Daniel Silva Sena; MARTINS, Gustavo Ferreira; SERRÃO, José Eduardo. Acute exposure to fipronil induces oxidative stress, apoptosis and impairs epithelial homeostasis in the midgut of the stingless bee *Partamona helleri* Friese (Hymenoptera: Apidae). **Science of the Total**

Environment ,774 (2021) 145679. Disponível em:
<doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145679>.

FERNANDES, K. M.; TOMÉ, H. V. V.; MIRANDA, F. R.; GONÇALVES, W. G.; PASCINI, T. V.; SERRÃO, J. E.; MARTINS, G. F. *Aedes aegypti* larvae treated with spinosad produce adults with damaged midgut and reduced fecundity. **Chemosphere**, v. 221, p. 464–470, 2019. Disponível em:
<doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.01.068>.

FERNANDEZ, Carla Maria Mariano; ROSA, Maurício Ferreira da; FERNANDEZ, Ana Claudia Ap. Mariano; LORENZETTI, Fabiana Brusco; RAIMUNDO, Keila Fernanda; CORTEZ, Diógenes Aparício Garcia; GOLÇALVEZ, José Eduardo; SIMÕES, Márcia Regina; COLAUTO, Nelson Barros; LOBO, Viviane da Silva; GAZIM, Zilda Cristiani. Larvicidal activity against *Aedes aegypti* of essential oil of *Laurus nobilis* leaves obtained at different seasons. **Journal of Essential Oil Research**. 2018. Disponível em: <doi.org/10.1080/10412905.2018.1473294>.

FILHO, José Idarlan Gomes Chaves; REIS, Isabella de Lara Aires; FRANÇA, Adrieli dos Santos; CORTELA, Denise da Costa Boamorte. Revisão da literatura: a relação entre Zika Vírus e Síndrome de Guillain-Barré. **Revista Ciência e Estudos Acadêmicos de Medicina**, nº5, Universidade do Estado de Mato Grosso – UNEMAT (Cáceres). 2016 jan. – jul. (p. 22– 29). Disponível em:
<<https://periodicos.unemat.br/index.php/revistamedicina/article/view/1365/1402>>.

FURTADO, Roselayne F.; LIMA, Maria G. A. de; NETO, Manoel Andrade; BEZERRA, José N. S.; SILVA, Maria G. de. **Atividade Larvicida de Óleos Essenciais Contra *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae)**. *Neotropical Entomology* 34(5):843-847, setembro – outubro, 2005.

GARCEZ, Walmir S.; GARCEZ, Fernanda R; SILVA, Lilliam M. G. E. da; SARMENTO, Ulana C. In **Revista Virtual de Química**. Substâncias de Origem Vegetal com Atividade Larvicida Contra *Aedes aegypti*, 2013, Vol. 5, No. 3, p. 363-393.

GARCIA, Leila Posenato. **Epidemia do vírus Zika e microcefalia no Brasil: Emergência, evolução e enfrentamento**. Texto para discussão, nº. 2368, Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada (IPEA), Brasília, 2018. Disponível em:<https://www.econstor.eu/bitstream/10419/177584/1/td_2368.pdf>.

GODOY, Raquel Soares Maia. **Desenvolvimento pós-embrionário do intestino médio de mosquitos (Diptera, Culicidae)**. 2019. Nº dep. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Estrutural) – Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2019. p. 15 – 17.

GOODING, Jane M.; YAP, Kyolo L.; IKURA, Mitsuhiko. The cadherin-catenin complex as a focal point of cell adhesion and signalling: new insights from three-

dimensional structures. **BioEssays**: 2004, 26:497–511. doi:10.1002/bies.20033

HABIG, W.H.; PABST, M.J.; JAKOBY, William B. 1974. Glutathione S- transferases. **J. Biol. Chem.** 25, 7130–7139.

KRUGER, N.J. (2009). The Bradford Method For Protein Quantitation. *In: Walker, J.M. (eds) The Protein Protocols Handbook*. Springer Protocols Handbooks. Humana Press, Totowa, NJ. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-198-7_4

MALTA, Juliane Maria Alves Siqueira; RAMALHO, Walter Massa. Aumento das interações por síndrome de Guillain-Barré no Brasil: estudo ecológico. **Epidemiol. Serv. Saúde** 29 (4), 2020. doi.org/10.5123/S1679-49742020000400020 Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/ress/a/RTBJyrzQX33yxGKwfrgGJSK/?lang=pt>>. Acessado em:

LEVINE, Beth; YUAN, Junying. Autophagy in cell death: an innocent convict?. **J Clin Invest.** 2005;115(10):2679–2688. doi.org/10.1172/JCI26390. Disponível em: <<https://www.jci.org/articles/view/26390>>. Acessado em:

LEVINE, R.L.; WILLIAMS, J.A.; STADTMAN, E.R.; SCHACTER, E.; 1994. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. **Methods Enzymol.** 233 (346–257).

MANN, C.M.; MARKHAM, J.L. A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. **Journal of Applied Microbiology**, 1997, 84, 538–544.

MATTHEWS, Benjamin J. *Aedes aegypti*. **Trends in Genetics/Genome of the Month**, 2019, vol. xxx, nº xxx. Disponível em: doi.org/10.1016/j.tig.2019.03.005.

MILLEZI, Alessandra Farias et al. In vitro antimicrobial properties of plant essential oils *Thymus vulgaris*, *Cymbopogon citratus* and *Laurus nobilis* against five important foodborne pathogens. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 32, n. 1, p. 167-172, Mar. 2012. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/cta/a/xQF9FgQCWm6ttTG7TgzDxNc/?lang=en>>. Acessado em: 24 fev. 2021.

MIRANDA, Franciane Rosa. **Desenvolvimento pós-embriônico do intestino médio e efeito da cafeína e da borra de café em *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)**. 2019. Nº dep. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural) – Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2019. p. 2 – 3.

NARCISO, Juliana Oliveira Abreu; SOARES, Renata Oliveira de Araújo; MALLET, Jacenir Reis dos Santos; GUIMARÃES, Anthony Érico; CHAVES, Maria Célia de Oliveira; BARBOSA-FILHO, José Maria; MALECK, Marise. Burchellin: study of

bioactivity against *Aedes aegypti*. **Parasites & Vectors**, 2014, 7:172. Disponível em: <<http://www.parasitesandvectors.com/content/7/1/172>>. Acessado em: 29 dez. 2021.

NATAL, D. Bioecologia do *Aedes aegypti*. **O Biológico**, São Paulo, vol 64, nº2, p. 205-207, 2002.

NUNES, Fabíola da Cruz. **Estudo da atividade larvicida da *Agave sisalana* contra *Aedes aegypti***. 2013. 114 p. Tese (Doutorado em Biotecnologia em Saúde) – Rede Nordeste de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2013. p. 27 – 35.

PEREIRA, Luana Coelho; OLIVEIRA, Beatriz; COUTO, Ligia Ribeiro Salgueiro. **Caraterização química de folhas e atividade antioxidante de extratos de *Laurus sp.*** 2014. 79 p. Dissertação (Mestrado em Segurança Alimentar) – Faculdade de Farmácia, Universidade de Coimbra, Coimbra, 2014. Disponível em: <<https://eg.uc.pt/bitstream/10316/36196/1/Tese%20Lucena%20Pereira.pdf>>. Acessado em: 25 mar. 2021.

SANTOS, D. D. M. dos; COELHO, A. F. S. **Estudo da atividade antimicrobiana do extrato de folhas de louro (*Laurus nobilis* L.) em bactérias causadoras de toxinfecção alimentar**. In: 9ª Seminário de Iniciação Científica, 2013, Universidade Federal do Tocantins – Campus de Palmas. Disponível em: <<http://docplayer.com.br/40251618-Estudo-da-atividade-antimicrobiana-do-extrato-de-folhas-de-louro-laurus-nobilis-l-em-bacterias-causadoras-de-toxinfeccao-alimentar.html>>. Acessado em: 26 nov. 2020.

SILVEIRA, Mello da Silva. **Avaliação da atividade antimicrobiana e antioxidante de extratos vegetais e óleos essenciais e aplicação do óleo essencial de louro (*L. nobilis*) como agente conservador natural em embutido cárneo frescal**. 2012. 215 f. Tese (Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, 2012. Disponível em: <<https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/100520/305465.pdf?sequenc e=1&isAllowed=y>>. Acessado em: 06 dez. 2021.

SNODGRASS, R. E. **Principles of insect morphology**. 1ª edição. Nova Iorque: McGraw-Hill Book Company; 1935.

TABANCA, Nurhayat; AVONTO, Cristina; WANG, Mei; PARCHER, Jon F.; RAMAN, Vijayasankar; KHAN, Ikhlas. Comparative investigation of *Umbellularia californica* and *Laurus nobilis* Leaf essential oils and identification of constituents active against *Aedes aegypti*. **J. Agric. Food Chem.** 2013, 61, 12283–12291. Disponível em: doi.org/10.1021/jf4052682. Acessado em: 10 jan. 2022.

VALLE, Denise do; BELLINATO, Diogo Fernandes; VIANA-MEDEIROS, Priscila Fernandes; LIMA, José Bento Ppereira; MARTINS, Ademir de Jesus. (2019). Resistance to temephos and deltamethrin in *Aedes aegypti* from Brazil between 1985 and 2017. Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz, 114(Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 2019

114). Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/0074-02760180544>>. Acessado em: 25 jan. 2023.

WHO. World Health Organization. **Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides**. 2005. p. 7–12.