

Efeito de monoterpenos de óleos essenciais presentes em *Alpinia speciosa*, *Cymbopogon citratus* e *Rosmarinus officinalis* sobre ATPases de larvas de *Aedes aegypti*

**FLÁVIA PAIVA DE FREITAS**

Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro-UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES, RJ  
MARÇO-2007

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Efeito de monoterpenos presentes em *Alpinia speciosa*, *Cymbopogon citratus* e *Rosmarinus officinalis* sobre ATPases de larvas de *Aedes aegypti*

**FLÁVIA PAIVA DE FREITAS**

Dissertação apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia.

Orientador: Francisco José Alves Lemos

Co-orientador: Arnaldo Rocha Façanha

CAMPOS DOS GOYTACAZES, RJ.  
MARÇO-2007

Efeito de monoterpenos presentes em *Alpinia speciosa*, *Cymbopogon citratus* e *Rosmarinus officinalis* sobre ATPases de larvas de *Aedes aegypti*

**FLÁVIA PAIVA DE FREITAS**

Dissertação apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia.

Aprovada em \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2007

Comissão examinadora:

---

Prof<sup>o</sup> Lev Alexandrovitch Okorokov (PhD em Bioquímica) – UENF

---

Prof<sup>o</sup> Ivo José Curcino Vieira (Dr. em Química) – UENF

---

Prof<sup>o</sup> José Roberto da Silva (Dr. em Biociências e Biotecnologia) - UNIG

---

Prof<sup>o</sup>. Francisco José Alves Lemos (Dr. em Bioquímica) – UENF  
Orientador

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus por ter me conduzido até aqui;

Aos meus pais Vadim e Cida e meus irmãos Fabrício e Fabiana pelo amor, apoio e incentivo;

Ao meu noivo Sílvio, pelo amor, companheirismo, amizade e apoio nos momentos mais difíceis;

Ao meu orientador Francisco José Alves Lemos, por acreditar no meu trabalho e pelos importantes ensinamentos;

Ao meu co-orientador Arnaldo Rocha Façanha pelos importantes ensinamentos;

À professora Marília A. Berbert de Molina pela revisão deste trabalho;

Aos professores Lev Alexandrovitch Okorokov, Ivo José Curcino Vieira e José Roberto da Silva por aceitarem o convite de participação na banca examinadora;

À professora Ana Okorokova-Façanha, pela ajuda em parte dos experimentos;

Ao pesquisador Markus Huss por ter me cedido os anticorpos para as análises de Western blot;

Ao professor Ivo José Curcino Vieira, por disponibilizar o laboratório LCQui para as análises cromatográficas;

Ao Professor Cláudio Retamal pela colaboração nas análises de densitometria;

Ao professor Silvério de Paiva Freitas, por disponibilizar o laboratório LFIT para extração dos óleos essenciais;

À Glória Cristina Lemos da Silva, pelas importantes dicas no trabalho;

Às técnicas do LBT, Rívia e Telma, pela ajuda e pela boa vontade demonstrada no laboratório;

Aos amigos Juarez Ogliari e Leonardo Silva, pela ajuda no início deste trabalho;

À Silvério de Paiva Freitas Júnior, pela ajuda nas análises estatísticas;

Aos amigos de bancada, Desiely, Analiz, Saulo, Tatiane, Natália, Kamilla, Mírian e Raquel pela agradável convivência;

À Alyne Santos, Lívia Amaral, Tadeu, Sílvia Freitas, Marcela Freitas e Marina Parente pela amizade sincera.

# SUMÁRIO

<b>Abreviações</b>	i
<b>Resumo</b>	ii
<b>Abstract</b>	iii
<b>Lista de Figuras</b>	iv
<b>Lista de Tabelas</b>	vi
<b>1. Introdução</b>	1
<b>2. Revisão de literatura</b>	4
2.1. Sistema Digestivo de larvas de <i>Aedes aegypti</i>	4
2.2. Túbulos de Malpighi	6
2.3. ATPases	10
2.3.1. F - ATPases	11
2.3.2. P-ATPases	12
2.3.3. V H <sup>+</sup> -ATPases	14
2.4. Óleos essenciais	19
2.5. Espécies vegetais	21
2.6. Modo de ação de inseticidas e antimicrobianos	23
<b>3. Objetivos</b>	26
3.1. Objetivo geral	26
3.2. Objetivos específicos	26
<b>4. Materiais e Métodos</b>	27
4.1. Material vegetal	27
4.2. Quantificação do teor de citral e $\alpha$ -pineno nos óleos essenciais	27
4.3. <i>Aedes aegypti</i>	27

4.4. Ensaio de atividade larvicida	28
4.5. Atividade ATPásica	28
4.5.1. Atividade ATPásica de larvas tratadas previamente ao isolamento	28
4.5.1.1. Preparação das amostras	28
4.5.1.2. Isolamento de vesículas de membranas	29
4.5.2. Atividade ATPásica de membranas de larvas tratadas após o isolamento	29
4.5.3. Dosagem protéica	29
4.5.4. Efeito de óleos essenciais e monoterpenos sobre a hidrólise de ATP em membranas de larvas tratadas previamente ao isolamento	30
4.5.5. Efeito dos óleos essenciais e monoterpenos sobre a hidrólise do ATP em membranas isoladas de larvas tratadas após o isolamento	31
4.6. Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida	31
4.7. Western blot	32
<b>5. Resultados</b>	33
5.1. Teor de citral e $\alpha$ -pineno nos óleos essenciais	33
5.2. Ensaio de atividade larvicida	33
5.3. Efeito de óleos essenciais e monoterpenos sobre a hidrólise de ATP em membranas de larvas tratadas previamente ao isolamento	35
5.4. Efeito dos óleos essenciais e monoterpenos sobre a hidrólise do ATP em membranas isoladas de larvas tratadas após o isolamento	42
5.5. Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida	50
5.6. Western blot	50
<b>6. Discussão</b>	54
6.1. Efeito dos óleos essenciais e seus principais monoterpenos sobre ATPases de larvas de <i>Ae. aegypti</i>	54



<b>7. Conclusões</b>	61
<b>8. Referências bibliográficas</b>	63

## ABREVIACOES

APS- Persulfato de amônio

BSA- Albumina sérica bovina

DMSO- Dimetilssulfxido

DDT- Dicloro-difenil-tricloetano

DTT- DL- ditioneitol

EDTA- cido Etileno diamino tetracético

g- gravidade

mA- Mili amper

nm- Nanmetros

kDa- quilodlton

CL- Concentrao letal

PBS- Tampão fosfato salino

PMSF- FenilmetilSulfonil-Fluoreto

PVPP- Polivinilpirrolidona

SDS- Dodecil sulfato de sódio

TCA- cido tricloroacético

TRIS - Hidroximetil amino metano

v- volts

## RESUMO

Este trabalho teve como objetivo estudar o efeito dos óleos essenciais de *C. citratus*, *A. speciosa* e *R. officinalis* e de seus componentes ativos, citral e  $\alpha$ -pineno sobre as atividades F-ATPásicas, V H<sup>+</sup>-ATPásicas e Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPásicas de larvas de *Ae. aegypti*. As F-ATPásicas foram inibidas apenas pelo  $\alpha$ -pineno em altas concentrações. As atividades V-ATPásicas foram inibidas principalmente pelos óleos de *C. citratus* e, pelo seu componente ativo, o citral. Por meio de Western blot, foi verificado que o óleo de *C. citratus* e o citral inibiram a expressão das subunidades B, C, G e C, G, respectivamente, do complexo V<sub>1</sub> da V-H<sup>+</sup>-ATPase. O óleo de *A. speciosa* e o  $\alpha$ -pineno também inibem a expressão das subunidades B, C e G do complexo V<sub>1</sub>, embora inibam a V H<sup>+</sup>-ATPase em concentrações mais elevadas em relação aos óleos de *C. citratus* e o citral. O óleo de *C. citratus* inibe drasticamente a atividade Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPásica, em altas concentrações, porém parece que outros compostos são responsáveis por esta inibição e não o citral, componente presente em 90% na composição deste óleo. O  $\alpha$ -pineno inibe a atividade Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPásica somente em concentrações elevadas. Por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida, foi verificado que estes compostos avaliados afetam a expressão também de outras proteínas. Os óleos essenciais de *A. speciosa*, *R. officinalis*,  $\alpha$ -pineno e citral aumentam a expressão de uma proteína de 203,0 kDa em relação ao controle e ao óleo de *C. citratus*. O citral e o  $\alpha$ -pineno aumentam a expressão das proteínas de 160,0; 47,0 e 41,0 kDa e diminuem a expressão de uma proteína de 72,0 kDa em relação aos outros tratamentos.

## ABSTRACT

This aim of this work was to study the effect of the essential oils from *C. citratus*, *A. speciosa* e *R. officinalis* and theirs active compounds, citral and  $\alpha$ -pinene on the activities of *Ae. aegypti* F-ATPase, V H<sup>+</sup>-ATPase and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. F-ATPases were inhibited only by high concentrations of  $\alpha$ -pinene. The V-ATPase activities were inhibited mostly by the *C. citratus* essential oils and citral, its active component. By Western blot was observed that citral and *C. citratus* oil inhibited the expression of the subunits B, C, G and C, G, respectively, of the V<sub>1</sub> from V-H<sup>+</sup>-ATPase complex. The *A. speciosa* oil and  $\alpha$ -pinene also inhibited the expression of the subunits B, C and G of the V<sub>1</sub> complex. They also inhibit V H<sup>+</sup>-ATPase in higher concentrations than *C. citratus* oil and citral. The oil of *C. citratus* inhibited strongly the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity, probably by its minor components instead citral, the major component of this oil (90%).  $\alpha$ -pinene inhibited Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity in high concentrations. By electrophoresis, it was observed that essential oils affect the expression of gut proteins. The essential oils from *A. speciosa*, *R. officinalis*,  $\alpha$ -pinene e citral increase the expression of a 203 kDa protein while citral and  $\alpha$ -pinene increase the expression of the 160, 47 e 41 kDa proteins and diminish the expression of a 72 kDa protein.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Sistema digestivo da larva de <i>Aedes aegypti</i> .	4
Figura 2 - Modelo de secreção transcelular de $\text{Na}^+$ e $\text{K}^+$ pelas células principais e secreção de $\text{Cl}^-$ pela via paracelular.	8
Figura 3 - Mecanismo de extrusão de $\text{Na}^+$ e $\text{K}^+$ através da membrana plasmática em túbulos de Malpighi de <i>Aedes aegypti</i> .	10
Figura 4. Modelo esquemático da ATPase do tipo F (ATPsintase).	11
Figura 5. Representação esquemática da enzima $\text{Na}^+/\text{K}^+$ - ATPase.	13
Figura 6. Modelo esquemático de V- ATPase intestinal de <i>Manduca sexta</i>	16
Figura 7. Mortalidade em relação ao tempo, de larvas <i>Ae. aegypti</i> de 3º e 4º estádios submetidas a diferentes concentrações de Citral (A), $\alpha$ -pineno (B), Eucaliptol (C).	34
Figura 8. Hidrólise das atividades ATPásicas totais referentes às frações mitocondriais de larvas de <i>Ae. aegypti</i> em resposta a diferentes tratamentos.	36
Figura 9. Hidrólise da atividade F-ATPásica de larvas de <i>Ae. aegypti</i> em resposta a diferentes tratamentos.	37
Figura 10. Hidrólise das atividades ATPásicas totais referentes às frações microssomais de larvas de <i>Ae. aegypti</i> em resposta a diferentes tratamentos.	38
Figura 11. Hidrólise da atividade V-ATPásica de larvas de <i>Ae.aegypti</i> em resposta a diferentes tratamentos.	39
Figura 12. Hidrólise das atividades ATPásicas totais referentes às frações microssomais contendo $\text{Na}^+$ no meio de reação de larvas de <i>Ae.aegypti</i> em resposta a diferentes tratamentos.	40
Figura 13. Hidrólise da atividade $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPásica de larvas de <i>Ae.aegypti</i> em resposta a diferentes tratamentos.	41
Figura 14. Percentagem de atividade hidrolítica total referente à fração mitocondrial de larvas de <i>Ae. aegypti</i> submetidos a tratamentos com diferentes concentrações	44
Figura 15. Percentagem de atividade hidrolítica F-ATPásica de larvas de <i>Ae. aegypti</i> submetidos a tratamentos com diferentes	45

concentrações.

Figura 16. Percentagem de atividade hidrolítica total referente à fração microssomal de larvas de *Ae.aegypti* submetidos a tratamentos com diferentes concentrações. 46

Figura 17. Percentagem de atividade hidrolítica V H<sup>+</sup>-ATPásica de larvas de *Ae.aegypti* submetidos a tratamentos com diferentes concentrações. 47

Figura 18. Percentagem de atividade hidrolítica total referente à fração microssomal contendo Na<sup>+</sup> no meio de reação de larvas de *Ae.aegypti* submetidos a tratamentos com diferentes concentrações. 48

Figura 19. Percentagem de atividade hidrolítica Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPásica de larvas de *Ae.aegypti* submetidos a tratamentos com diferentes concentrações. 49

Figura 20. Identificação molecular da expressão protéica de frações microssomais de larvas de *Ae. aegypti*. 51

Figura 21. Análise de densitometria do padrão de expressão protéica obtido por eletroforese em gel de poliacrilamida. 51

Figura 22. Identificação molecular de V-H<sup>+</sup>-ATPase em larvas de *Ae.aegypti* obtido por western blot utilizando o anticorpo Ab 353-2 contra o complexo V<sub>1</sub> de V H<sup>+</sup>-ATPase de *Manduca sexta*. 52

Figura 23. Análise de densitometria do padrão de expressão protéico obtido por Western blot. 52

Figura 24. Identificação molecular de V H<sup>+</sup>-ATPase em larvas de *Ae.aegypti* obtido por Western blot utilizando o anticorpo Ab C23 contra a subuniade B do complexo V<sub>1</sub> de V H<sup>+</sup>-ATPase de *Manduca sexta* 53

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Percentagens de inibição ou ativação das atividades ATPásicas totais referentes às frações mitocondriais promovidas por diferentes tratamentos após 30 minutos do início da reação.	36
Tabela 2. Percentagens de inibição ou ativação das atividades F-ATPásicas promovidas por diferentes tratamentos após 30 minutos do início da reação.	37
Tabela 3 Percentagens de inibição das atividades ATPásicas totais referentes às frações microssomais promovidas por diferentes tratamentos após 30 minutos do início da reação.	38
Tabela 4 Percentagens de inibição das atividades V-ATPásicas promovidas por diferentes tratamentos após 30 minutos do início da reação.	39
Tabela 5 Percentagens de inibição ou ativação das atividades ATPásicas totais referentes às frações microssomais contendo Na <sup>+</sup> no meio de reação promovidas por diferentes tratamentos após 30 minutos do início da reação.	40
Tabela 6 Percentagens de inibição ou ativação das atividades Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPásicas promovidas por diferentes tratamentos após 30 minutos do início da reação.	41
Tabela 7 Comparação de atividades enzimáticas (%) de frações microssomais obtidas de larvas de <i>Ae. aegypti</i> submetidas a diferentes tratamentos.	42
Tabela 8 Comparação de atividades enzimáticas totais (%) referentes às frações mitocondriais obtidas de larvas de <i>Ae. aegypti</i> submetidas à tratamentos com diferentes concentrações.	44
Tabela 9 Comparação de atividades enzimáticas F-ATPásicas (%) obtidas de larvas de <i>Ae. aegypti</i> submetidas à tratamentos com diferentes concentrações.	45
Tabela 10 Comparação de atividades enzimáticas totais (%) referentes às frações microssomais obtidas de larvas de <i>Ae. aegypti</i> submetidas à tratamentos com diferentes concentrações.	46
Tabela 11 Comparação de atividades enzimáticas VH <sup>+</sup> -ATPásicas (%) de frações microssomais obtidas de larvas de <i>Ae. aegypti</i> submetidas à tratamentos com diferentes concentrações	47
Tabela 12 Comparação de atividades enzimáticas totais (%)	48

referentes às frações microsossomais contendo  $\text{Na}^+$  no meio de reação, obtidas de larvas de *Ae. aegypti* submetidas à tratamentos com diferentes concentrações.

Tabela 13 Comparação de atividades enzimáticas  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPásicas (%) de frações microsossomais obtidas de larvas de *Ae. aegypti* submetidas à tratamentos com diferentes.

49



## 1. Introdução

*Aedes aegypti*, conhecido popularmente como pernilongo, carapanã, muriçoca, dentre outros, pertence à ordem Diptera, família Culicidae, sub-família culicinae (Eiras, 2003). É um mosquito de hábito diurno, de coloração preta, com listras e manchas brancas, adaptado ao ambiente urbano (Natal, 2002). *Ae. aegypti* desenvolveu, em sua trajetória evolutiva um comportamento antropofílico e sinantrópico, sendo reconhecido entre os culicídeos como a espécie mais associada ao homem (Calderón *et al.*, 2004).

*Ae. aegypti* apresenta um curto ciclo biológico (média de 8-12 dias), passando rapidamente pela fase imatura. São holometábolos, passando pelas fases de ovo, larva, pupa e adulto. A oviposição ocorre fora do meio líquido, porém próximos a estes ou em locais inundáveis. Desta forma, *Ae. aegypti* adaptou-se para depositar os ovos nas paredes de recipientes que acumulam água (Natal, 2002). Após o desenvolvimento do embrião, que dura dois ou três dias, os ovos tornam-se resistentes à dessecação, e assim, os recipientes onde os ovos são depositados podem permanecer em condições não favoráveis à eclosão por muito tempo, e cada vez que são abastecidos com água, os ovos são estimulados a eclodir (Natal, 2002). No período larval, ocorrem três mudas, culminando com a larva de quarto estágio, que dá origem à pupa e esta ao adulto (Natal, 2002).

O dengue é uma arbovirose (doença cujo agente etiológico tem como hospedeiro um artrópode) cujo agente etiológico é um vírus do gênero *Flavivirus* e na qual são reconhecidos 4 sorotipos: DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4. Trata-se de uma doença febril aguda com manifestações que variam de uma síndrome viral benigna e inespecífica até um quadro grave fatal de doença hemorrágica (Tauil, 2001). O dengue é transmitida ao homem principalmente pela picada do mosquito *Ae. aegypti*, e embora *Aedes albopictus* também seja um vetor, no Brasil ainda não foi estabelecida nenhuma relação deste vetor com o vírus causador da doença (Monath, 1994).

Trata-se de uma doença de grande importância com 100 milhões de casos estimados ao ano e 2,5 bilhões de pessoas em risco (Solomon e Mallewa, 2001), principalmente em países tropicais como o Brasil, onde, desde 1986, a transmissão ocorre na grande maioria dos Estados (Rodrigues *et al.*, 2002). Durante quase 60 anos, o Brasil não apresentou registros de casos de dengue em seu território.

Porém, em 1976, com a reintrodução do *Ae. aegypti* no território, a doença voltou a ocorrer no país. Vários fatores contribuíram para a reintrodução do vetor, como o grande contingente populacional saindo do meio rural em direção ao meio urbano, levando à grande desorganização das cidades, causada pela falta de infraestrutura, habitação e saneamento básico adequado; a carência em serviços de coleta de lixo e de abastecimento de água, proporcionando o surgimento de criadouros favoráveis à criação dos vetores, além de fatores relacionados à indústria, que produz uma grande variedade de recipientes plásticos, latas, cujos destinos inadequados, como quintais e terrenos baldios, podem levar à proliferação do inseto vetor (Tauil, 2001).

Devido aos diferentes sorotipos do vírus, ainda não existe vacina contra o dengue, de forma que um método efetivo de impedir a transmissão da doença é o controle do vetor. Grande parte da dificuldade de controle do vetor se deve à sua extraordinária competência na busca e escolha de locais preferenciais para a oviposição. *Ae. aegypti* mostra capacidade de colonizar os mais variados tipos de criadouros, e certamente existe correlação entre os depósitos preferenciais para a sua oviposição e os hábitos de armazenagem de água de cada população (Pamplona *et al.*, 2004).

Novas alternativas têm sido estudadas para o controle de pragas e vetores, principalmente devido ao impacto ecológico causado pelos pesticidas, que provocam mortalidade de animais silvestres, domésticos, de inimigos naturais de pragas, desequilíbrio do solo, além do aumento da resistência dos insetos devido ao uso indiscriminado de inseticidas (Roel, 2001). Após as constatações destes graves problemas causados por pesticidas, a pesquisa de controle de pragas da agricultura e vetores de doenças se intensificou e investigações de plantas com propriedades inseticidas se tornaram mais freqüentes (Roel, 2001).

De acordo com Lagunes e Rodriguez (1992), dentre os primeiros fitoinseticidas utilizados estão a nicotina, extraída de *Nicotiana tabacum*, a rianodina, extraída de *Ryania speciosa*, as piretrinas, extraídas do piretro *Crysanthemum cinerariaefolium* e a rotenona, extraída de *Derris spp* e *Lonchocarpus spp*. Vários novos larvicidas e inseticidas apresentaram eficácia comprovada, como é o caso dos terpenóides *cis*-nerolidol, farnesol, D-limoneno, anetol, guazajuleno e felandreno, que são considerados larvicidas de alto potencial contra *Ae. aegypti*. Não somente substâncias puras têm sido identificadas como potentes larvicidas, mas também fitocomplexos, como os extratos metanólicos de *Tapura amazonica* Poepp. (raiz),

*Piper aduncum* L. (folha e raiz) e *P. tuberculatum* Jacq. (folha, fruto e galho) que também apresentaram alta atividade larvívica contra *Ae. aegypti* (Pohlit *et al.*, 2004).

Os óleos essenciais e diversos metabólitos secundários têm sido investigados quanto às suas mais variadas atividades biológicas, incluindo as atividades larvívica, insetívica e/ou repelentes de insetos, porém poucos estudos têm sido realizados na investigação de seus mecanismos de ação.

Os óleos essenciais de *Alpinia speciosa*, *Cymbopogon citratus* e *Rosmarinus officinalis* mostraram, em ensaios preliminares em nosso laboratório, elevado potencial larvívica contra *Ae. aegypti* (Freitas, 2005). Considerando este potencial larvívica aliado à baixa toxicidade para mamíferos que estes óleos apresentam (Burt, 2004) torna-se importante a busca pelos possíveis mecanismos de ação destes compostos na tentativa de torná-los passíveis de serem usados como alternativa no controle de vetores. Considerando a ação do insetívica químico DDT sobre H<sup>+</sup>-ATPases do tipo F (ATP sintases) Younis *et al.* (2002), levantamos a hipótese de que estes óleos poderiam agir sobre estas enzimas e também sobre outras, como as H<sup>+</sup>-ATPases do tipo V e Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPases, as quais exercem funções-chave no metabolismo larval, como energização de processos de alcalinização intestinal e excreção, respectivamente. Considerando a importância destas enzimas em processos vitais, empreendemos uma investigação que possa esclarecer o efeito destes óleos e seus principais constituintes sobre estas enzimas, a fim de ampliar nossos conhecimentos sobre os alvos bioquímicos destes compostos no *Ae. aegypti* e seus possíveis efeitos em organismos não-alvos.

## 2. Revisão de literatura

### 2.1. Sistema digestivo de larvas de *Aedes aegypti*

Segundo Consoli e De Oliveira (1997), o tubo digestivo da larva inicia-se com a faringe, que possui uma musculatura complexa adaptada à deglutição. Após a faringe está o esôfago, fino e muscular, o qual se liga ao intestino médio. A faringe e o esôfago formam o intestino anterior. Seguem-se o intestino médio e oito cecos gástricos. As células que revestem o intestino médio são altas e possuem os bordos estriados, sendo adaptadas à secreção e absorção. Após o intestino médio estão os cinco túbulos de Malpighi, compostos de grandes células achatadas com grandes núcleos. O intestino posterior é composto pela câmara pilórica, o íleo (intestino delgado), reto (cólon) e um ducto anal (Figura 1).

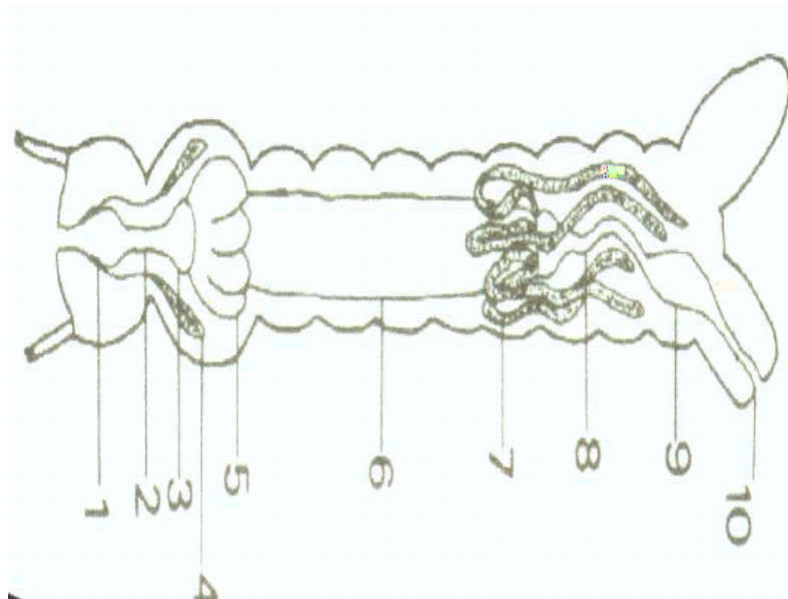


Figura 1. Sistema digestivo da larva de *Aedes aegypti*: 1: faringe; 2: esôfago; 3: proventrículo; 4: glândula salivar; 5: cecos gástricos; 6: estômago ou intestino médio; 7: túbulos de Malpighi; 8: íleo/cólon; 9: reto; 10: ânus (Consoli e De Oliveira, 1997).

O intestino médio é responsável pela digestão do alimento e está envolvido na regulação iônica e osmótica, sendo subdividido em quatro regiões estruturalmente distintas, que incluem a cárdia, o ceco gástrico e os intestinos médio anterior e médio posterior (Del Pilar Corena *et al.*, 2001). O compartimento luminal do intestino médio apresenta um alto valor de pH, sendo que este varia dentro do lúmen de 8,0, nos cecos gástricos, a 11,0 no intestino médio anterior, e 7,0 no intestino médio posterior. Segundo Martin *et al.* (1980), o pH alcalino contribui para a

digestão de detritos de plantas e contribui, também, para dissociação do complexo tanino-proteína, resultando em uma maior assimilação das proteínas. Dentre as funções que devem ser reguladas no mecanismo de alcalinização do intestino médio, estão a transferência de  $H^+$  e a manutenção do gradiente de pH gerado por esta transferência (Del Pilar Corena *et al.*, 2001).

Existe uma forte evidência fisiológica e imunohistoquímica que  $V H^+$ -ATPases são responsáveis pela alcalinização luminal no intestino médio anterior (Del Pilar Corena *et al.*, 2001). Estas enzimas estão localizadas na membrana basal do intestino médio anterior, promovendo uma rede de extrusão de prótons para a hemolinfa e hiperpolarizando a membrana basal, enquanto no intestino médio posterior e nos cecos gástricos são localizadas nas membranas apicais. Nos cecos gástricos e no intestino médio posterior ocorre extrusão de prótons para o lúmen intestinal (Zhuang *et al.*, 1999). A máxima alcalinização ocorre no intestino médio anterior, onde as  $V H^+$ -ATPases são basalmente localizadas, demonstrando que localização apical não é necessária para alcalinização luminal, como ocorre em lepidópteras, em que  $V H^+$ -ATPases são apicalmente localizadas nas células caliciformes do intestino médio. Em lepidópteras, os prótons são bombeados para o lúmen, hiperpolarizando a membrana apical, a qual dirige  $K^+$  para o lúmen via um antiporte  $K^+/2H^+$  (Wieczorek *et al.*, 2003). Segundo Zhuang *et al.* (1999) e Gill *et al.* (1998), as  $V H^+$ -ATPases são as únicas enzimas energizadoras no processo de alcalinização, porém Patrick *et al.* (2006) demonstraram a presença de  $Na^+/K^+$ -ATPases em membranas basais de células da região proximal dos cecos gástricos, enquanto  $V H^+$ -ATPases foram localizados nas membranas apicais de todas as regiões dos cecos. Além disso,  $Na^+/K^+$ -ATPases também foram localizadas em membranas basais na região inicial do intestino médio anterior e intestino médio posterior, enquanto na região mediana do intestino médio anterior esta enzima foi localizada na membrana apical (Patrick *et al.*, 2006).

O alto pH luminal encontrado no intestino médio anterior de *Ae. Aegypti* é provavelmente tamponado por íons  $CO_3^{-2}$ . Íons bicarbonato são produzidos “*in vivo*” pela enzima anidrase carbônica, que cataliza a hidratação e desidratação do dióxido de carbono e bicarbonato na maioria dos organismos. Desta forma, em larvas de *Ae. aegypti* ocorre bombeamento de  $H^+$  para a hemolinfa na região do intestino médio anterior, fazendo com que ocorra produção de  $CO_3^{-2}$  e  $HCO_3^-$ . Experimentos com inibidores de anidrase carbônica mostraram a grande importância desta enzima na

manutenção do pH alcalino no lúmen do intestino médio (Del Pilar Corena *et al.*, 2001). Zhuang *et al.* (1999), observaram que a maior concentração da enzima anidrase carbônica ocorre nos cecos gástricos e no intestino médio posterior, ou seja, nas regiões que limitam o intestino médio anterior. Assim, a maioria dos ânions que promovem o tamponamento do intestino médio anterior não é produzida neste local, mas sim nos cecos e no intestino médio posterior.

Segundo Zhuang *et al.* (1999), o intestino médio posterior apresenta microvilosidades absorptivas e é a região responsável pela absorção de nutrientes em larvas de *Ae. aegypti*. A  $V H^+$ -ATPase apical hiperpolariza a membrana apical e íons  $K^+$  são co-transportados com aminoácidos do lúmen para a célula. Em contraste, o intestino médio anterior não apresenta microvilosidades adaptadas à absorção. E, nos cecos gástricos, mitocôndrias próximas às microvilosidades, contribuem para tornar esta região melhor adaptada à secreção de  $K^+$  que à absorção de aminoácidos.

## 2.2. Túbulos de Malpighi

Em *Ae. aegypti* a exigência osmoregulatória muda em cada estágio de desenvolvimento, de forma que os órgãos responsáveis pelo balanço de água e sais mudam também durante a metamorfose. A forma aquática larval do mosquito, que reside em água doce, possui um ganho contínuo de água pela via oral e pelo fluxo osmótico através da superfície do corpo. Desta forma, as larvas sofrem perdas difusionais de íons  $Na^+$  e  $Cl^-$ , presentes na hemolinfa, para o meio externo (Patrick *et al.*, 2006).

Quando ocorre a pupação e a posterior eclosão do mosquito adulto, novos desafios osmoregulatórios devem ser solucionados. O mosquito adulto em condição de inanição precisa conservar a água do corpo evitando a redução do volume corporal e a conseqüente concentração de íons. Quando machos e fêmeas se alimentam de néctar e quando fêmeas se alimentam de sangue deve haver também o controle da concentração de íons e água no corpo (Clements, 2000). Após a mudança de estágio para o ambiente terrestre, deve haver conservação de água de forma a eliminar o excesso de solutos, resíduos e toxinas com um mínimo de perda de água (Beyenbach, 2003).

Para agir contra estes desafios para a homeostase da hemolinfa, as larvas e adultos são capazes de responder rapidamente e restaurar o balanço de água e íons. As larvas usam os túbulos de Malpighi e o intestino posterior na eliminação de íons, enquanto papilas anais são responsáveis pela absorção dos íons. Já na fase de pupa e adultos, os túbulos de Malpighi, as glândulas salivares, os intestinos médio e posterior são os principais órgãos de balanço de água e sal (Beyenbach, 2003).

No processo de excreção, inicialmente, o segmento distal dos túbulos de Malpighi secretam para o lúmen, íons e alguns solutos orgânicos, tais como resíduos metabólicos e substâncias estranhas ao corpo. Ao longo do caminho, o soluto é reabsorvido e o fluido diluído é excretado pelo reto. Assim, a água adquirida por osmose retorna para o ambiente externo e a larva permanece numa constante condição osmótica. Quando a salinidade externa aumenta para valores próximos da pressão osmótica da hemolinfa, a larva pode aumentar a concentração de prolina e trealose na hemolinfa, aumentando, assim, a pressão osmótica na hemolinfa e minimizando a perda de água por osmose (Patrick e Bradley, 2000).

Em túbulos de Malpighi de insetos, a secreção tubular é o único mecanismo para levar soluto e água para o lúmen do túbulo, pois, não existe nenhuma filtração glomerular (Beyenbach, 2003).

Os túbulos de Malpighi de *Ae. aegypti* são compostos de dois tipos celulares: células principais e células *stellate*. As células principais secretam  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  da hemolinfa para o lúmen do túbulo, por um mecanismo de transporte ativo; o  $\text{Cl}^-$  passa passivamente por um desvio da rota localizado fora das células principais, e a água passa por osmose (Beyenbach e Masia, 2002). Porém, de acordo com estudos mais recentes, as células *stellate* podem estar envolvidas no transporte transcelular de  $\text{Cl}^-$  (Patrick *et al.*, 2006). Os íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  entram nas células principais via canais e via carreadores. A extrusão destes íons das células é energizado por  $\text{V H}^+$ -ATPases localizadas na membrana apical das células, isto é, na borda luminal interior celular. A  $\text{V H}^+$ -ATPase media o transporte ativo primário de translocação de prótons para o espaço extracelular (lúmen do túbulo), gerando um potencial eletroquímico de  $\text{H}^+$  através da membrana apical que potencializa o transporte ativo secundário de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  para o lúmen via antiporteres  $\text{H}^+/\text{Na}^+$  e  $\text{H}^+/\text{K}^+$  (Figura 2).  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPases estão presentes na membrana basolateral destas células,

mantendo o interior das células com altos níveis de  $K^+$  e baixos níveis de  $Na^+$  (Maddrell e O'Donnell, 1992).

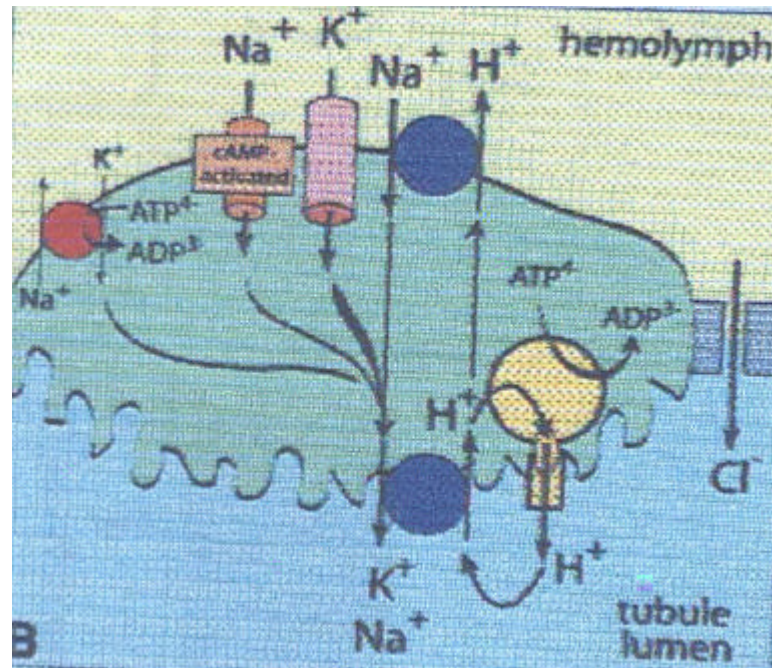


Figura 2. Modelo de secreção transcelular de  $Na^+$  e  $K^+$  pelas células principais e secreção de  $Cl^-$  pela via paracelular. Canais, carreadores e  $Na^+ K^+$  ATPase localizados na membrana basolateral e antiporteres e  $V H^+$ -ATPase localizados na membrana apical de túbulos de Malpighi de *Aedes aegypti* (Beyenbach, 2001).

Segundo Patrick *et al.* (2006), a distribuição de ATPases em túbulos de Malpighi de *Ae. aegypti* é dependente do tipo de célula e da região.  $V H^+$ -ATPases eram consideradas expressas somente em células principais (nas membranas apicais), mas foi verificada a presença desta enzima na região do citosol, na porção distal dos túbulos, mas não na região proximal. Adicionalmente,  $Na^+/K^+$ -ATPases são expressas em células principais (membrana basolateral) em níveis bem maiores na região proximal que na região distal. Em relação às células *stellate*, foi observado que expressam somente  $Na^+K^+$ -ATPases, e em altos níveis em relação às células principais vizinhas. Porém, células *stellate* ocorrem somente na porção distal dos túbulos, sendo que a região proximal é composta somente de células principais. Estas observações na expressão diferencial de ATPases neste dois tipos celulares e a localização destas células ao longo dos túbulos de Malpighi, sugere uma divergência funcional das células principais nas regiões distal e proximal, e também uma função para as células *stellate* no processo de transporte iônico no segmento distal. Segundo Patrick *et al.* (2006), a localização de células principais na região distal com alta expressão de  $V H^+$ -ATPases confirma os resultados de trabalhos



imunohistoquímicos anteriores (Filippova *et al.*, 1998) que mostra esta enzima como a responsável pela fonte de energia para processos secretórios em túbulos de Malpighi de *Ae. aegypti*.

Com relação às células stellates, tem sido atribuída função secretória, pois são encontradas apenas na região distal dos túbulos, região secretora, exibindo alta expressão de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPases e nenhuma  $\text{V H}^+$ -ATPase. A função de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPases na secreção de íons tem gerado conclusões conflitantes, pois trabalhos com *Ae. aegypti* mostraram a presença de secreção de fluido sensível à ouabaína (inibidor de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase) (Hegarty *et al.*, 1991), enquanto outros trabalhos mostraram atividade ATPásica insensível à ouabaína (Weng *et al.*, 2003). Porém, de acordo com Torrie *et al.* (2004) foi identificado um transportador de ouabaína que colocaliza com  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPases em túbulos de Malpighi de *D. melanogaster*. Desta forma, este transportador pode eliminar a ouabaína minimizando a ação desta sobre as  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPases. Como genes altamente homólogos ao gene que codifica para este transportador, têm sido identificados no genoma de *Anopheles* e *Aedes*, há possibilidade de existência deste transportador nas células *stellate* de túbulos de Malpighi de *Ae. aegypti*, explicando assim a atividade insensível à ouabaína encontrada em alguns trabalhos. Desta forma, as  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPases e as células *stellate* podem exercer um papel fundamental na função secretória de túbulos de *Ae. aegypti*, embora as células *stellate* não tenham ainda sido consideradas vitais para a função excretora, já que constituem apenas 16-26% do número total de células dos túbulos (Cabrero *et al.*, 2004).

A interferência no transporte ativo de prótons, pela privação de ATP nas  $\text{VH}^+$ -ATPases (por tratamento com dinitrofenol), ou por bloqueio do canal de prótons da  $\text{V H}^+$ -ATPase com bafilomicina, inibe a geração de corrente na membrana apical, o transporte ativo secundário de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ , através da membrana apical, e a corrente intraepitelial, inibindo consequentemente o transporte transepitelial de eletrólitos e água (Beyenbach, 2001).

O epitélio dos túbulos de Malpighi de *Ae. aegypti* difere morfologicamente de outros epitélios pela abundância de agregados metalo-orgânicos de  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$  e  $\text{K}^+$  intracelulares nas células principais e pela presença de uma longa e delgada mitocôndria em toda microvilosidade da borda interior apical. As mitocôndrias que residem nestas microvilosidades geram ATP e abastecem o transporte de  $\text{H}^+$  pela  $\text{V-ATPase}$  localizada na membrana plasmática apical próxima (Figura 3). A

justaposição das membranas mitocondrial e plasmática favorece a produção e consumo do ATP pelas F-ATPases e V-ATPases, respectivamente (Beyenbach, 2003).

Como as V-ATPases secretam íons  $H^+$  para o lúmen dos túbulos de Malpighi, o fluido poderia se tornar ácido, porém o pH do fluido secretado permanece neutro (pH=7,2) sob condições normais. Deste modo, acredita-se que os prótons secretados pela enzima ficam confinados num microambiente (glicocálix) da borda interna, onde o pH pode ficar menor que no fluido do lúmen (Beyenbach, 2001).

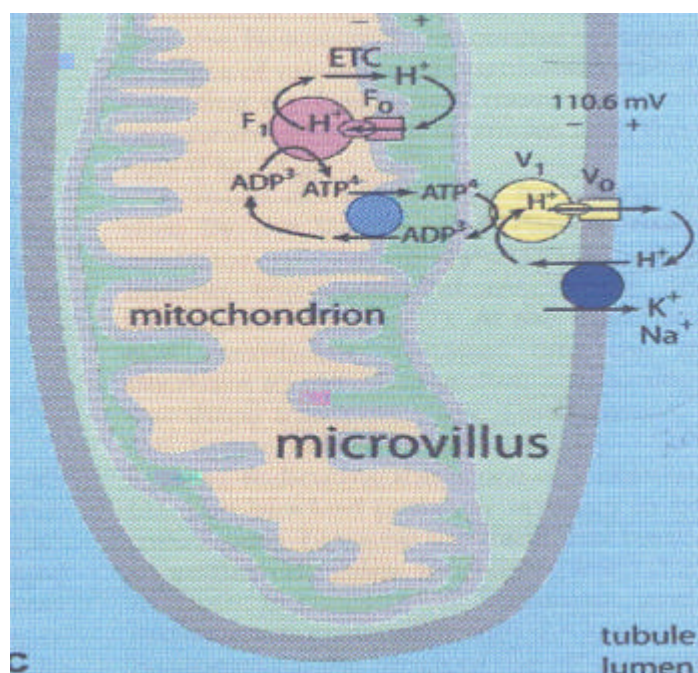


Figura 3. Mecanismo de extrusão de  $Na^+$  e  $K^+$  através da membrana plasmática em túbulos de Malpighi de *Aedes aegypti*, através da síntese de ATP na membrana mitocondrial e utilização pela V-ATPase e transporte ativo secundário de  $Na^+$  e  $K^+$  na membrana plasmática. A bomba de prótons consiste de um setor catalítico citoplasmático ( $V_1$ ), um canal de prótons ( $V_0$ ) e um suporte central. ETC-cadeia transportadora de elétrons,  $F_0$  e  $F_1$  canal e sítio catalítico respectivamente da ATPsintase mitocondrial (Modelo de Beyenbach, 2001).

### 2.3. ATPases

A principal classe funcional de enzimas ligadas à membrana inclui a categoria de transportadores primários ativos, os quais são chamados ATPases, pois catalisam o transporte de íons contra um potencial eletroquímico por reação diretamente ligada à hidrólise de ATP. As ATPases que transportam cátions

ativamente têm sido extensivamente estudadas e foram divididas em categorias, por Pedersen e Carafoli (1987): ATPase tipo F, ATPase tipo V e ATPase tipo P.

### 2.3.1. F- ATPases

As ATPases do tipo F (ATPsintases) são responsáveis pela síntese de ATP a partir do ADP e fosfato inorgânico usando energia derivada do gradiente eletroquímico de prótons. São encontradas em mitocôndrias, cloroplastos e membrana plasmática de bactérias (Gerengser e Zhang, 2003).

As F-ATPases possuem uma massa molecular de aproximadamente 400 kDa e consistem de, no mínimo, nove subunidades arranjadas em um setor catalítico  $F_1$  e um setor de translocação de prótons  $F_0$  (Wieczorek *et al.*, 1999) (Figura 4). A estequiometria das subunidades  $F_1(\alpha_3\beta_3\gamma\delta\varepsilon)$  e  $F_0(abc_{12}d)$  são similares entre mitocôndrias, cloroplastos e membranas plasmáticas de bactérias. A subunidade central  $\gamma$ , juntamente com a subunidade  $\varepsilon$  forma a haste central que conecta os setores  $F_1$  e  $F_0$ . Estas subunidades são ligadas ao anel das subunidades  $c$ , onde a rotação, direcionada pela hidrólise do ATP no setor  $F_1$ , ocorre (Sambongi *et al.*, 1999). A subunidade “a” se liga a subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  do setor  $F_1$  por uma haste-subunidade  $\delta$  e  $b$  (McLachlin *et al.*, 1998). Segundo Junge *et al.* (1996), *apud* Samarão (2003), o movimento do anel das subunidades  $c$  produz uma translocação ativa de prótons através da membrana.

A atividade das F-ATPases é inibida por azida e oligomicina (Wieczorek *et al.*, 1999).

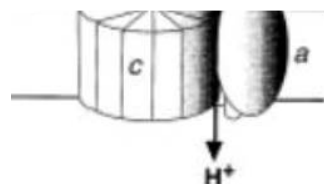


Figura 4. Modelo esquemático da ATPase do tipo F (ATPsintase) (Modelo de Futai *et al.*, 2000)

### 2.3.2. P-ATPases

Além de similaridades funcionais, as P-ATPases possuem homologias estruturais, pertencendo a uma mesma grande família de genes. Todos os membros possuem um peptídeo principal de aproximadamente 100 kDa, designado como a unidade catalítica, pois contém o sítio para ligação do ATP e fosforilação (Pedersen e Carafoli, 1987). O alto grau de similaridade de seqüência dos aminoácidos dentro do sítio de ligação de ATP e sítio de fosforilação demonstra a natureza altamente conservada de domínio protéico que interage com ATP (Fagan e Saier, 1994). A estrutura da subunidade catalítica das P-ATPases podem ser divididas em três segmentos. O segmento 1 contém quatro domínios transmembranas hidrofóbicos ( $\alpha$ -hélices), H1-H4, o qual produz dois pequenos *loops* extracelulares, um grande *loop* intracelular entre H2 e H3, e um N-terminal citoplasmático. O segmento 2 possui um grande *loop* citoplasmático que ocorre entre H4 e H5, e é composto de vários domínios hidrofílicos, incluindo o sítio de fosforilação catalítica e o sítio de ligação do ATP. O segmento 3 é a parte C-terminal da proteína, iniciando com H5, o qual varia consideravelmente entre diferentes tipos de P-ATPases (Emery *et al.*, 1998). Estas ATPases são inibidas por concentrações submicromolares de vanadato, o qual age como um análogo do fosfato (O' Neal *et al.*, 1979).

As ATPases do tipo P são divididas em cinco grupos, P<sub>1</sub>-ATPases, relacionadas ao transporte de metais pesados como Cu<sup>+</sup>, Cd<sup>+2</sup>, Hg<sup>+2</sup>; P<sub>2</sub>-ATPases que transportam cátions como Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Mg<sup>+2</sup> e Ca<sup>+2</sup>; P<sub>3</sub>-ATPases que transportam H<sup>+</sup>; P<sub>4</sub>-ATPases, identificadas em leveduras e que transportam, provavelmente, aminofosfolipídeos (Catty *et al.*, 1997); P<sub>5</sub>-ATPases (ATPases Cta4 e Spf1p de *Schizosaccharomyces pombe* e *Sacchomyces cerevisiae*, respectivamente) são importantes para a homeostase de Ca<sup>+</sup> (Cronin *et al.*, 2002; Okorokova-Façanha *et al.*, 2002).

Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPases usam a energia da hidrólise do ATP para dirigir o movimento de K<sup>+</sup> para dentro das células e de Na<sup>+</sup> para fora das células, promovendo uma força que direciona o transporte de outros solutos, como aminoácidos, açúcares, fosfatos (Cereijido *et al.*, 2004). É responsável pelo estabelecimento e manutenção de altas concentrações de K<sup>+</sup> e baixas concentrações de Na<sup>+</sup> no citoplasma, condição importante para o normal potencial de repouso da membrana e várias outras atividades celulares. Esta bomba mantém a homeostase iônica, importante para o

crescimento celular, diferenciação e sobrevivência da célula (Yu, 2003), além de estar envolvida na migração e modulação celular, bem como nas interações célula-célula (Shoshani *et al.*, 2005).

A  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase é composta pela subunidade  $\alpha$ , que contém sítios ligantes para  $\text{Mg}^+$ , ATP,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e ouabaína, e é considerada a subunidade catalítica, pela subunidade  $\beta$ , altamente glicosilada, envolvida na maturação estrutural e funcional da holoenzima (Shoshani *et al.*, 2005) (Figura 5). A subunidade  $\gamma$  parece estar envolvida na modulação da atividade da enzima (Sweadner *et al.*, 2000). O transporte de íons requer a participação das subunidades  $\alpha$  e  $\beta$ .

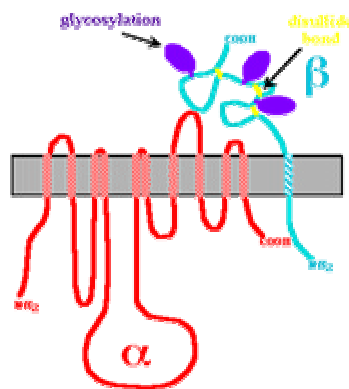


Figura 5. Representação esquemática da enzima  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase (Sweadner *et al.*, 2000)

Em vertebrados, a expressão tecido específica de diferentes  $\alpha$  subunidades de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase é comum, ou seja, existem isoformas da subunidade  $\alpha$  e a expressão destas isoformas é tecido-específica. Porém, em insetos onde  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase é expressa em mais de um tecido, não existe evidência molecular que diferentes isoformas da subunidade  $\alpha$  são expressas (Emery *et al.*, 1998). Como a subunidade  $\alpha$  é responsável por determinar diferenças na atividade  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, especialmente sensibilidade a glicosídeos cardíacos, os insetos não apresentam estas variabilidades de atividade enzimática nos diferentes tecidos. Por outro lado, existem evidências da existência de duas isoformas da subunidade  $\beta$  em insetos, o que pode representar uma possibilidade da existência de alvos tecido específicos e regulação específica da enzima. Nenhuma das formas das subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  em insetos parecem ser relacionadas a qualquer isoforma  $\alpha$  e  $\beta$  de vertebrados (Emery *et al.*, 1998).

A distribuição de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPases em tecidos de insetos varia bastante entre as espécies. Esta enzima é expressa em músculos e túbulos de Malpighi, mas não em intestino médio de *Drosophila melanogaster*, porém se expressa em intestino médio, mas não em túbulos de malpighi de *Anopheles stephensi* (Emery *et al.*, 1998).

A presença e abundância de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPases em intestino médio de insetos varia taxonomicamente e com a dieta. O intestino médio de larvas de lepidópteras é sítio de secreção de  $\text{K}^+$ , e o processo é mediado pela  $\text{V H}^+$ -ATPase apical acoplada ao antiporte  $2\text{H}^+/\text{K}^+$  nas células do cálice do intestino médio, onde  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPases são ausentes (Klein, 1992). Os intestinos médios de

genes. Destas, 5 subunidades do complexo  $V_1$  (B, C, E, G e H) são codificadas por genes únicos. Outras subunidades (a, c do complexo  $V_0$ ) chegam a ser codificadas por cinco genes (Allan *et al.*, 2005). Em *Manduca sexta*, as seqüências das subunidades A, B, E, F e G foram obtidas por clonagem de DNAC. Análises de Sourthen e Northen blot mostram que as subunidades A, E, F e G podem ser codificadas por apenas um gene cada, expressando apenas 1 isoforma cada, porém com subunidades B, foi demonstrada, a presença de 2 isoformas (Huss *et al.*, 1999). O número total de subunidades pode diferir devido às subunidades responsáveis pela regulação da enzima (Svergun *et al.*, 1998).

Como a F-ATPase, as V-ATPases consistem de um complexo  $V_0$  condutor de prótons membranar e um complexo  $V_1$ , catalítico periférico. O complexo  $V_1$ , consiste de no mínimo sete subunidades com uma massa molecular total de aproximadamente 550 kDa (Svergun *et al.*, 1998). O complexo membranar  $V_0$  consiste de três ou quatro subunidades com massa total de aproximadamente 250 kDa (Stevens e Forgac, 1997) (Figura 6). Por convenção, as subunidades dos complexos  $V_1$  e  $V_0$  são representadas por letras grandes e pequenas respectivamente. O complexo  $V_1$  consiste de uma cabeça globular com três cópias de subunidades A e B que se alternam, formando um anel, de um suporte rotacional central de cópias simples de subunidades D e F, e de um suporte periférico composto de subunidades C, E, G e H. Subunidades A e B promovem a hidrólise de ATP em três sítios de reação associados com a subunidade A. O suporte rotacional central e o suporte periférico fixo conectam o complexo  $V_1$  com o complexo  $V_0$ . O suporte periférico fixo mantêm o complexo  $V_1$  no local, ajudado pelas subunidades B e C do complexo  $V_1$  que se ligam à actina. A subunidade C é capaz de se ligar à actina, bem como promover ligações que estabilizam filamentos de actina (Beyenbach e Wiczorek, 2006). O complexo  $V_0$  consiste das subunidades c, c', c'', formando uma estrutura em anel, além das subunidades a, d, e.

As V  $H^+$ -ATPases consistem de uma parte estacionária e de uma móvel. A parte móvel consiste das subunidades D, F e o anel das subunidades c. As estruturas que permanecem são consideradas a parte estacionária. A função das subunidades d e e do complexo  $V_0$  ainda permanece não esclarecida (Beyenbach e Wiczorek, 2006).

A hidrólise do ATP leva à rotação do suporte central juntamente com o anel de subunidades c do complexo  $V_0$ . A transferência de  $H^+$  através da membrana é

realizada devido a presença de um meio canal interno e um meio canal externo na subunidade a, próximos ao anel de subunidades c. A rotação do anel de subunidades c transporta  $H^+$  do canal interno para o canal externo via um ponto intermediário de ligação à  $H^+$  (Meier *et al.*, 2005). Após rotação de  $360^\circ$  do anel de subunidades c,  $H^+$  pode se desligar e sair da membrana pelo canal externo (Meier *et al.*, 2005). São transportados 2  $H^+$  por ATP consumido, estequiometria consistente com a estequiometria estrutural de seis sítios ligantes para  $H^+$  no anel de subunidades c do complexo  $V_0$  e três sítios ligantes para ATP no complexo  $V_1$  (Tomashek e Brusilow, 2000).

Concentrações submicromolares de bafilomicina e concanamicina (Drose *et al.*, 1993), e de *macrolactonas archazolide*, recentemente descobertas, são inibidores altamente específicos que ligam à subunidade c do complexo  $V_0$  das V-ATPases (Huss *et al.*, 2005).

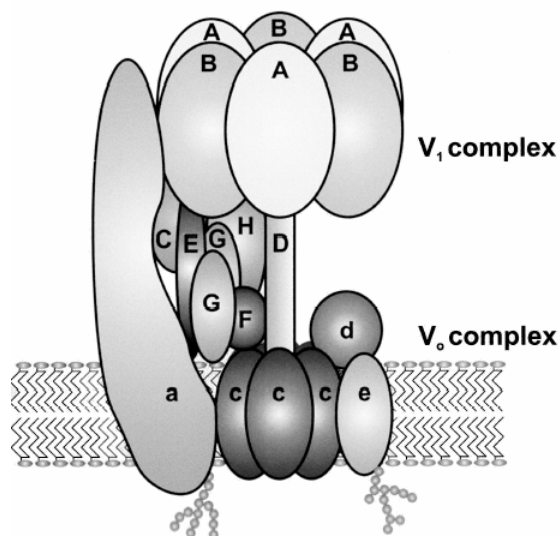


Figura 6. Modelo esquemático de V-ATPase intestinal de *Manduca sexta* (Modelo de Wieczorek *et al.*, 2003)

V  $H^+$ -ATPases são responsáveis pela acidificação de compartimentos intracelulares em células eucarióticas, incluindo vesículas cobertas de clatrina, endossomos, lisossomos, fagossomos, complexos de Golgi, vesículas secretórias e vacúolos de plantas. A acidificação do lúmen de compartimentos intracelulares possui uma função importante em vários processos celulares, principalmente no tráfico de membranas e de proteínas (Forgac, 1999). A acidificação luminal é essencial para a distribuição e degradação de ligantes internalizados nas vias endocíticas. O pH varia nos diferentes subcompartimentos da via endocítica, com a



acidificação aumentando progressivamente da vesícula endocítica, daí para endossomos iniciais, depois para endossomos finais e posteriormente para lisossomos (Maxfiel e Yamashiro, 1987).

O pH das vias secretórias torna-se mais ácido a medida que se aproxima da superfície da célula (Mellman, 1992). Porém pouco se conhece sobre os determinantes de pH em cada subcompartimento e sobre a fonte de suas acidificações diferenciais (Sennoune *et al.*, 2004).

Tanto em fagócitos quanto em vacúolos, contribuem para homeostase do pH no interior da célula, principalmente quando o metabolismo da célula é acelerado durante atividade microbiana. Assim, se ocorre uma grande geração de ácidos, devido principalmente à síntese de metabólitos de oxigênio reativos, as V-ATPases catalizam a extrusão de prótons restaurando o balanço de pH, mantendo-o nos níveis fisiológicos (Wieczorek *et al.*, 1999). A detecção imunológica de V-ATPases na membrana fagossomal, bem como a demonstração de que a acidificação é dependente de ATP e é eliminada pela adição de bafilomicina, constituem evidências diretas do envolvimento de bombas de H<sup>+</sup> nesta membrana (Lukacs *et al.*, 1990). A acidificação fagossomal produz um meio favorável para a função catalítica de uma variedade de proteases e lipases que são liberadas para o lúmen do fagossomo por grânulos secretórios (Wieczorek *et al.*, 1999).

Em lisossomos, o pH ácido do lúmen é necessário para proporcionar o funcionamento de hidrolases ácidas envolvidas na degradação de macromoléculas. Em vacúolos e vesículas secretórias, a atividade V H<sup>+</sup>-ATPases é utilizada para direcionar o transporte de íons e metabólitos para o lúmen da vesícula.

Em plantas, V H<sup>+</sup>-ATPases estão localizadas nos tonoplastos e em outros componentes do sistema de membranas internas da célula vegetal, no RE e no Golgi. Estas enzimas participam da homeostase de íons e no metabolismo celular, além de estarem relacionadas ao estresse ambiental, apresentando mudanças na expressão de subunidades (Ratajczak, 2000).

Células epiteliais em epidídimo de mamíferos expressam grande quantidade de V-ATPases nas membranas plasmáticas apicais e em vesículas intracelulares, promovendo a acidificação necessária para a maturação do espermatozoide e a manutenção sob condição imóvel até a neutralização por secreções alcalinas durante a ejaculação. A importância das V-ATPases neste processo foi comprovada

pela inibição de cerca de 80% do fluxo de prótons pelo tratamento com bafilomicina, segundo AU e Wong (1980), *apud* Wieczorek *et al.* (1999).

As V-ATPases exercem função de grande importância em osteoclastos de mamíferos, criando um compartimento de reabsorção óssea, o qual é acidificado por V-ATPases. Prótons são bombeados para este compartimento através da membrana apical, levando à acidificação deste compartimento, e juntamente com a presença de enzimas lisossomais nestas condições ácidas, ocorre a reabsorção óssea (Chatterjee *et al.*, 1992).

Em células renais, as V-ATPases são responsáveis pela secreção de íons  $H^+$  nas células do ducto coletor, túbulos proximais e segmentos dos néfrons (Gluck *et al.*, 1996).

Macrófagos e neutrófilos também possuem V-ATPases de membrana plasmática, responsáveis pela manutenção do pH neutro citoplasmático (Swallow *et al.*, 1993).

Certas células tumorais também expressam V-ATPases em membranas plasmáticas, onde parecem exercer diversas funções. Uma das funções seria no processo de invasão do tumor que requer secreção de enzimas digestivas que degradam a matriz extracelular. Outra possibilidade, seria que a atividade V-ATPásica produza um ambiente extracelular ácido necessário para a invasão, possibilitando, às células um aumento do potencial metastático (Martínez-Zaguilán *et al.*, 1993).

Em insetos, fisiologistas consideram esta enzima como energizadora de membrana plasmática (Wieczorek *et al.*, 1999). Estudos de transporte em membranas apicais do intestino médio de *Manduca sexta*, levaram a identificação de V  $H^+$ -ATPases, enquanto nenhuma  $Na^+/K^+$ -ATPase foi encontrada no intestino médio, mostrando que V  $H^+$ -ATPase é a enzima responsável pela energização do transporte epitelial (Klein, 1992). A V-ATPase ocorre na membrana da célula apical das células calciformes, um dos principais tipos celulares no epitélio (Wieczorek *et al.*, 1999).

Em formigas (*Formica polyctena*), as V  $H^+$ -ATPases também são as enzimas responsáveis pela secreção de eletrólitos nos túbulos de Malpighi, estando localizadas na membrana apical do túbulo. Porém, apesar de evidências de que as enzimas tipo V  $H^+$ -ATPases são as principais em túbulos de Malpighi, as enzimas  $Na^+/K^+$ -ATPase também são importantes, já que participam no transporte

transepitelial na regulação do volume celular em túbulos de Malpighi de *Rhodnius prolixus* (Caruso *et. al.*, 2001).

## 2.4. Óleos essenciais

Os óleos essenciais são misturas complexas, cujas composições variam desde hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas, até compostos com enxofre. Porém, quimicamente, a grande maioria dos óleos essenciais constitui-se predominantemente de derivados terpenóides. Os terpenóides ou isoprenóides são assim denominados devido à sua unidade básica: difosfato de isopentenila (IPP). Os terpenos são biossintetizados pela rota do ácido mevalônico (Simon, 1993) em reação cujo precursor é o acetil-coA, e também pela rota do fosfato de metileritritol (MEP), tendo como precursores o gliceraldeído-3-fosfato e o piruvato (Taiz e Zeiger, 2002). A primeira rota ocorre no citosol e no retículo endoplasmático e a segunda ocorre nos plastídeos, porém ambas dão origem ao difosfato de isopentenila (IPP). O difosfato de isopentenila e seu isômero, difosfato de dimetilalila (DMAPP) são as unidades da biossíntese dos terpenos que se unem para formar moléculas maiores. Inicialmente, a adição de uma molécula de IPP ao DMAPP origina o difosfato de geranila (GDP), molécula de 10 carbonos, a partir do qual são formados os monoterpenos. O GDP pode se ligar a outra molécula de IPP, formando o difosfato de farnesila (FPP), molécula de 15 carbonos, a partir do qual são formados os sesquiterpenos. A adição de outra molécula de IPP forma o difosfato de geranilgeranila (GGPP), composto de 20 carbonos, precursor dos diterpenos. Há também os triterpenos composto de 30 carbonos e os tetraterpenos (composto de 40 carbonos), formados pela dimerização de FPP e GGPP, respectivamente (Trapp e Croteau, 2001).

A melhoria nas técnicas de separação e identificação de compostos químicos nos últimos 25 anos possibilitou melhor conhecimento da composição dos óleos essenciais. Desta forma, tem-se estabelecido que a composição dos óleos essenciais é muito variável. Estas diferenças resultam de variações sazonais, condições climáticas e de solo, grau de maturidade da planta, entre outras (Regnault-Roger, 1997).

Os óleos essenciais são solúveis em solventes orgânicos apolares, são incolores ou amarelados, e não são estáveis na presença de luz, ar, calor, umidade e metais (Freitas, 2003). A maioria dos óleos voláteis são opticamente ativos, propriedade usada na sua identificação e controle de qualidade (Simões e Spitzer, 2001). A presença destas substâncias em plantas já foi considerada um “desperdício fisiológico”, mas já são conhecidas várias funções para estas substâncias, como inibidores de germinação, atração de polinizadores, proteção contra predadores, proteção contra perda de água e aumento de temperatura, dentre outras (Craveiro e Machado, 1986). Além disso, apresentam grande valor como matéria-prima na indústria de perfumaria, cosméticos, aromaterápicos, fitoterapia, condimentos e de nutrição, segundo Buchbauer (2000), *apud* Lahlou, (2004).

Segundo Shaaya *et al.* (1991) os óleos essenciais são também considerados como substâncias com propriedades inseticidas, ovicidas, larvicidas, inibidoras de crescimento, repelentes. Vários óleos essenciais apresentam atividade contra insetos que atacam produtos armazenados, dentre estes se encontram os óleos essenciais de patchouli, *Pogostenmon heyneaus* (Solanaceae) e *Ocimum basilicum* (Lamiaceae), os quais foram ativos contra *Sitophilus oryzae* (Coleóptera: Curculionidae), *Stegobium paniceum* (Coleóptera: Anobiidae) e *Bruchus chinensis* (Coleóptera: Bruchidae) (Shaaya *et al.*, 1991).

Os óleos de *Eucalyptus* e *Thymus vulgaris* (Lamiaceae) foram tóxicos à *Rhizopertha dominica* (Coleóptera: Bostrychidae). Os óleos essenciais de *Mentha*, *Lavandula* (Lamiaceae) e *Pinus* (Pinaceae) apresentaram alta toxicidade contra *Myzus persicae* (Homóptera: Aphididae) e *Trialeuroides vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae) (Regnault-Roger, 1997).

Dependendo da família, os óleos essenciais podem ocorrer em pêlos glandulares (Lamiaceae), células parenquimáticas diferenciadas (Piperaceae, Poaceae), canais oleíferos (Apiaceae) ou bolsas lisígenas (Rutaceae). Estes óleos podem estar armazenados em certos órgãos, como flores (laranjeira), folhas (capim-limão, eucalipto), cascas, caules (canela), madeira (sândalo), frutos (erva-doce, funcho), raízes, rizomas (gingibre) e sementes (noz-moscada) (Regnault-Roger, 1997).

Embora todos os órgãos de uma planta possam acumular óleos essenciais, sua composição pode variar segundo sua localização. Além da variação na

composição química, estes óleos podem variar segundo suas características físico-químicas e também no odor (Simões e Spitzer, 2001).

Plantas ricas em óleos essenciais são abundantes em angiospermas dicotiledôneas, tais como nas famílias Asteraceae, Apiaceae, Lamiaceae, Rutaceae, dentre outras. Óleos voláteis são de ocorrência relativamente rara em angiospermas monocotiledôneas, com exceção das Zingiberaceae (*Alpinia* e *Curcuma*, como exemplos) e Poaceae (*Cymbopogon*, *Vetiveria*). São mais raramente encontrados em gimnospermas (exceção de coníferas), segundo Hegnauer *apud* Simões e Spitzer (2001).

## 2.5. Espécies vegetais

A espécie *Alpinia speciosa* K. Schum, família Zingiberaceae, é originária da Ásia. É uma monocotiledônea herbácea rizomatosa, ereta, aromática e perene. É encontrada em grande parte do Brasil, onde é bastante usada como componente da medicina popular. Além disso, é comumente cultivada como planta ornamental (Côrrea, 1984).

Segundo Rezende (2004), *Alpinia speciosa* apresenta várias sinonímias: *Alpinia zerumbet*, *Alpinia nutans* Roscoe, *Costus zerumbet* Pers, *Globa nutans* Redoute, *Catimbium speciosum* Holt, *Zerumbet speciosum* Wendl, *Languas speciosa* Small. É conhecida popularmente como colônia (Matos, 2002), pacová, cana-do-brejo e cana-do mato (Côrrea, 1984).

Segundo Almeida (1993), as propriedades medicinais de *A.speciosa* se devem a compostos presentes nas folhas, flores e rizomas. Esta espécie apresenta propriedades depurativas, estomáquicas e vermífugas, diuréticas e hipotensoras (Mendonça *et al.*, 1991). Segundo Rezende (2004), esta espécie apresenta flavonóides, alcalóides, óleos essenciais e taninos em sua composição química. Dentre diferentes tipos de extratos, o óleo essencial de *Alpinia speciosa* apresentou um potente efeito sobre a pressão arterial, na contratibilidade muscular e na excitabilidade neuronal (Leal-Cardoso, 2004). Segundo Freitas (2005), o óleo essencial de *Alpinia speciosa* apresentou elevado potencial larvicida contra larvas de 3º e 4º estádios de *Ae. aegypti*, causando mortalidade de 100% nas concentrações de 2,5  $\mu\text{LmL}^{-1}$  e de 0,5  $\mu\text{LmL}^{-1}$  após 5 minutos e 24 horas, respectivamente.

De acordo com Zoghbi *et al.* (1999), os principais componentes voláteis das folhas de *Alpinia speciosa* foram limoneno (25,1%), terpinen-4-ol (22,7%),  $\gamma$ -terpineno (17,4%). O óleo obtido das flores apresentou majoritariamente os compostos 1,8-cineol (23,1%), terpinen-4-ol (20,4%) e sabineno (14,5%).

*Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf, conhecido popularmente como capim-limão, capim-cidreira ou capim-santo, família Poaceae, é originário da Índia, porém é cultivado em quase todos os países tropicais e subtropicais, principalmente como fonte de óleo essencial (Cheel *et al.*, 2005). A infusão e decocção das partes aéreas do *C. citratus* apresenta amplo uso na medicina popular. Esta planta é recomendada para tratamentos de desordens digestivas, inflamações, diabetes, desordens nervosas e febre (Cheel *et al.*, 2005).

Segundo Leal (1998), a planta é acaule, com folhas longas, estreitas, agudas, aromáticas, com nervura grossa e acanalada.

O óleo essencial de *C. citratus* possui como componente majoritário o citral (mais que 70%), que corresponde a um monoterpenóide que tem sido identificado como responsável pela atividade antifúngica apresentada pelo óleo essencial desta planta, segundo Paranagama *et al.* (2003). Ohno *et al.* (2003), analisando os constituintes voláteis de *C. citratus*, observaram que os principais constituintes do óleo foram limoneno (6,70%), mirceno (0,50%), citronelal (0,51%), linalol (1,92%), neral (37,38%), geranial (37,50%) e acetato de geranila (0,74%).

Este óleo essencial apresenta atividade antibacteriana e antifúngica (Carriconde *et al.*, 1996; Mishra e Dubey, 1994). Apresenta também atividade fungistática e fungicida contra *Aspergillus flavus*, responsável pela produção de uma toxina no arroz (Paranagama *et al.*, 2003). O óleo essencial apresentou também atividade larvicida de 96% na concentração de 2,5  $\mu\text{LmL}^{-1}$  após 5 minutos, e na concentração de 0,5  $\mu\text{LmL}^{-1}$  de 100% após 24 horas contra larvas de *Aedes aegypti* (Freitas, 2005).

O alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), família Labiatae, originário das regiões do mediterrâneo (Sul da Europa e Norte da África) é conhecido popularmente como alecrim-rosmarinho, alecrim da horta e alecrim-de-jardim, constituindo-se numa planta semi-arbustiva, perene, lenhosa, ramificada, podendo atingir até 2 m de altura (Martins *et al.*, 1995). Desde a antiguidade a espécie é utilizada para fins medicinais, como estimulante digestivo, problemas respiratórios, cardiotônicos e outros; na confecção de incensos; como repelente doméstico de insetos e, atualmente,

destaca-se na indústria cosmética de perfumaria, e de produtos alimentícios. É uma espécie utilizada popularmente como diurética, emenagogo, antiespasmódico, cujos extratos aquosos não têm apresentado toxicidade para o homem, porém têm sido demonstrado que pode apresentar efeitos abortivos e/ou pode interferir no desenvolvimento do feto (Lemonica *et al.*, 1996).

O valor econômico do alecrim é atribuído à presença de óleos essenciais ou voláteis, que emanam das folhas e flores, conferindo-lhe forte odor canforáceo e sabor nitidamente fresco e picante. Os princípios ativos do óleo essencial são pineno, canfeno, borneol, acetato de bornila e cânfora, diterpeno (rosmaricina); além de apresentar taninos, saponina ácida, ácidos orgânicos, pigmentos e flavonóides (Panizza, 1997).

Quanto à atividade biológica, Almeida-Doria *et al.* (2000), observaram atividade antioxidante de extrato etanólico de *R. officinalis* em óleo de soja submetido à termoxidação. Segundo Freitas (2005), este óleo apresenta atividade larvicida contra larvas de *Aedes aegypti*, causando 100% de mortalidade na concentração  $2,5 \mu\text{LmL}^{-1}$  em 24 h.

## 2.6. Modo de ação de inseticidas e antimicrobianos

A busca de novas substâncias no controle de pragas, vetores de doenças e microrganismos requerem o conhecimento de seu mecanismo de ação para que seja possível identificar os alvos diretos ou indiretos, bioquímicos, celulares, dentre outros, com o intuito de avaliar sua toxicidade, sua especificidade, seu impacto ambiental, persistência no ambiente, dentre outros fatores.

Younis *et al.* (2002) verificaram que ATPases do tipo F (ATPsintases) são alvos da ação do inseticida DDT. Foi comparada a ação do DDT sobre ATPsintases dos insetos *Apis mellifera* e *Spodoptera littoralis* e também em mamíferos. Os resultados mostraram que este inseticida inibe fortemente a atividade da enzima dos insetos, o que não ocorreu com a atividade enzimática nos mamíferos.

Com relação aos inseticidas piretróides, derivados do piretro *Crysanthemum cinerariaefolium*, os quais apresentam natureza lipofílica, possuem capacidade de alteração das membranas biológicas. Em nível celular, os piretróides agem em uma grande variedade de sistemas bioquímicos e fisiológicos, sendo o canal de sódio da membrana neural o principal alvo dos piretróides em insetos (Kakko, 2004). Porém,

canais de sódio de mamíferos são menos sensíveis à ação de piretróides (Narahashi, 1996). Em mamíferos, ATPases parecem também estar envolvidas na ação neurotóxica de piretróides (Kakko *et al.*, 2003).

Segundo Polanczyk (2003), a atividade inseticida da bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Bti) se deve às proteínas tóxicas situadas em corpos paraesporais cristalinos. Após a ingestão, os cristais são dissolvidos no intestino médio das larvas e as protoxinas são liberadas. As proteases do intestino clivam as protoxinas e estas se tornam ativas (Glare e O'Callaghan, 2000). Estas toxinas passam pela membrana peritrófica, sendo reconhecidas por receptores específicos, presentes nas microvilosidades apicais do intestino médio. Após a ligação com o receptor, as toxinas criam poros, ocasionando quebra do equilíbrio osmótico da célula, que se entumesce e rompe. Este processo de lise do epitélio provoca o extravasamento do conteúdo intestinal para a hemocele do inseto. Assim, o inseto pára de se alimentar e morre por inanição ou septicemia, esta última sendo acarretada pela germinação de esporos, favorecida pelo abaixamento do pH do lúmen (Polanczyk, 2003).

Embora propriedades antimicrobianas, larvicidas e inseticidas de alguns óleos essenciais e de seus componentes sejam conhecidas, os mecanismos de ação não têm sido investigados em detalhes (Lambert *et al.*, 2001). Considerando o grande número de diferentes grupos de substâncias presentes nos óleos essenciais, é provável que suas atividades antimicrobianas, larvicidas e inseticidas não sejam atribuídas à um mecanismo específico, mas podem existir vários mecanismos tanto em microrganismos, quanto em insetos (Carson *et al.*, 2002). E ainda, os mecanismos provavelmente não atingem alvos individualmente, mas alguns, podem ser conseqüência de outros mecanismos (Burt, 2004). Os mecanismos de ação de óleos essenciais em microrganismos incluem a degradação da parede celular (Helander *et al.*, 1998), dano na membrana citoplasmática (Ultee *et al.*, 2002); dano em proteínas de membrana (Ultee *et al.*, 1999), perda de conteúdo celular (Lambert *et al.*, 2001), coagulação do citoplasma (Gustafson *et al.*, 1998) e depleção da força próton-motora (Ultee e Smid, 2001).

A avaliação do efeito do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* sobre *Escherichia coli*, por microscopia eletrônica, demonstrou perda de material eletrônico e coagulação de constituintes citoplasmáticos, embora estes efeitos possam ter sido decorrentes do evento de morte celular (Gustafson *et al.*, 1998). Este óleo



essencial também estimula a perda de íons potássio e provoca inibição respiratória em *Escherichia coli* (Cox *et al.*, 1998) e em *Staphylococcus aureus* (Cox *et al.*, 2000).

Óleos essenciais de *Cymbopogon citratus*, *Ocimum gratissimum* e de *Zingiber officinale* foram avaliados quanto ao seu mecanismo de ação contra a bactéria *Listeria innocua* e provocaram desestabilização da membrana, decréscimo no potencial de membrana e decréscimo no valor de pH (Nguefack *et al.*, 2004). Anteriormente, Ultee *et al.* (2002), hipotetizaram que o carvacrol, componente do óleo essencial de orégano, desestabiliza a membrana plasmática e, adicionalmente, age como um trocador de prótons, reduzindo, assim, o gradiente de pH através da membrana plasmática em microrganismos. Neste trabalho foi demonstrado que além do carvacrol, o seu precursor, o cymeno, se acumula na região hidrofóbica da membrana plasmática desestabilizando a membrana. Porém, esta desestabilização da membrana não explica a maior atividade antimicrobiana do carvacrol em relação ao cymeno, sugerindo que outro fator esteja envolvido na toxicidez. Foi demonstrado que o grupo hidroxila presente no carvacrol e ausente no cymeno, é essencial para a atividade antimicrobiana. O carvacrol age como um transportador de membrana, carreador de cátions monovalentes, pela troca do  $H^+$  por outro íon, como o  $K^+$  (Ultee *et al.*, 2002).

Kostyukovsky *et al.* (2002), mostraram que, em insetos, substâncias integrantes de óleos essenciais de espécies vegetais da família Labiatae agem como inibidores de acetilcolinesterases, além de afetarem receptores de octopamina (neurotransmissor, neuromodulador e neurohormônio em invertebrados).

### 3. Objetivos

#### 3.1. Objetivo Geral

Testar a hipótese de que existe relação do efeito larvicida causado pelos óleos essenciais de *C. citratus*, *A. speciosa*, *R. officinalis* e de seus principais componentes ativos em larvas de *Ae. aegypti* com a alteração da atividade das principais ATPases deste inseto, podendo, estas enzimas representar possíveis alvos moleculares destas substâncias.

#### 3.2. Objetivos Específicos

Avaliar atividade larvicida das substâncias comerciais citral,  $\beta$ -mirceno, cânfora,  $\alpha$ -pineno, e eucaliptol sobre larvas de *Aedes aegypti*.

Avaliar a atividade dos óleos essenciais de *Alpinia speciosa*, *Cymbopogon citratus* e *Rosmarinus officinalis* e das substâncias comerciais que apresentarem alta atividade larvicida sobre a atividade F-ATPásica, V-ATPásica e  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPásica de larvas de *Aedes aegypti*.

## 4. Materiais e Métodos

### 4.1. Material vegetal

Foram coletadas folhas das espécies vegetais *Alpinia speciosa*, *Cymbopogon citratus* e *Rosmarinus officinalis* na área da UAP – Unidade de Apoio a Pesquisa do CCTA (UENF), situada nas coordenadas geográficas 21°45'15" de latitude Sul e 41°19'28" de longitude Oeste, com altitude de 12 metros do nível do mar, em Campos dos Goytacazes, RJ. O material foi coletado nos meses de abril, maio e junho de 2005.

O material foi seco em estufa à 40° C durante 5 dias. Posteriormente, o material foi picado e foi realizada a extração do óleo essencial por arraste a vapor, em destilador tipo Clevenger (Marconi, modelo MA 553) durante 60 minutos de condensação, utilizando-se 60 g do vegetal e 1,3 L de água destilada. O óleo essencial foi armazenado em freezer (-20°C).

### 4.2. Quantificação do teor de citral e $\alpha$ -pineno nos óleos essenciais

A análise do teor das substâncias presentes nos óleos essenciais de *A. speciosa*, *C. citratus* e *R. officinalis* foi feita através de cromatografia gasosa (LCQUI/CCT/UENF).

Para quantificação do teor de citral no óleo essencial de *C. citratus* e de  $\alpha$ -pineno no óleo de *R. officinalis* e de *A. speciosa* utilizou-se uma curva de calibração. Os padrões citral e  $\alpha$ -pineno obtidos comercialmente (Sigma Aldrich®) foram diluídos em hexano, resultando nas concentrações de 10, 15, 20, 25, 30, 50 e 100  $\mu\text{L mL}^{-1}$  e 10, 20, 40, 80 e 160  $\mu\text{L mL}^{-1}$ , respectivamente. As condições de análise foram: coluna capilar DB5 de 30 m e 0,25 mm de diâmetro interno, temperatura do injetor 200° C, temperatura inicial da coluna de 50° C, temperatura final da coluna de 230° C, taxa de 15° C/ minuto, pressão inicial de 87,5 Kpa, pressão final de 171 KPa, taxa 7 KPa/minuto, temperatura do detector de 230° C, razão de *split* 1:20, *solvent cut* de 3 minutos.

### 4.3. *Aedes aegypti*

As larvas de *Aedes aegypti* foram obtidas do insetário do LBT/CBB, onde foram criadas à temperatura de 27° C e alimentadas com ração de camundongo. Os

mosquitos *Ae. aegypti* foram obtidos originalmente de uma colônia estabelecida na Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, pelo Dr. Ricardo L. de Oliveira.

#### **4.4. Ensaio de atividade larvicida**

A atividade larvicida dos padrões comerciais citral, cânfora, mirceno,  $\alpha$ -pineno,  $\gamma$ -terpineno e eucaliptol foram avaliadas em larvas de 3<sup>o</sup> e 4<sup>o</sup> estádios de desenvolvimento de *Ae. aegypti* e as concentrações utilizadas foram 0,25; 0,4; 0,5; 0,75; 1; 1,5  $\mu\text{LmL}^{-1}$ . Os compostos foram diluídos em DMSO 1%. Os ensaios foram realizados em placas de petri contendo 30 larvas em cada um, com um volume final de 20 mL. No controle foi adicionado apenas água destilada e DMSO 1%. Após 24 h, a concentração letal para matar 90% das larvas ( $\text{CL}_{90}$ ) e a concentração letal para matar 50% das larvas ( $\text{CL}_{50}$ ), foram determinadas usando o programa de análise de Probit (Throne *et al.*, 1995). Foram feitas 3 repetições de cada ensaio.

#### **4.5. Atividade ATPásica**

##### **4.5.1. Atividade ATPásica de larvas tratadas previamente ao isolamento**

###### **4.5.1.1. Preparação das amostras**

Os óleos essenciais (OE) de *Alpinia speciosa*, *Cymbopogon citratus* e de *Rosmarinus officinalis* e as substâncias comerciais citral e  $\alpha$ -pineno foram aplicadas na concentração de 0,5  $\mu\text{LmL}^{-1}$  diluídos em DMSO 1%, em recipientes contendo aproximadamente 400 larvas de *Ae. aegypti* de 3<sup>o</sup> e 4<sup>o</sup> estádios de desenvolvimento. Após 1h, aproximadamente, da aplicação dos óleos essenciais e de seus principais componentes, as larvas foram transferidas, ainda vivas, para tubos tipo *Eppendorfs* e foram pesadas totalizando 1g de larva por tratamento. Os tubos foram devidamente identificados e mantidos no gelo, constituindo as amostras para o isolamento de vesículas. As amostras controle constituíram-se de 400 larvas não tratadas.

#### 4.5.1.2. Isolamento de vesículas de membranas

As amostras de 1 g de larvas submetidas aos tratamentos com óleos essenciais (OE), com os padrões e o controle foram homogeneizadas em homegeneizador de vidro com pistilo de teflon (“potter”) em tampão de extração pH 7,0 (Sacarose 250 mM, Glicerol 10%, EDTA 5 mM, KCl 100 mM, Tris-HCl 100 mM, PVPP 0,4%, BSA 0,3%, DTT 0,08%, PMSF 1 mM, Benzamidina 1 mM).

Após maceração das larvas no tampão, o homogeneizado foi submetido à primeira centrifugação (centrífuga HITACHI Himac), à 1300 g, por 10 minutos, à 4<sup>o</sup> C, para eliminação de núcleos e de todas as impurezas. O precipitado foi descartado e o sobrenadante foi submetido à nova centrifugação (centrífuga HITACHI Himac CP, 85β) à 18000 g, por 15 minutos, à 4<sup>o</sup> C. O precipitado que corresponde às mitocôndrias, foi ressuspensão em 2 mL de meio de ressuspensão (Glicerol 10%, Tris-HCl 100 mM, EDTA 5 mM, PMSF 1 mM, Benzamidina 1 mM, DTT 0,03%). O sobrenadante foi submetido à outra centrifugação, nesta mesma centrífuga, à 100000 g, por 30 minutos, à 4<sup>o</sup> C, resultando em um precipitado, correspondente à fração microssomal, que contém as membranas plasmáticas, a qual também foi ressuspensa em 2 mL de meio de ressuspensão. As amostras foram mantidas em tubos eppendorffs criogênicos, os quais foram estocados a -70<sup>o</sup> C para análises posteriores.

#### 4.5.2. Atividade ATPásica de membranas de larvas tratadas após o isolamento

Cerca de 400 larvas de 3<sup>o</sup> e 4<sup>o</sup> estádios, mantidas em água e DMSO 1% foram transferidas vivas para tubos tipo *Eppendorfs*. Foram pesadas totalizando 1 g, e posteriormente foram homogeneizadas em homog-

Bradford e, após 10 minutos, foram realizadas as leituras de absorvância de cada amostra em espectrofotômetro (FEMTO 700 Plus) a 595 nm.

Em amostras diluídas 6 x foram adicionados 980 µL de corante Bradford para dosagem das proteínas das amostras de larvas de *Ae. aegypti*. Após 10 min foi realizada a leitura de absorvância a 595 nm.

#### **4.5.4. Efeito de óleos essenciais e monoterpenos sobre a hidrólise de ATP em membranas de larvas tratadas previamente ao isolamento**

As atividades ATPásicas de hidrólise foram determinadas por meio do conteúdo de fosfato inorgânico (Pi), liberado durante a hidrólise do ATP, utilizando-se espectrofotômetro (FEMTO 700 Plus) a 750 nm.

As atividades P-ATPásicas foram determinadas acrescentando-se 0,05 mg/mL de vesículas isoladas das larvas, à 2 mL de meio de reação contendo, na concentração final, os reagentes: tampão Hepes-Tris pH 7 (50mM), KCl (100 mM), MgSO<sub>4</sub> (5 mM), ATP (1 mM) e NaCl (0,12 M). O inibidor utilizado foi ortovanadato de sódio (0,2 mM). As atividades V-ATPásicas foram determinadas acrescentando-se 0,05 mg/mL de vesículas isoladas das larvas à 2 mL de meio de reação contendo, na concentração final, os reagentes: tampão Hepes-Tris pH 7,2 (50 mM), KCl (100 mM), MgSO<sub>4</sub> (5 mM), ATP (1 mM). O inibidor utilizado foi nitrato de potássio (100 mM) e concanamicina (0,1µM). As atividades F-ATPásicas foram determinadas acrescentando-se 0,05 mg/mL de vesículas ricas em mitocôndrias das larvas à 2 ml de meio de reação, contendo na concentração final, os reagentes: tampão Hepes-Tris pH 8 (50 mM), KCl (20 mM), MgSO<sub>4</sub> (5 mM), ATP (1 mM). O inibidor utilizado foi azida sódica (5 mM). Em cada bateria, a reação de hidrólise foi interrompida adicionando-se 200 µL de TCA 20% (ácido tricloroacético) aos 0, 10, 20, 30 e 40 minutos do seu início. Posteriormente, foi acrescentado 0,5 mL de solução corante em cada tubo, constituída por solução estoque (solução de molibdato de amônio-5% e ácido sulfúrico-2,06%) com ácido ascórbico (5%) na proporção 100:1. Após 10 minutos, foi realizada leitura da absorvância das amostras.

A hidrólise de ATP se refere às atividades totais das enzimas (não se adicionando qualquer inibidor); às atividades das enzimas insensíveis aos inibidores (cujas reações de hidrólise não são inibidas) e às atividades sensíveis das enzimas aos inibidores (calculada pela diferença entre as duas primeiras).

#### **4.5.5. Efeito dos óleos essenciais e monoterpenos sobre a hidrólise do ATP em membranas isoladas de larvas tratadas após o isolamento**

Os meios de reação tiveram as mesmas concentrações finais dos mesmos reagentes do ensaio realizado para determinação de hidrólise de ATP de amostras tratadas previamente ao isolamento. Diferentes concentrações (0; 1,0; 1,5; 2,5  $\mu\text{LmL}^{-1}$ ) de óleos essenciais e dos padrões citral e  $\alpha$ -pineno foram colocados em tubos de ensaio. Alíquotas provenientes dos meios de reação foram adicionadas nestes tubos de ensaio. As reações foram iniciadas com a proteína e interrompidas 20 minutos após seu início com TCA 20%. Posteriormente, foi acrescentado 0,5 mL de solução corante em cada tubo, constituída por solução estoque (solução de molibdato de amônio-5% e ácido sulfúrico-2,06%) com ácido ascórbico (5%) na proporção 100: 1. A leitura da absorbância das amostras foi realizada 10 minutos após o término.

#### **4.6. Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida**

As amostras de frações microssomais de larvas tratadas previamente ao isolamento foram primeiramente precipitadas com TCA 20%. Posteriormente as amostras foram levadas ao freezer por 15 minutos e após este tempo foram centrifugadas em centrífuga Eppendorf 5415C por 15 minutos a 16000 g. Os sobrenadantes foram descartados e os precipitados foram lavados com acetona 100%. As amostras foram levadas ao freezer novamente por 10 minutos. Após este tempo, foram centrifugadas por 10 minutos a 16000 g em centrífuga Eppendorf 5415C. O precipitado foi ressuspense em tampão de amostra (glicerol 10%, SDS 2,3%, bromofenol blue 0,1%, Hepes-tris 0,062% pH 6,8,  $\beta$ -mercaptoetanol e água). Então, foram aplicados no gel, 50  $\mu\text{g}$  de proteína de cada amostra. As eletroforeses desnaturantes foram realizadas em mini géis de poliacrilamida a 8%. O gel de separação continha acrilamida 30%; tampão Tris 1,5M pH 8,8; SDS 10%, APS 10%, Temed e água. O gel de empilhamento continha acrilamida 30 %; tampão Tris 1M pH 6,8; SDS 10%; APS 10%; Temed e água. Foram utilizadas cubas do tipo Bio-Rad Mini-Protean II<sup>tm</sup> System, com espaçador de 0,75 mm. As eletroforeses foram realizadas a temperatura ambiente a 100 V.

#### 4.7. Western blot

Para realizar a transferência das proteínas do gel para as membranas de nitrocelulose, foi utilizado o sistema de transferência da BIORAD, conforme instruções do fabricante. A transferência foi realizada em 2 horas, sendo iniciada em 70 mA e depois seguiu-se com 150 mA.

As membranas foram bloqueadas por 1 h no agitador com PBS (solução fisiológica contendo 150 mM de NaCl, 9,1 mM de fosfato de sódio dibásico e 1,7 mM de fosfato de sódio monobásico) com leite desnatado a 5 %. Posteriormente, as membranas foram incubadas, cada uma com um anticorpo primário diferente, diluídos em leite desnatado 3% com PBS (1: 1000). Os anticorpos utilizados foram (1) 353-2 contra o complexo  $V_1$  da  $V$   $H^+$ -ATPase e (2) C23 contra subunidade B do complexo  $V_1$  da  $V$   $H^+$ -ATPase. Em ambos os casos, o antígeno foi isolado de *Manduca sexta* no laboratório de Wieczorek, na Alemanha.

A incubação foi *overnight* na geladeira. Posteriormente, as membranas foram colocadas em um agitador por 30 minutos antes de iniciar as lavagens. As membranas foram lavadas por 1 hora com leite 5% com PBS, trocando-se a solução a cada 15 minutos. Após as lavagens, as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário Proteína A peroxidase, na diluição 1: 100 em leite 3% com PBS. Após incubação de 1 hora, as membranas foram lavadas com solução de leite 5% com PBS por 1 hora, trocando a solução a cada 15 minutos. A última lavagem foi realizada com PBS puro. A revelação foi feita com uma solução contendo: 400  $\mu$ L de Tris-HCl 1M, pH 7,5; 10 mg de DAB; 600  $\mu$ L de Imidazol 0,1M e água. Por último, 10  $\mu$ L de  $H_2O_2$  foi adicionado. Após a revelação, as membranas foram lavadas com água destilada e deixadas para secar.



## 5. Resultados

### 5.1. Teor de citral e $\alpha$ -pineno nos óleos essenciais

O teor de citral na amostra de óleo de *C. citratus* foi de 90% e o teor de  $\alpha$ -pineno foi de 20,5% no óleo de *R. officinalis* e de 7,5% no óleo de *A. speciosa*.

### 5.2. Ensaio de atividade larvicida

Os padrões comerciais citral,  $\beta$ -mirceno (substâncias presentes no óleo de *C. citratus*),  $\alpha$ -pineno, eucaliptol (substâncias presentes nos óleos de *R. officinalis* e de *A. speciosa*) e cânfora (substância presente no óleo de *R. officinalis*) foram avaliados quanto à toxicidade sobre larvas de 3º e 4º estádios de *Ae. aegypti*. O citral apresentou o maior potencial larvicida, causando 100% de mortalidade na concentração de  $1,5 \mu\text{LmL}^{-1}$  em 1 h de exposição. Em concentrações menores, as taxas de mortalidade foram crescentes no decorrer do tempo (Figura 7 A). O  $\alpha$ -pineno apresentou potencial larvicida intermediário (Figura 7 B). O eucaliptol provocou 70% de mortalidade das larvas na concentração de  $1,5 \mu\text{LmL}^{-1}$ , porém, no tempo de 24 horas (Figura 7 C). As substâncias  $\beta$ -mirceno e cânfora não apresentaram potencial larvicida, embora estejam presentes em altas concentrações nos óleos essenciais de *C. citratus* e *R. officinalis*, respectivamente (dados não mostrados). O citral apresentou  $\text{LC}_{50}$  de  $0,64 \mu\text{LmL}^{-1}$  e  $\text{LC}_{90}$  de  $0,92 \mu\text{LmL}^{-1}$ . O  $\alpha$ -pineno apresentou de  $\text{LC}_{50}$  de  $1,13 \mu\text{LmL}^{-1}$  e  $\text{LC}_{90}$  de  $2,18 \mu\text{LmL}^{-1}$ . O eucaliptol apresentou baixas taxas de mortalidade, não sendo calculados os valores de  $\text{LC}_{50}$  e  $\text{LC}_{90}$ .

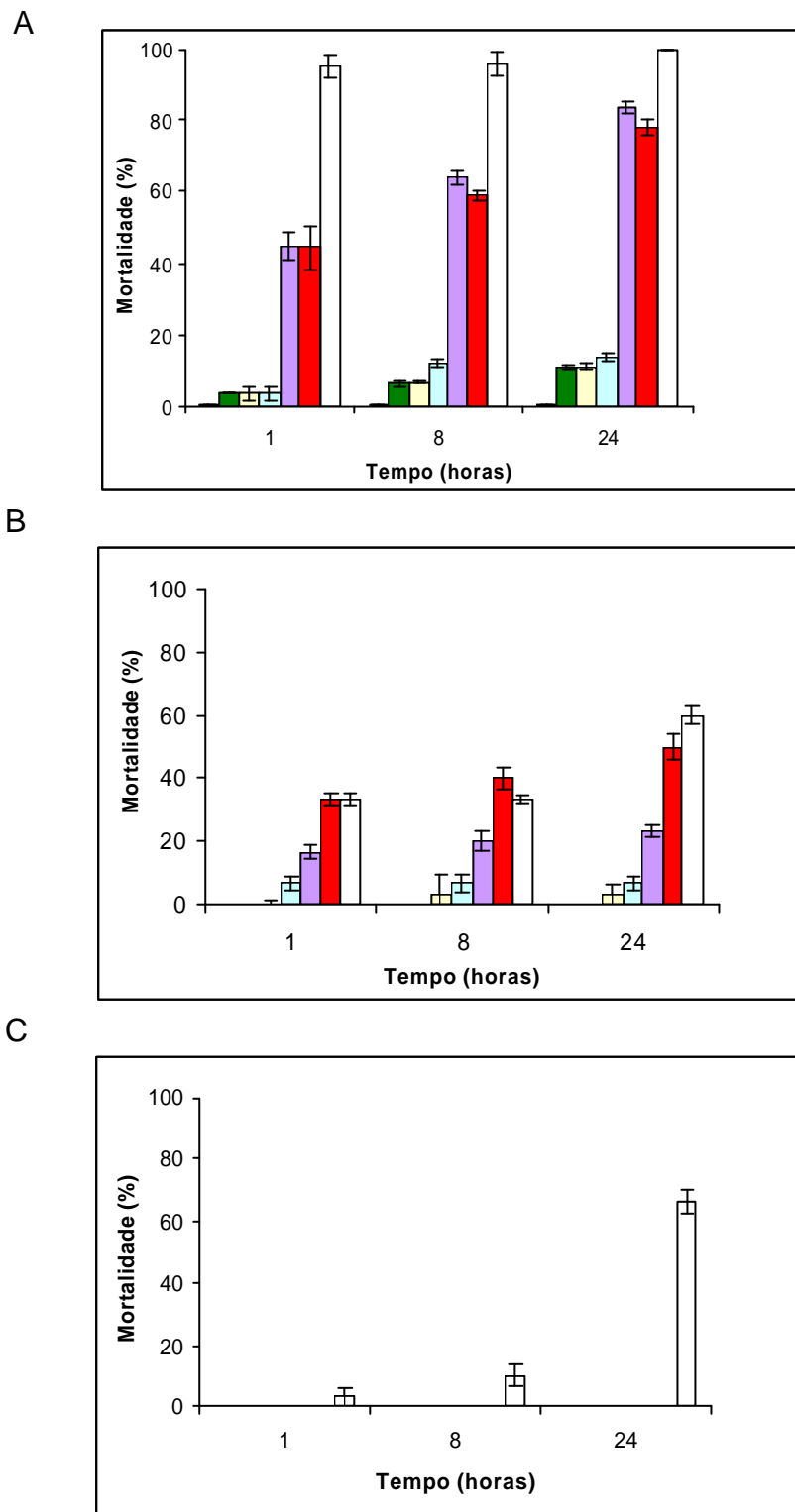


Figura 7. Mortalidade em relação ao tempo, de larvas *Ae. aegypti* de 3<sup>o</sup> e 4<sup>o</sup> estádios submetidas a diferentes concentrações de Citral (A),  $\alpha$ -pineno (B), Eucaliptol (C). Concentrações ( $\mu\text{LmL}^{-1}$ ): ■ controle; ■ 0,25; ■ 0,4; ■ 0,5; ■ 0,75; ■ 1,0; ■ 1,5) Os dados são representativos de 3 repetições e as barras representam o erro padrão.

### 5.3. Efeito de óleos essenciais e monoterpenos sobre a hidrólise de ATP em membranas de larvas tratadas previamente ao isolamento

No intuito de se iniciar a busca de possíveis alvos moleculares destes óleos essenciais em larvas de *Ae. aegypti* foram avaliadas as hidrólises de ATP nas larvas tratadas com estas substâncias, testando a hipótese de que os principais sistemas de transporte iônico ativo das larvas poderiam constituir alvos potenciais.

Nas atividades totais referentes à fração mitocondrial, o óleo essencial de *C. citratus* e o seu principal componente, o citral, inibiram a atividade enzimática em relação ao controle (Figura 8 e Tabela 1). Os óleos essenciais de *R. officinalis*, *A. speciosa* e o  $\alpha$ -pineno, ativaram a atividade enzimática (Figura 8 e Tabela 1). De acordo com o teste de Tukey, as atividades enzimáticas das larvas tratadas com *C. citratus* e citral diferiram das atividades das larvas tratadas com *A. speciosa* e *R. officinalis*, mas não houve diferenças de cada um destes tratamentos em relação ao controle (tabela 7). Em relação à atividade F-ATPásica (sensível à azida), o óleo de *C. citratus* e o citral inibiram a atividade (Figura 9 e Tabela 2). Os óleos de *A. speciosa*, *R. officinalis* e o  $\alpha$ -pineno ativaram a atividade F-ATPásica em relação ao controle (Figura 9 e Tabela 2). De acordo com o teste de Tukey não houve diferenças significativas nas atividades enzimáticas entre os tratamentos (tabela 7).

As atividades totais referentes às frações microssomais foram inibidas por todos as substâncias em questão. O óleo essencial de *C. citratus*, assim como seu princípio ativo, citral, foram as substâncias mais efetivas, inibindo 64% e 56%, respectivamente (Figura 10 e tabela 3). De acordo com o teste de Tukey houve diferença significativa apenas das atividades referentes aos tratamentos com *C. citratus* e com citral em relação ao controle (tabela 7). Assim como nas atividades totais, todos os componentes avaliados inibiram a atividade  $VH^+$ -ATPásica, sendo o óleo essencial de *C. citratus* e seu princípio ativo, citral, os mais efetivos, inibindo 58% e 48%, respectivamente (Figura 11 e Tabela 4). Porém apenas o tratamento com *C. citratus* foi significativo estatisticamente (tabela 7).

O óleo essencial de *C. citratus* e o citral provocaram inibição na atividade total referente à fração microssomal contendo  $Na^+$  no meio de reação. O óleo essencial de *A. speciosa*, *R. officinalis* e o  $\alpha$ -pineno provocaram ativação das atividades totais (Figura 12 e Tabela 5). Os tratamentos com *C. citratus* e citral foram iguais estatisticamente e diferiram do controle e dos demais tratamentos (tabela 7). Nas

atividades  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  - ATPásicas, não houve diferenças entre as atividades com os tratamentos em questão (Figura 13, Tabela 6 e Tabela 7).

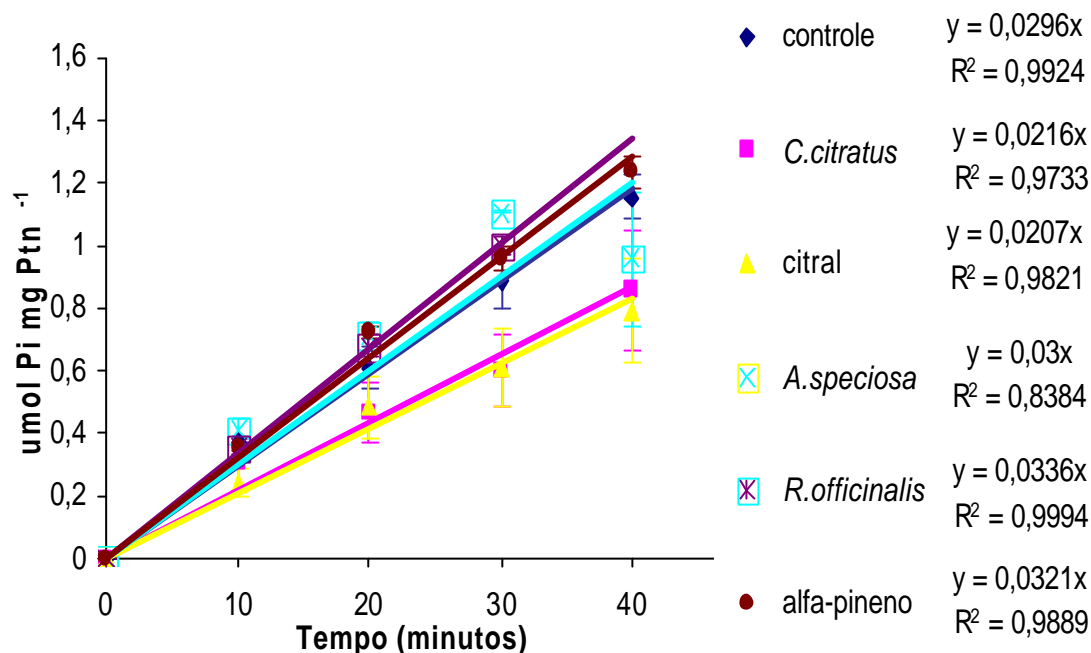


Figura 8. Hidrólise das atividades ATPásicas totais referentes às frações mitocondriais de larvas de *Ae. aegypti*. Controle (◆), larvas tratadas com  $0,5 \mu\text{LmL}^{-1}$  de óleo essencial de *C. citratus* (■), de citral (▲), de óleo essencial de *A. speciosa* (⊠) de óleo essencial de *R. officinalis* (⊗) e de  $\alpha$ -pineno (●). Os dados são representativos de 3 repetições e as barras representam o erro padrão.

Tabela 1-Percentagens de inibição ou ativação das atividades ATPásicas totais referentes às frações mitocondriais, em relação ao controle, promovidas pelos óleos essenciais de *A. speciosa*, *C. citratus*, *R. officinalis* e pelos componentes citral e  $\alpha$ - pineno após 30 minutos do início da reação.

Composto	Inibição (%)	Ativação (%)
Óleo essencial <i>C. citratus</i>	33	0
Citral	32	0
Óleo essencial de <i>A. speciosa</i>	0	25
Óleo essencial de <i>R. officinalis</i>	0	13
$\alpha$ -pineno	0	8

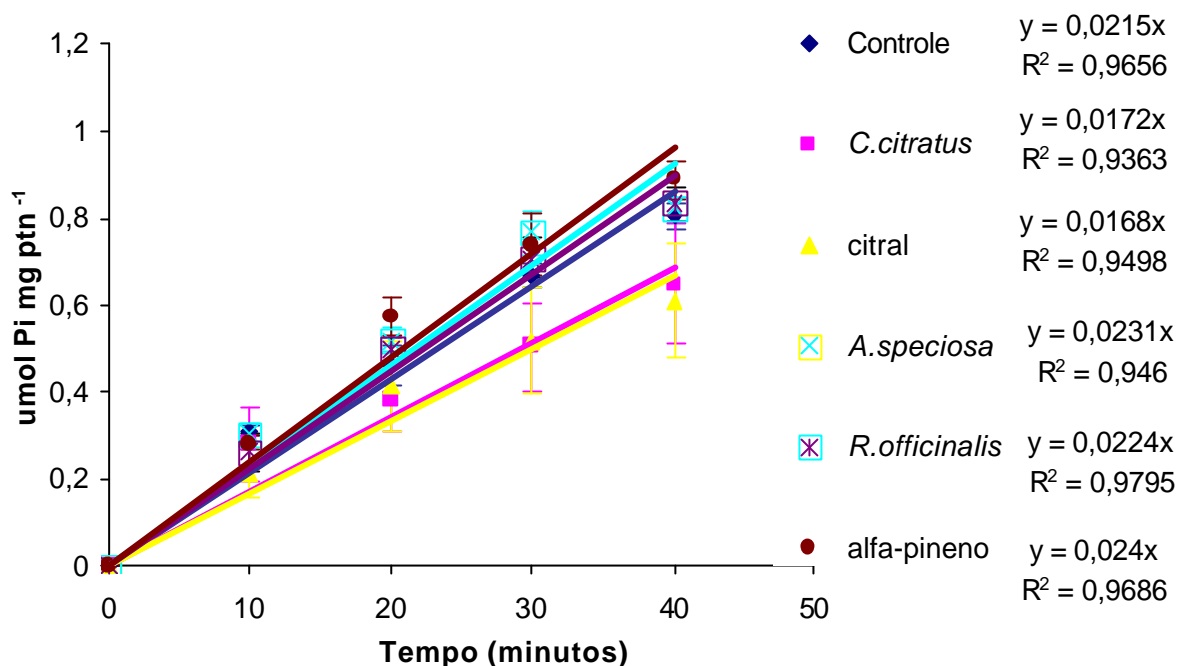


Figura 9. Hidrólise da atividade F-ATPásica de larvas de *Ae. aegypti*. Controle (◆), larvas tratadas com  $0,5 \mu\text{LmL}^{-1}$  de óleo essencial de *C. citratus* (■), de citral (▲), de óleo essencial de *A. speciosa* (⊠), de óleo essencial de *R. officinalis* (⊞) e de  $\alpha$ -pineno (●).

Tabela 2-Percentagens de inibição ou ativação das atividades F-ATPásicas, em relação ao controle, promovidas pelos óleos essenciais de *A. speciosa*, *C. citratus*, *R. officinalis* e pelos componentes citral e  $\alpha$ -pineno após 30 minutos do início da reação.

Composto	Inibição (%)	Ativação (%)
Óleo essencial <i>C. citratus</i>	18	0
Citral	15	0
Óleo essencial de <i>A. speciosa</i>	0	25
Óleo essencial de <i>R. officinalis</i>	0	16
$\alpha$ -pineno	0	21

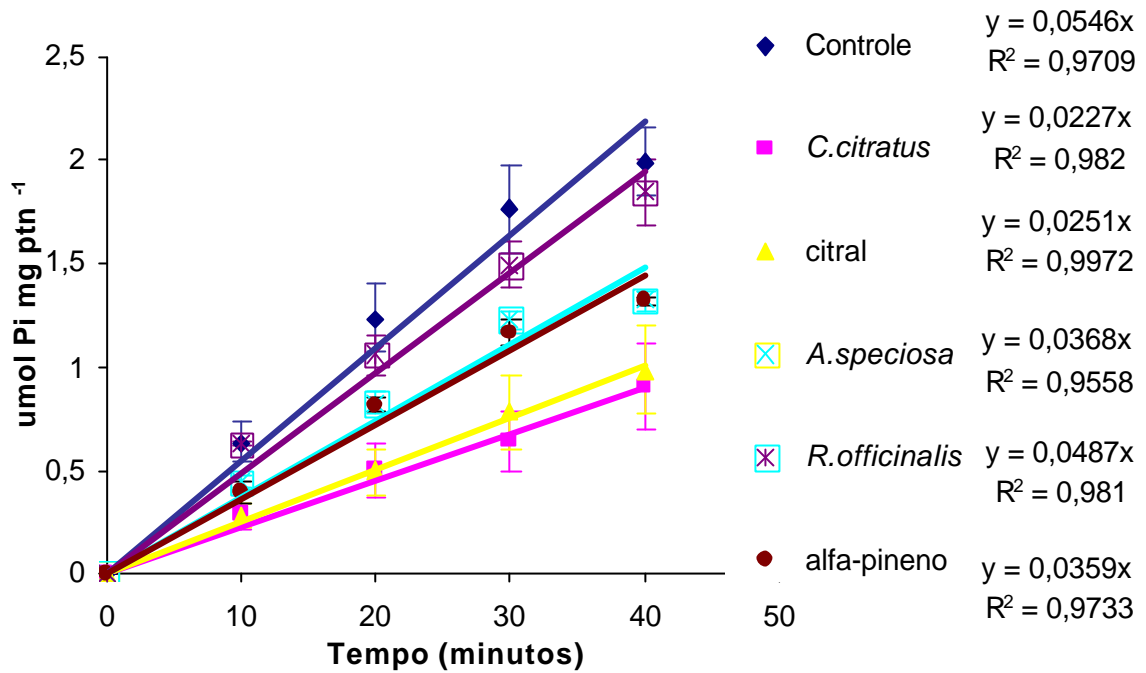


Figura 10. Hidrólise das atividades ATPásicas totais referentes às frações microssomais de larvas de *Ae. aegypti*. Controle (♦), larvas tratadas com  $0,5 \mu\text{LmL}^{-1}$  de óleo essencial de *C. citratus* (■), com citral (▲), com óleo essencial de *A. speciosa* (⊗), com óleo essencial de *R. officinalis* (⊗) e com  $\alpha$ -pineno (●).

Tabela 3-Percentagens de inibição das atividades ATPásicas totais referentes à frações microssomais em relação ao controle, promovidas pelos óleos essenciais de *A. speciosa*, *C. citratus*, *R. officinalis* e pelos componentes citral e  $\alpha$ -pineno, após 30 minutos do início da reação.

Composto	Inibição (%)
Óleo essencial <i>C. citratus</i>	64
Citral	56
Óleo essencial de <i>A. speciosa</i>	30
Óleo essencial de <i>R. officinalis</i>	15
$\alpha$ -pineno	34

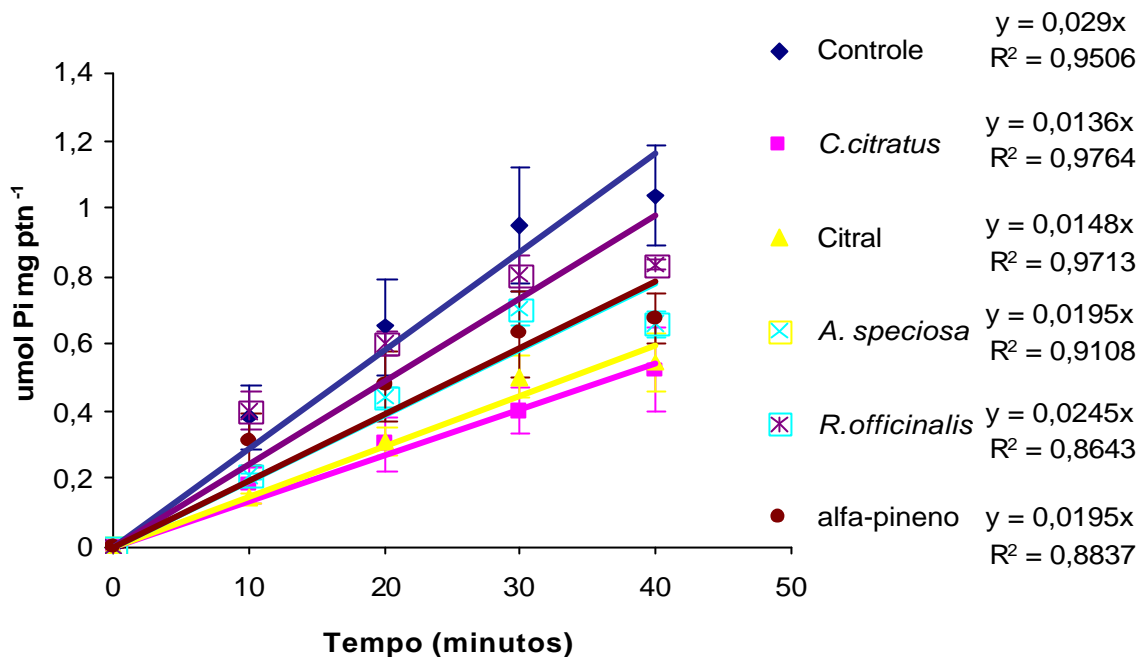
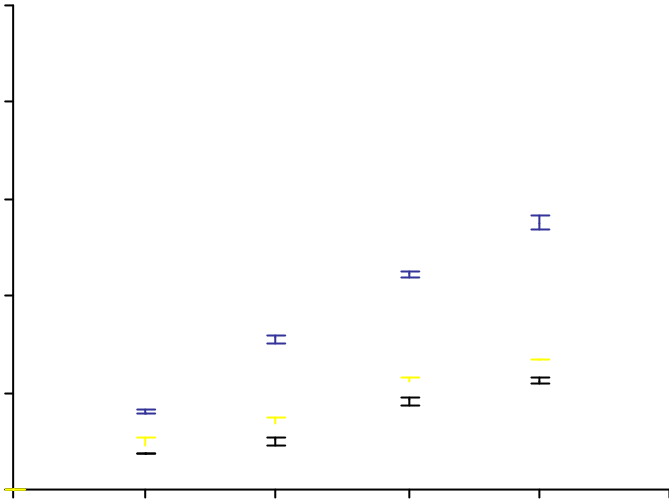


Figura 11. Hidrólise da atividade V-ATPásica de larvas de *Ae. aegypti*. Controle (◆), larvas tratadas com  $0,5 \mu\text{LmL}^{-1}$  de óleo essencial de *C. citratus* (■), com citral (▲), com óleo essencial de *A. speciosa* (×), com óleo essencial de *R. officinalis* (\*) e com  $\alpha$ -pineno (◆).

Tabela 4-Percentagens de inibição das atividades V-ATPásicas em relação ao controle, promovidas pelos óleos essenciais de *A. speciosa*, *C. citratus*, *R. officinalis* e pelos componentes citral e  $\alpha$ - pineno, após 30 minutos do início da reação.

composto	Inibição (%)
Óleo essencial <i>C. citratus</i>	58
Citral	48
Óleo essencial de <i>A. speciosa</i>	26
Óleo essencial de <i>R. officinalis</i>	15
$\alpha$ -pineno	34





$y = 0,0181x$   
R

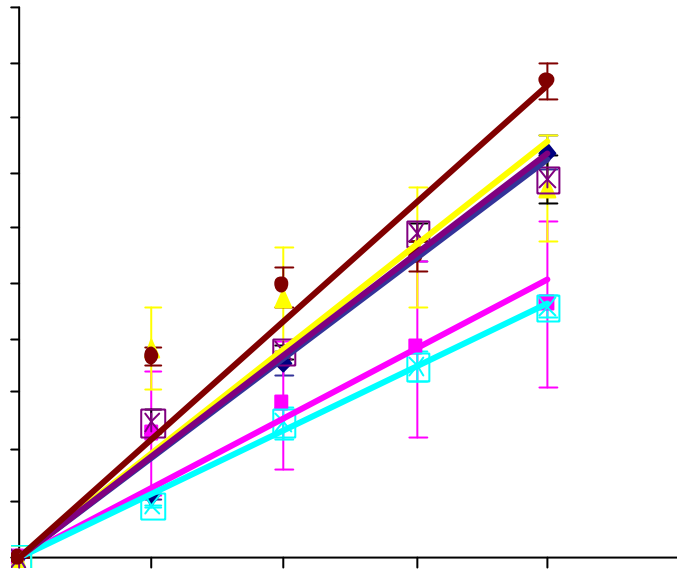


Tabela 7 Comparação de atividades enzimáticas (%) de frações microssomais obtidas de larvas de *Ae. aegypti*. Controle (não tratadas); larvas tratadas com óleo essencial de *C. citratus*; tratadas com citral; tratadas com óleo de *A. speciosa*; tratadas com óleo de *R. officinalis* e tratadas com  $\alpha$ -pineno

Tratamentos	Atividade total	Atividade F-ATPásica	Atividade total	Atividade V-ATPásica	Atividade total	Atividade Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPásica
Controle	100ab	100a	100a	100a	100b	100a
<i>C. citratus</i>	67,5b	82,2a	36,3b	42b	41,3c	68,4a
Citral	68,8b	84,7a	44,2b	52,9ab	50,8c	101,3a
<i>A. speciosa</i>	124,8a	124,9a	69,5ab	74,2ab	106,5b	63a
<i>R. officinalis</i>	112,6a	115,7a	85a	85ab	114,5ab	106a
$\alpha$ -pineno	108,4ab	120,7a	65,7ab	66,2ab	130a	98a

As mesmas letras na mesma coluna não diferem entre si, de acordo com o teste de Tukey a 0,05 de significância.

#### 5.4. Efeito dos óleos essenciais e monoterpenos sobre a hidrólise do ATP em membranas isoladas de larvas tratadas após o isolamento

Em geral, as atividades totais relativas às frações mitocondriais foram pouco afetadas pelos óleos essenciais e também pelos padrões citral e  $\alpha$ -pineno. Em todos os tratamentos, a percentagem da atividade hidrolítica diminuiu proporcionalmente ao aumento da concentração. O óleo de *C. citratus* e o citral provocaram queda da atividade em 32% e 23%, na concentração 2,5  $\mu\text{LmL}^{-1}$ , respectivamente (Figura 14). O óleo de *R. officinalis* e o  $\alpha$ -pineno também seguiram o mesmo padrão, inibindo 16% e 46%, respectivamente (Figura 14). O óleo de *A. speciosa* inibiu apenas 8% da atividade hidrolítica total (Figura 14).

De acordo com o teste de Tukey à 0,05 de significância, não houve diferença significativa entre as atividades enzimáticas referentes às diferentes concentrações dos compostos citral, óleo de *A. speciosa* e óleo de *R. officinalis*. Os óleos de *C. citratus* e o  $\alpha$ -pineno promoveram diferenças significativas nas atividades hidrolíticas, ocorrendo aumento da inibição com o aumento da concentração (Tabela 8).

Em relação às atividades F-ATPásicas, o óleo de *C.citratu*s não promoveu alterações nas atividades enzimáticas de acordo com o teste de Tukey (Figura 15 e Tabela 9). O citral, na concentração de  $1,0 \mu\text{LmL}^{-1}$  ativou a atividade e, em seguida inibiu, alcançando inibição de cerca de 25% na maior concentração ( $2,5 \mu\text{LmL}^{-1}$ ). O óleo de *A. speciosa* e o óleo de *R. officinalis* praticamente não alteraram a atividade em questão e assim também não houve diferenças significativas entre as atividades nas diferentes concentrações destes óleos. O  $\alpha$ -pineno foi a substância mais efetiva em inibição (47%) (Figura 15). Neste caso, houve diferenças significativas nas atividades nas diferentes concentrações do composto (Tabela 9).

Nas atividades totais relativas às frações microssomais, todas as substâncias inibiram a atividade. O *C. citratu*s, porém, ao contrário das demais substâncias, não promoveu diferenças significativas nas diferentes concentrações (tabela 10). O citral, o óleo de *A. speciosa*, o óleo de *R. officinalis* e o  $\alpha$ -pineno inibiram cerca de 50%, 32%, 30% e 74% das atividades, respectivamente (Figura 16 e Tabela 10).

Com relação às atividades V-ATPásicas, o óleo de *C. citratu*s, o citral e o óleo de *R. officinalis* não promoveram diferenças significativas entre as diferentes concentrações (Tabela 11). O óleo de *A. speciosa* e o  $\alpha$ -pineno inibiram a atividade em cerca de 50% e 70%, respectivamente, na concentração de  $2,5 \mu\text{LmL}^{-1}$  (Figura 17 e Tabela 11).

Em relação à atividade total referente à fração microssomal contendo  $\text{Na}^+$  no meio de reação, os óleos de *C. citratu*s, de *A. speciosa* e de *R. officinalis* não promoveram diferenças significativas entre as diferentes concentrações (Figura 18 e Tabela 12). O citral provocou uma ativação de 21% da atividade e o  $\alpha$ -pineno provocou queda drástica na atividade hidrolítica de 73% (Figura 18).

Nas atividades  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPásicas, o *C.citratu*s e o citral provocaram efeitos opostos. Enquanto o *C. citratu*s inibiu fortemente a atividade (74,3%), o citral ativou (22%) nas maiores concentrações ( $1,5\mu\text{LmL}^{-1}$  e  $2,5 \mu\text{LmL}^{-1}$ ). O citral, diferentemente do *C. citratu*s, não promoveu diferenças significativas nas diferentes concentrações (Tabela 13). O óleo de *A.speciosa* também não promoveu diferenças significativas nas atividades entre as diferentes concentrações, ao contrário do óleo de *R. officinalis* , que inibiu cerca de 35% e o  $\alpha$ -pineno que inibiu cerca de 49% da atividade, ambos na maior concentração (Figura 19 e Tabela 13).

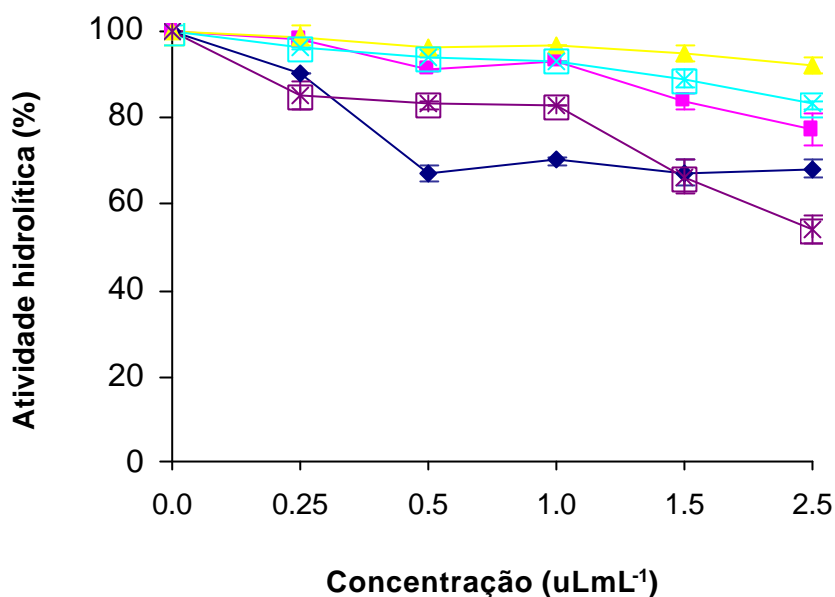


Figura 14. Percentagem de atividade hidrolítica total referente à fração mitocondrial de larvas de *Ae. aegypti* submetidas a diferentes concentrações do óleo essencial de *C. citratus* (◆), de citral (■), de óleo essencial de *A. speciosa* (▲), de óleo essencial de *R. officinalis* (×), de α-pineno (\*).

Tabela 8-Comparação de atividades enzimáticas totais (%) referentes às frações mitocondriais obtidas de larvas de *Ae. aegypti* submetidas à diferentes concentrações (0; 0,25; 0,5; 1,0; 1,5; 2,5  $\mu\text{LmL}^{-1}$ ) de óleo essencial de *C. citratus*, citral, óleo de *A. speciosa*, óleo de *R. officinalis* e α-pineno.

	Atividade ATPásica total (%)					
	0	0.25	0.5	1.0	1.5	2.5
<i>C. citratus</i>	100a	89,8a	67,2b	70,4b	66,7b	67,8b
Citral	100a	98,4a	91,4a	92,6a	84a	76,6a
<i>A. speciosa</i>	100a	99a	96a	97,6a	95,6a	92a
<i>R. officinalis</i>	100a	95,6a	94,3a	92,7a	89a	83,7a
α-pineno	100a	85ab	82,5ab	82ab	66bc	54,4c

As mesmas letras na mesma linha não diferem entre si, de acordo com o teste de Tukey à 0,05 de significância.

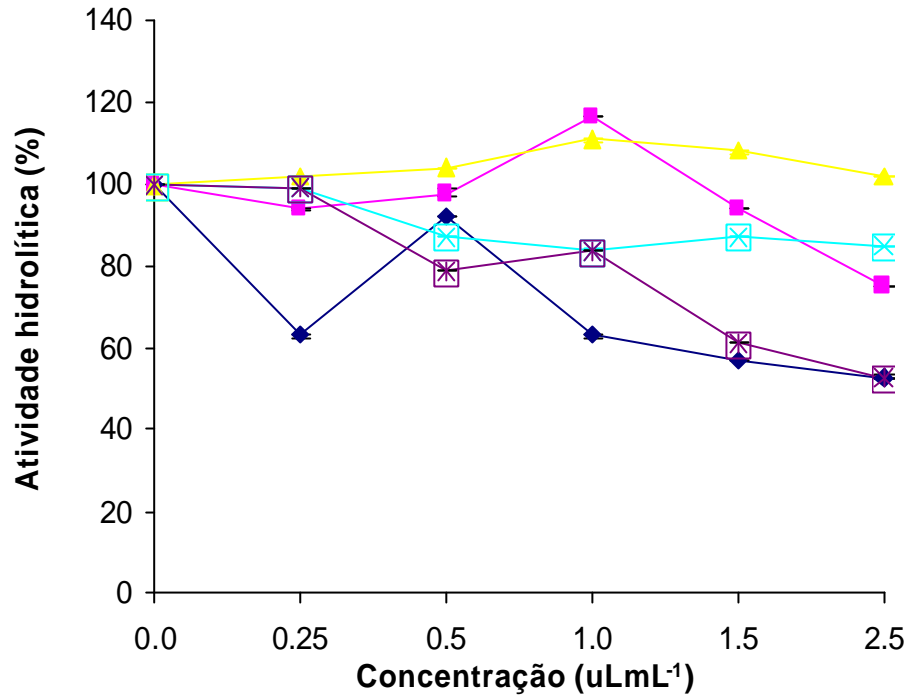
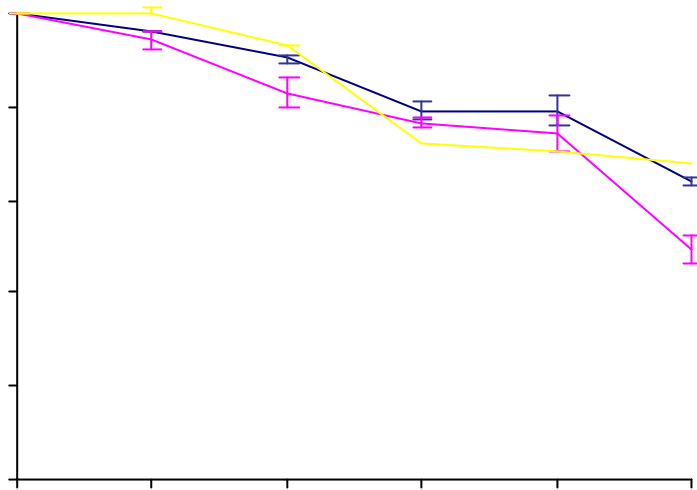


Figura 15. Percentagem de atividade hidrolítica F-ATPásica de larvas de *Ae.aegypti* submetidas a diferentes concentrações do óleo essencial de *C. citratus* (♦), de citral (F



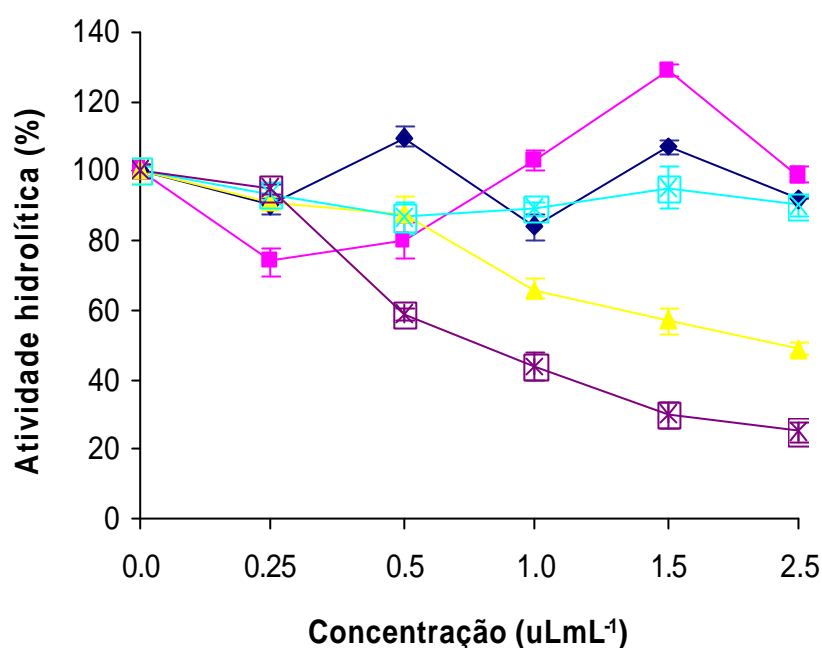


Figura 17. Percentagem de atividade hidrolítica V H<sup>+</sup>-ATPásica de larvas de *Ae.aegypti* submetidas a diferentes concentrações do óleo essencial de *C.citratus* (◆), de citral (■), de óleo essencial de *A. speciosa* (?), de óleo essencial de *R. officinalis* (x) e de α-pineno (\*).

Tabela 11 Comparação de atividades enzimáticas VH<sup>+</sup>-ATPásicas (%) de frações microsossomais obtidas de larvas de *Ae. aegypti* submetidas à diferentes concentrações (0; 0,25; 0,5; 1,0; 1,5; 2,5 μLmL<sup>-1</sup>) de óleo essencial de *C. citratus*, citral; óleo de *A. speciosa*, óleo de *R. officinalis* e α-pineno.

	Atividade V-ATPásica (%)					
	0	0.25	0.5	1.0	1.5	2.5
<i>C. citratus</i>	100a	89,5a	110a	84,3a	107a	91,5a
Citral	100a	74,4a	80a	103,5a	129a	99a
<i>A. speciosa</i>	100a	91a	88ab	66,4abc	56,7bc	49,2c
<i>R. officinalis</i>	100a	93,5a	86,5a	89a	95a	90,3a
α-pineno	100a	95a	59ab	42,5b	29,7b	25b

As mesmas letras na mesma linha não diferem entre si, de acordo com o teste de Tukey à 0,05 de significância.

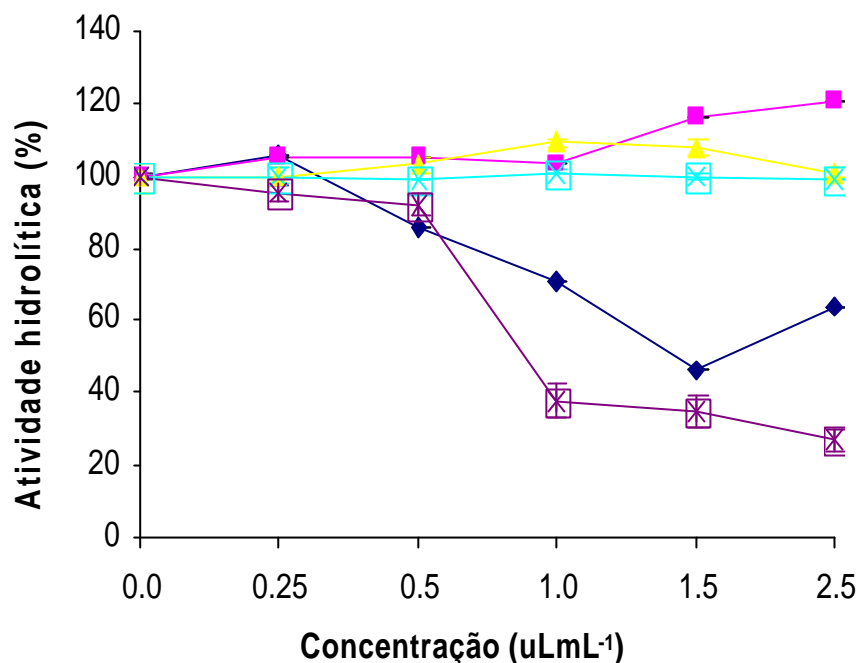


Figura 18. Percentagem de atividade hidrolítica total referente à fração microsomal contendo Na<sup>+</sup> no meio de reação de larvas de *Ae. aegypti* submetidas a diferentes concentrações do óleo essencial de *C. citratus* (◆), de citral (■), óleo essencial de *A. speciosa* (▲), de óleo essencial de *R. officinalis* (×) e de α-pineno (\*).

Tabela 12 Comparação de atividades enzimáticas totais (%) referentes às frações microsomais contendo Na<sup>+</sup> no meio de reação, obtidas de larvas de *Ae. aegypti* submetidas à diferentes concentrações (0; 0,25; 0,5; 1,0; 1,5; 2,5 μLmL<sup>-1</sup>) de óleo essencial de *C. citratus*, citral; óleo de *A. speciosa*, óleo de *R. officinalis* e α-pineno

	Atividade ATPásica total (%)					
	0	0.25	0.5	1.0	1.5	2.5
<i>C. citratus</i>	100ab	106,4a	86ab	71abc	45,7c	64,2bc
Citral	100b	105ab	104,5b	103,7b	116ab	121a
<i>A. speciosa</i>	100a	99,6a	103a	108a	106a	101a
<i>R. officinalis</i>	100a	100a	99a	101,6a	101a	99a
α-pineno	100a	95a	92a	38b	35b	27c

As mesmas letras na mesma linha não diferem entre si, de acordo com o test Tukey à 0,05 de significância.



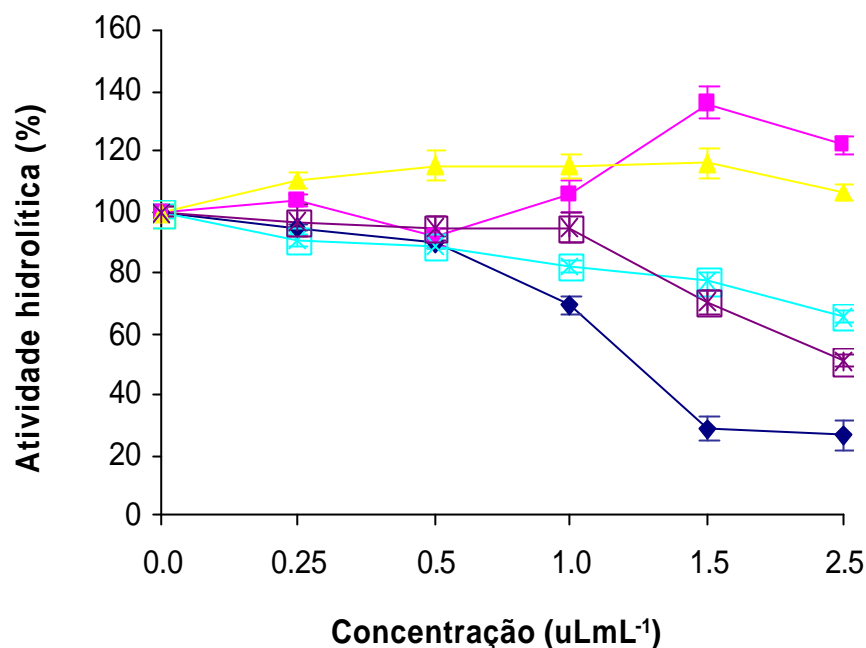


Figura 19. Percentagem de atividade hidrolítica Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPásica de larvas de *Ae. aegypti* submetidas a diferentes concentrações do óleo essencial de *C. citratus* (♦), de citral (■), de óleo essencial de *A. speciosa* (▲), de óleo essencial de *R. officinalis* (×) e de α-pineno (\*).

Tabela 13 Comparação de atividades enzimáticas Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPásicas (%) de frações microsossomais obtidas de larvas de *Ae. aegypti* submetidas à diferentes concentrações (0; 0,25; 0,5; 1,0; 1,5; 2,5 μLmL<sup>-1</sup>) de óleo essencial de *C. citratus*, citral; óleo de *A. speciosa*, óleo de *R. officinalis* e α-pineno

	Atividade Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPásica (%)					
	0	0.25	0.5	1.0	1.5	2.5
<i>C. citratus</i>	100a	95ab	90ab	69,2b	27,7c	25,7c
Citral	100a	104a	92,4a	107a	137a	122a
<i>A. speciosa</i>	100a	110a	115a	111a	116a	106a
<i>R. officinalis</i>	100a	91,2ab	89ab	80bc	74,7cd	65d
α-pineno	100a	97a	95a	95a	70b	51c

As mesmas letras na mesma linha não diferem entre si, de acordo com o test Tukey à 0,05 de significância.

### 5.5. Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida

Na eletroforese realizada utilizando frações microssomais obtidas do isolamento de larvas de *Ae. aegypti* tratadas previamente com os óleos essenciais de *A. speciosa*, *C. citratus*, *R. officinalis* e os padrões citral e  $\alpha$ -pineno foram observados diferentes padrões de expressão protéica das amostras (Figura 20). Uma proteína de 203 kDa foi visualizada nas raias 2, 4, 5 e 6, enquanto na raia 1 (controle) e na raia 3 esta proteína não está presente ou aparece num sinal bem fraco. Uma outra proteína de 160 kDa foi visualizada de forma bem diferenciada nas raias 5 e 6. Ao contrário, uma proteína de 72 kDa foi fortemente visível nas raias 1, 2, 3 e 4, enquanto nas raias 5 e 6 aparece apenas fracamente. Outras duas proteínas de 47 kDa e 41 kDa foram visíveis mais fortemente nas raias 5 e 6 em relação às outras amostras.

De acordo com análise de densitometria foi confirmada a diferença do padrão de expressão protéica das bandas de 203, 160, 72, 47 e 41 kDa nas amostras tratadas com óleo essencial de *C. citratus*, seu principal componente ativo, citral, óleo de *A. speciosa*, óleo de *R. officinalis* e  $\alpha$ -pineno (componente presente nos óleos de *A. speciosa* e *R. officinalis*) em relação ao controle (Figura 21).

### 5.7. Western blot

A análise do Western blot de frações microssomais de larvas de *Ae. aegypti* mostrou que o anticorpo 353-2 contra proteínas do complexo  $V_1$  citoplasmático identificou 5 proteínas com as seguintes massas moleculares: 16,0; 21,0; 38,0; 44,0 e 56,0 kDa (Figura 22).

A Figura 23 apresenta comparações da identificação molecular com o anticorpo 353-2 de V-ATPases entre as amostras, obtido a partir de análises de densitometria.

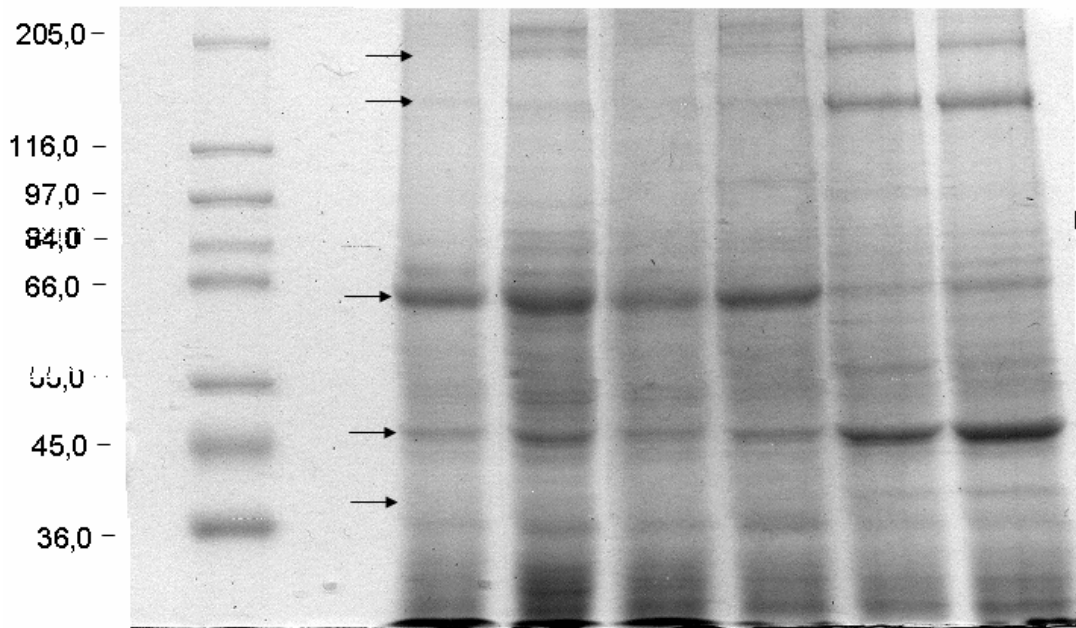


Figura 20. Identificação molecular da expressão protéica de frações microsossomais de larvas de *Ae.aegypti*. (1) fração microsossomal de larvas controle; (2) fração microsossomal de larvas tratadas com óleo essencial de *R. officinalis*; (3) fração microsossomal de larvas tratadas com óleo essencial de *A.speciosa*; (4) fração microsossomal de larvas tratadas com *C.citratu*s; (5) fração microsossomal de larvas tratadas com citral; (6) fração microsossomal de larvas tratadas com  $\alpha$ -pineno.

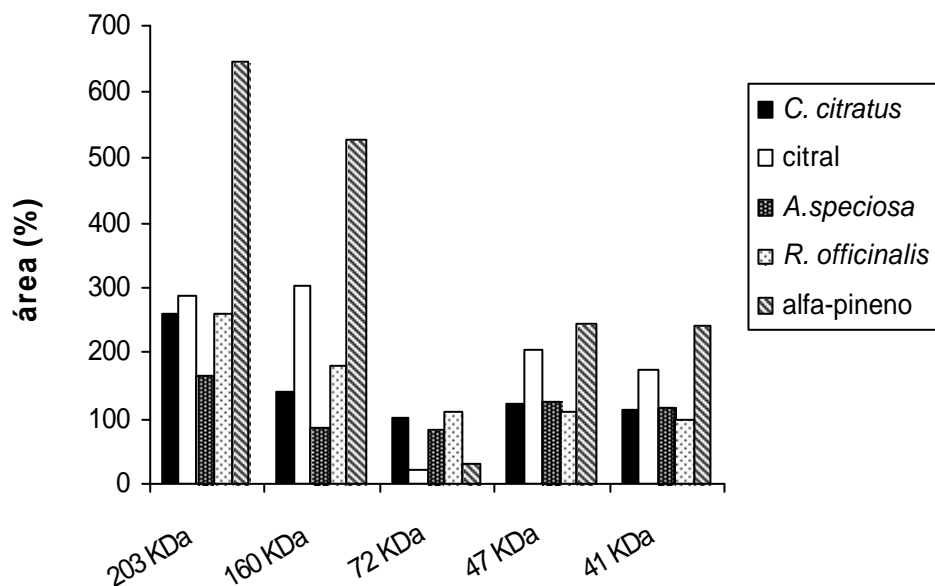


Figura 21. Análise de densitometria do padrão de expressão protéica obtido por eletroforese em gel de poliacrilamida (8%) de amostras de frações microsossomais de larvas tratadas com óleo de *C. citratus*, citral, óleo de *A. speciosa*, óleo de *R. officinalis* e  $\alpha$ -pineno

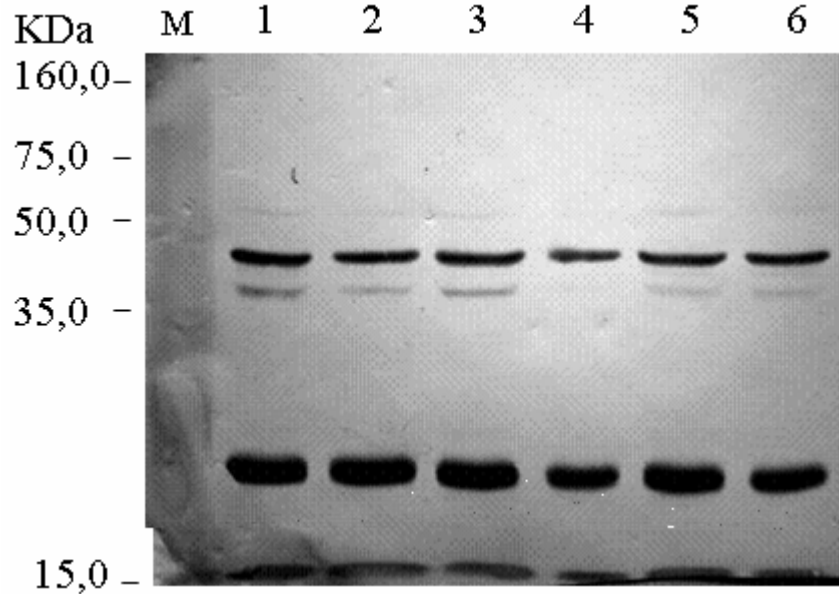


Figura 22. Identificação molecular de  $VH^+$ -ATPase em larvas de *Ae.aegypti* por western blot utilizando o anticorpo Ab 353-2 contra o complexo  $V_1$  de  $VH^+$ -ATPase de *Manduca sexta*: (M) padrão molecular; (1) fração microssomal de larvas controle; (2) fração microssomal de larvas tratadas com óleo essencial de *R. officinalis*; (3) fração microssomal de larvas tratadas com óleo essencial de *A.speciosa*; (4) fração microssomal de larvas tratadas com *C.citratu*s; (5) fração microssomal de larvas tratadas com citral; (6) fração microssomal de larvas tratadas com  $\alpha$ -pineno.

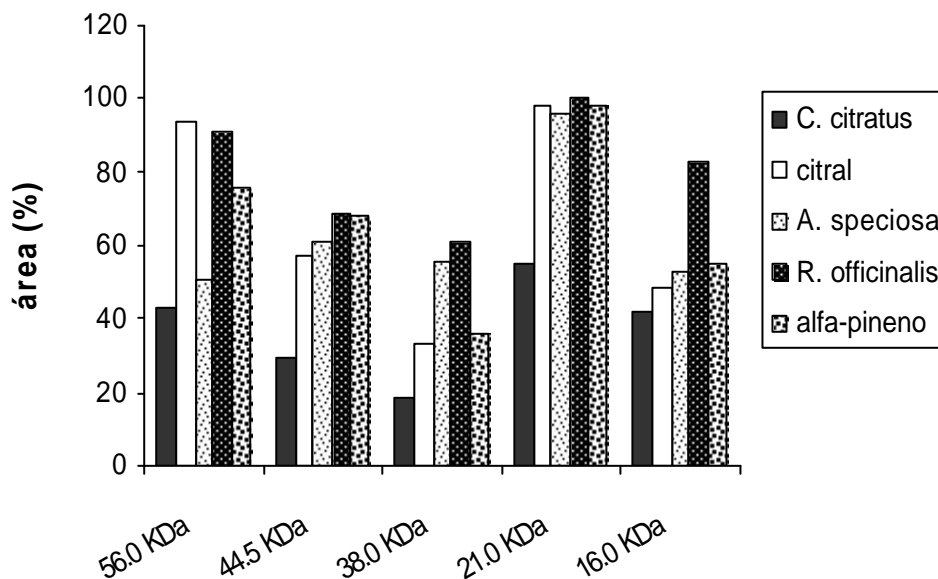


Figura 23. Análise de densitometria do padrão de expressão protéico obtido por western blot de amostras de frações microssomais de larvas tratadas com óleo essencial de *C. citratus*, citral, óleo de *A. speciosa*, óleo de *R.officinalis* e  $\alpha$ -pineno, reconhecidas pelo anticorpo 353-2 contra V-ATPase.

O Western blot realizado com o anticorpo Ab C23 contra a subunidade B do complexo  $V_1$  de  $V H^+$ -ATPase de *Manduca sexta*, confirmou a presença desta subunidade em frações microssomais de larvas de *Ae. aegypti* (Figura 24).

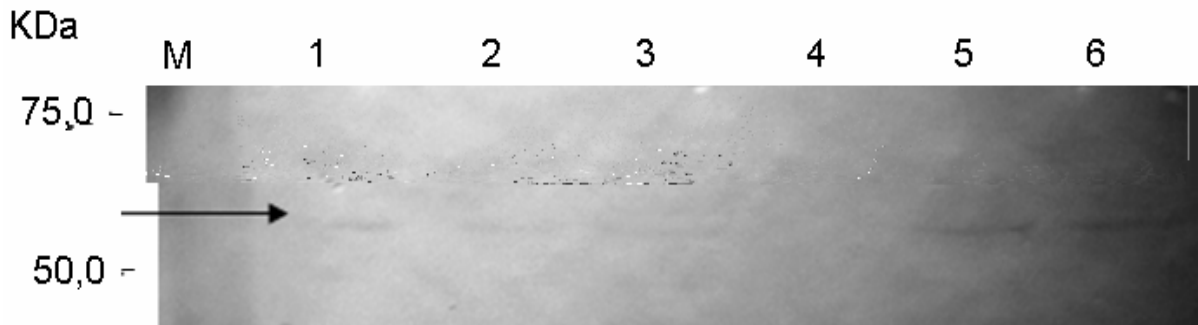


Figura 24. Identificação molecular de  $V H^+$ -ATPase em larvas de *Ae.aegypti* por western blot utilizando o anticorpo Ab C23 contra a subunidade B do complexo  $V_1$  de  $V H^+$ -ATPase de *Manduca sexta*: (M) padrão molecular (1) fração microssomal de larvas controle; (2) fração microssomal de larvas tratadas com óleo essencial de *R. officinalis*; (3) fração microssomal de larvas tratadas com óleo essencial de *A.speciosa*; (4) fração microssomal de larvas tratadas com *C.citratu*s; (5) fração microssomal de larvas tratadas com citral; (6) fração microssomal de larvas tratadas com  $\alpha$ -pineno.

## 6. Discussão

### 6.1. Efeito dos óleos essenciais e seus principais monoterpenos sobre ATPases de larvas de *Ae. aegypti*

Com as altas taxas de mortalidade de larvas obtidas com os óleos essenciais de *A. speciosa* (LC<sub>50</sub> de 0,94 µLmL<sup>-1</sup> e LC<sub>90</sub> de 1,2 µLmL<sup>-1</sup>), *C. citratus* (LC<sub>50</sub> de 0,28 µLmL<sup>-1</sup> e LC<sub>90</sub> de 0,56 µLmL<sup>-1</sup>) e *R. officinalis* (LC<sub>50</sub> de 1,18 µLmL<sup>-1</sup> LC<sub>90</sub> de 1,67 µLmL<sup>-1</sup>) em ensaios realizados por nosso grupo em trabalhos anteriores, buscamos avaliar as taxas de mortalidade dos principais constituintes ativos destes óleos. O citral (presente no óleo de *C. citratus*) e o α-pineno (presente nos óleos de *A. speciosa* e *R. officinalis*) foram os componentes mais efetivos apresentando LC<sub>50</sub> de 0,64µLmL<sup>-1</sup> e LC<sub>90</sub> de 0,92µLmL<sup>-1</sup> para o citral e LC<sub>50</sub> de 1,13 µLmL<sup>-1</sup> e LC<sub>90</sub> de 2,18 µLmL<sup>-1</sup> para o α-pineno. Comparando estes resultados de concentrações letais podemos notar que o *C. citratus* é o óleo essencial de maior potencial larvicida apresentando os menores valores de LC<sub>50</sub> e LC<sub>90</sub>. O citral, embora tenha sido encontrado nesta amostra de óleo de *C. citratus* constituindo 90 % do conteúdo total do óleo, apresentou maiores valores de LC<sub>50</sub> e LC<sub>90</sub>. Podemos inferir que podem existir substâncias minoritárias agindo como sinergistas positivos no óleo de *C. citratus*, ou seja, potencializando sua ação larvicida. Os óleos de *A. speciosa* e *R. officinalis* também apresentaram menores valores de LC<sub>50</sub> e LC<sub>90</sub> que o α-pineno, porém, nestes casos, o α-pineno está presente na concentração de apenas 7,5% no primeiro óleo e de 20,5% no segundo. Segundo Harris (2002), existem evidências de sinergismos nos óleos essenciais, ocorrendo entre o componente principal e os componentes minoritários, ou entre os componentes principais agindo juntos, aumentando significativamente a atividade biológica total do óleo. Os sinergismos podem ser positivos ou negativos. Um estudo avaliando o efeito antibacteriano de *C. citratus*, concluiu que os principais componentes ativos, neral e geranial (citral) possuem um efeito potencializado pelo componente mirceno (*Onawumni et al.*, 1984). Em outros estudos, foi mostrado que em casos de óleos essenciais tais como os de espécies de eucalyptos, onde os principais componentes são inativos (tais como α-pineno e 1,8-cineol) do ponto de vista antimicrobiano, são os componentes minoritários os principais sinergistas (*Zakaraya et al.*, 1993).

No intuito de elucidar o modo de ação destes óleos e de seus princípios ativos, citral e  $\alpha$ -pineno, foram avaliados o efeito destes compostos em enzimas chave do metabolismo destas larvas. A enzima tipo F (ATP sintase), localizada nas cristas mitocondriais é responsável pela produção de ATP, disponibilizando-o para geração de energia responsável pela sustentação do metabolismo em geral. As  $V$   $H^+$ -ATPases, localizadas principalmente em células dos túbulos de Malpighi, são essenciais para a função excretora nestas larvas, além de serem essenciais no processo de alcalinização do intestino médio. As  $Na^+/K^+$ -ATPases também estão presentes nos túbulos de Malpighi e intestino de *Ae. aegypti*, exercendo funções importantes nos processos de excreção e alcalinização, além de serem enzimas chave na função nervosa.

De acordo com Knobloch *et al.* (1989), componentes de óleos essenciais podem agir em proteínas embebidas nas membranas plasmáticas. Segundo Sikkema *et al.* (1995), ATPases podem ser afetadas por compostos presentes em óleos essenciais, como compostos hidrocarbonetos cíclicos. Estas moléculas de hidrocarbonetos lipofílicos podem se acumular na bicamada lipídica, promovendo uma distorção na interação lipídeo-proteína, ou, ainda, alternativamente, podem ocorrer interações diretas entre os hidrocarbonetos lipofílicos com sítios hidrofóbicos da proteína. De acordo com Sikkema *et al.* (1995) os terpenos, que são hidrocarbonetos consistindo de múltiplas unidades de isopreno podendo ser cíclicos ou acíclicos, estão entre os hidrocarbonetos cujas toxicidades contra microorgani

altas concentrações. Em ensaios realizados com *S. cerevisiae*, o isômero do  $\alpha$ -pineno, o  $\beta$ -pineno provocou principalmente inibição da respiração, cujo efeito foi principalmente na região do citocromo b da cadeia transportadora de elétrons. Porém não foi observado efeito deste terpeno na atividade ATPásica ( Sikkema *et al.*, 1995).

Nas atividades V H<sup>+</sup>-ATPásicas realizadas com larvas tratadas *in vivo*, o óleo de *C. citratus* e o citral foram as substâncias mais efetivas na inibição, diminuindo a atividade em 58% e 48%, respectivamente. Em estudos de avaliação da ação de compostos carbonil  $\alpha,\beta$ -insaturados em proteínas transportadoras de Múltipla Resistência à Drogas (MDR), foi visto que o citral pode causar inibição da atividade ATPásica na proteína codificada pelo gene MRP2 superexpressa em vesículas de membranas de células do inseto *Spodoptera frugiperda* (*sf9*) ( Wortelboer *et al.*, 2005). Nos ensaios da ação dos compostos em membranas de larvas tratadas após o isolamento, o óleo de *C. citratus* e o citral não inibiram a atividade em questão.

Ainda em relação às atividades V H<sup>+</sup>-ATPásicas nos ensaios de efeito das substâncias em larvas tratadas *in vivo*, o  $\alpha$ -pineno inibiu cerca de 33 % da atividade enzimática. I qu1 . livamento, o óleons.



reconhecidas mais de 15 proteínas em V H<sup>+</sup>-ATPase purificada de *M. sexta*. Cinco bandas proteicas foram visualizadas mais fortemente (16,0, 27,0, 43,0, 56,0 e 67,0 kDa). Três destas bandas (16,0, 56,0 e 67,0 kDa) foram também reconhecidas por este anticorpo em túbulos de Malpighi de *Ae. aegypti*. Ainda em nossos resultados, utilizando o anticorpo C23, foi reconhecida uma banda protéica de 56,0 kDa, a qual foi também reconhecida por Weng *et al.* (2003) utilizando este mesmo anticorpo. Desta forma, podemos hipotetizar que as bandas de 56,0, 44,0 e 16,0 kDa representam as subunidades B, C e G, respectivamente. De acordo com Svergun *et al.* (1998), o complexo V<sub>1</sub> citosólico de *M. sexta* é composto pelas subunidades A, B, C, D, E, F, G com massas moleculares de 67,0, 56,0, 40,0, 32,0, 28,0, 14,0 e 16,0 kDa, respectivamente. Porém, de acordo com Forgac (1999) as subunidades A, B, C, D, E, F, G e H apresentam variações em suas massas moleculares, sendo de 67 a 73, 55 a 60, 40 a 45, 32 a 33, 28 a 32, 13 a 14, 12 a 16 e 51 a 54 kDa, respectivamente, dependendo da célula em questão. Existe a possibilidade da subunidade de 21,0 kDa visualizada em nosso Western blot, representar a subunidade E, que teoricamente teria 27,0 kDa. Porém, considerando que nossos ensaios foram realizados com larvas totais de *Ae. aegypti* e no processo de homogeneização muitas enzimas proteolíticas são ativas, há também possibilidade de ter ocorrido proteólise desta proteína e, assim, esta aparece com uma massa molecular aparente de 21,0 kDa. A subunidade A (67,0 kDa) não foi identificada em nossos resultados, embora tenha sido identificada pelo mesmo anticorpo por Weng *et al.* (2003). Esta ausência talvez possa ser explicada pela imunogenicidade do antígeno, ou seja, o anticorpo utilizado pode não reconhecer algum epítipo presente na subunidade A de larvas de *Ae. aegypti*. Considerando que esta subunidade foi identificada em túbulos de Malpighi, estudos posteriores são importantes para verificação de possíveis diferenças entre as subunidades A das enzimas de túbulos de Malpighi e de larvas totais.

Além da confirmação da presença de V H<sup>+</sup>-ATPases em larvas, pode-se notar a alteração provocada pelos tratamentos (óleos essenciais e seus componentes principais) na expressão de algumas das subunidades do complexo V<sub>1</sub>. As substâncias mais efetivas na inibição de expressão das subunidades B, C e G foram o óleo de *C. citratus* que inibiu cerca de 60%, 70% e 60% destas subunidades, respectivamente; o citral que inibiu 40% da subunidade C e 50% da G e o óleo de *A. speciosa* que inibiu a expressão em 50%, 40% e 50% das subunidades B, C e G,

respectivamente. Como o Western blot foi realizado com as mesmas frações microsomais de larvas obtidas tratadas previamente com as substâncias, na concentração de  $0,5 \mu\text{LmL}^{-1}$ , estes valores de redução da expressão destas subunidades corroboram com os resultados de inibição de atividade hidrolítica, confirmando o óleo essencial de *C. citratus* e o citral como os compostos mais efetivos na inibição de  $V \text{H}^+$ -ATPases. De acordo com estes dados podemos sugerir que a  $V \text{H}^+$ -ATPase é regulada por estas substâncias à nível pré ou pós-transcricionais, embora não seja descartada a possibilidade de que existam outras regulações por estas substâncias. Assim, com os resultados obtidos com o *C. citratus* e citral nos ensaios da ação destas substâncias em membranas de larvas tratadas após o isolamento, ou seja, a não alteração da atividade V-ATPásica, corrobora com a hipótese de que estas substâncias regulam a enzima a nível pré ou pós-transcricional, já que, no tratamento com estas substâncias *in vivo*, ocorreu inibição da atividade. Assim, provavelmente ocorreu diminuição da transcrição gerando RNAm, e, conseqüentemente da tradução gerando as subunidades da  $V \text{H}^+$ -ATPase. Porém, as possibilidades de outras regulações não podem ser descartadas. Assim, a não alteração da atividade desta enzima nos ensaios com membranas tratadas após o isolamento pode ser explicada pela possibilidade da ação destas duas substâncias agirem na enzima em concentrações menores (subletais) e agirem tanto na enzima quanto na membrana em altas concentrações resultando, neste último caso em uma alteração nula.

Ainda em relação às regulações pré ou pós-transcricionais, estas substâncias podem regular não somente ATPases, mas também outras proteínas, como pode ser visualizado na Figura 20, resultado que confirma a hipótese de que principalmente o citral e o  $\alpha$ -pineno, os quais são componentes classificados como alcenos e aldeídos, respectivamente, regulam a expressão protéica a nível pré ou pós-transcricional, e não somente agem na permeabilidade membranar, como tem sido discutido em vários trabalhos. Embora este efeito nas membranas, os quais são mais bem estudados provavelmente existam, o fato de estas duas substâncias pertecerem à funções químicas diferentes deve ser considerado, já que desta forma, provavelmente apresentam hidrofobicidades diferentes (fator que depende de várias características físico-químicas como área da superfície molecular, volume molecular e polaridade). Desta forma, as interações destas duas substâncias com a membrana plasmática provavelmente seriam diferentes entre si.

Nos ensaios de efeito das substâncias em larvas tratadas *in vivo*, as atividades  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPásicas, estatisticamente, não foram afetadas pelos óleos essenciais e seus princípios ativos (Tabela 7). Porém, nos ensaios da ação destas substâncias em membranas de larvas tratadas após o isolamento, o óleo de *C. citratus* inibiu fortemente esta atividade (cerca de 75%), enquanto o citral ativou cerca de 22%, ambos na concentração de  $2,5 \mu\text{LmL}^{-1}$ . Embora a ativação promovida pelo citral não tenha diferido estatisticamente do controle (tabela 13), era esperado que o citral tivesse o mesmo comportamento do *C. citratus*, ou seja, tivesse provocado inibição, já que o citral representa 90% da composição do óleo de *C. citratus*, sendo considerado o princípio ativo responsável pelas atividades biológicas do óleo de *C. citratus* (Wannissorn *et al.*, 1996 e Rauber *et al.*, 2005). De acordo com estes resultados podemos pressupor que existem outros componentes no óleo de *C. citratus* os quais foram responsáveis pela alta inibição provocada por este óleo na atividade  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPásica. Pode ser que seja um componente agindo individualmente, ou mais de um componente agindo sinergisticamente de forma positiva, ou seja, potencializando a ação inibitória na enzima. O citral pode ter afetado a permeabilidade membranar em altas concentrações, promovendo esta estimulação da atividade hidrolítica, devido à dissipação do gradiente eletroquímico, levando ao desacoplamento da energia e do transporte de íons, ou seja, não permitindo a regulação da atividade da enzima por feedback de íons transportados, havendo, assim, a estimulação da atividade ATPásica. Ainda no ensaio da ação das substâncias em membranas de larvas tratadas após o isolamento, o óleo de *A. speciosa* não alterou a atividade em questão, embora o óleo de *R. officinalis* e o  $\alpha$ -pineno tenham inibido a atividade em cerca de 35% e 50%, respectivamente.

Com relação ao efeito das substâncias nas larvas tratadas *in vivo*, o fato das F-ATPases não terem sido afetadas pelas substâncias avaliadas, talvez possa estar relacionado a localização desta enzima nas cristas mitocondriais, assim essas substâncias precisariam atravessar primeiramente as membranas plasmáticas de uma determinada célula e ainda atravessar a membrana mitocondrial para que tenha acesso a enzima F-ATPase. Ao contrário, a maior susceptibilidade de  $\text{V H}^+$ -ATPases principalmente ao óleo essencial de *C. citratus* e seu princípio ativo citral, pode ser devido às localizações desta enzima nas larvas, ou seja membranas plasmáticas, tanto nas células dos túbulos de Malpighi, quanto nas células do tecido epitelial intestinal. Sendo assim, as  $\text{V H}^+$ -ATPases são alvos mais fáceis de serem atingidos.

Além desta possibilidade, pode ser também que estas substâncias afetem especificamente as  $V\ H^+$ -ATPases, pois  $Na^+/K^+$ -ATPases, embora se localizem em membranas plasmáticas não foram afetadas.

Alguns trabalhos também têm abordado os sistemas energéticos ATPases como alvos diretos de drogas em insetos. Bandani *et al.* (2001), avaliaram o efeito das toxinas dextruxina e efrapeptina do fungo entomopatogênico, *Metarhizium anisopliae* na atividade hidrolítica de V-ATPases nas células intestinais do inseto *Galleria mellonella*. Foi demonstrado que a toxina efrapeptina inibiu fortemente a V-ATPase, enquanto a dextruxina promoveu apenas um fraco efeito inibitório.

Ping, *et al.* (2004), avaliaram o efeito do afidiocida botânico, 1,5-difenil-2-penten-1-ona (dp-B) nas atividades ATPásicas de membranas plasmáticas e de retículo sarcoplasmático de afídeos, além de avaliar também o efeito desta substância na membrana plasmática sinaptical neural de gafanhotos. Os resultados demonstraram que as  $Ca^{+2}/Mg^{+2}$ -ATPases foram os principais alvos de dp-B.

## 7. Conclusões

- Dentre as substâncias avaliados, o óleo de *C. citratus* e seu principal componente ativo, citral, são os mais efetivos na inibição das atividades V-ATPásicas, podendo serem agentes controladores do *Ae. aegypti*
- Principalmente os óleos de *C. citratus* e o seu componente ativo, citral provavelmente interferem na regulação nas enzimas V-ATPases à nível pré ou pós-transcricionais, embora exista a possibilidade outras regulações.
- Os óleos essenciais de *C. citratus*, seu componente ativo, citral e o óleo de *A. speciosa* inibem a expressão protéica das subunidades B, C e G; C e G; B, C e G, respectivamente do complexo  $V_1$  de  $V H^+$ -ATPases de larvas.
- O óleo essencial de *A. speciosa* (embora provoque a diminuição da expressão protéica de subunidades de  $VH^+$ -ATPases) e o  $\alpha$ -pineno inibem as atividades V-ATPásicas principalmente em elevadas concentrações, não sendo efetivos para utilização no controle do *Ae. aegypti*, mas podendo ser avaliados em estudos futuros como possíveis inibidores desta enzima.
- As enzimas F-ATPases não são afetadas pelos óleos essenciais de *C. citratus*, seu principal componente, citral, óleo de *A. speciosa* e de *R. officinalis*; o  $\alpha$ -pineno, porém inibe esta atividade enzimática somente em altas concentrações, indicando que este último possa também ser avaliado em estudos futuros como possíveis inibidores desta enzima.
- O óleo de *C. citratus* é o mais efetivo na inibição de  $Na^+/K^+$ -ATPases, porém, em altas concentrações; Assim, provavelmente outras substâncias, agindo sinergisticamente, são responsáveis por esta inibição e não o citral, componente presente em 90 % na composição deste óleo; e ainda o óleo de *C. citratus* também pode ser estudado futuramente como um possível inibidor enzima.

- O  $\alpha$ -pineno também inibe a atividade  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPásica somente em elevadas concentrações, possibilitando também, possíveis estudos de investigação desta substância como inibidor da enzima.
  
- Os óleos essenciais de *A. speciosa*, *R. officinalis*,  $\alpha$ -pineno e citral aumentam a expressão de uma proteína de 203,0 KDa em relação ao controle e ao óleo de *C. citratus*; O citral e o  $\alpha$ -pineno aumentam a expressão das proteínas de 160,0; 47,0; e 41,0 kDa em relação aos demais tratamentos; contrariamente, essas substâncias diminuem a expressão de uma proteína de 72,0 kDa, em relação aos outros tratamentos.

## 8. Referências bibliográficas

- Allan, A.K., Du, J., Davies, S.A., Dow, J.A.T. Genome-wide survey of V-ATPase genes in *Drosophila* reveals a conserved renal phenotype for lethal alleles. *Physiol. Genomics*, v. 22, p. 128-138. 2005.
- Almeida, E.R. Plantas Mediciniais Brasileiras - Conhecimentos populares e científicos. São Paulo. Hemus. 1993.
- Almeida-Doria, R.F.E., Regitano-D'arce, M.A.B. Antioxidant activity of rosemary and oregano ethanol extracts in soybean oil under thermal oxidation. *Ciênc.Tecnol. Aliment*, v. 20, n. 2, p.197-203. 2000.
- Bandani, A.R., Amiri, B., Butt, T.M., Gordon-Weeks Effects of efrapeptin and dextruxin, metabolites of entomogenous fungi, on the hydrolytic activity of a vacuolar type ATPase identified on the brush border membrane vesicles of *Galleria mellonella* midgut and on plant membrane bound hydrolytic enzymes. *Biochim.Biophys.Acta*, v. 1510, p. 367-377. 2001.
- Beyenbach, K.W. Energizing Epithelial Transport with the Vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase. *News Physiol. Sci*, v. 16, p. 145-151. 2001.
- Beyenbach, K.W., Masia, R. Membrane conductances of principal cells in Malpighian tubules of *Aedes aegypti*. *J. Insect. Physiol*, v.48, p.375-386. 2002.
- Beyenbach, K.W. Transporte mechanisms of diuresis in Malpighian tubules of insects. *J. Exp. Biol*, v.206, p.3845-3856. 2003.
- Beyenbach, K.W. e Wiczorek, H. The V-type H<sup>+</sup> ATPase: molecular structure and function, physiological roles and regulation. *J. Exp. Biol*, v.209, p.577-589. 2006.
- Buchbauer, G. The detailed analysis of essential oils leads to the understanding of their properties. *Perfumer & Flavorist*, v. 25, p. 64-67. 2000.
- Burt, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *Int. J. Food Microbiol*, v.94, p.223-253. 2004.
- Cabrero, P., Pollock, V.P., Davies, S. A., Dow, J.A.T. A conserved domain of alkaline phosphatase expression in the Malpighian tubules of dipterans insects. *J. Exp. Biol*, v.207, p.3299-3305. 2004.

- Calderón, O., Troyo, A., Solano, M.E. Diversidad larval de mosquitos (Diptera: culicidae) en contenedores artificiales procedentes de una comunidad urbana de San Jose Costa Rica. *Parasitologia Latinoamericana*, v.59, p.132-136. 2004.
- Carriconde, C.; Morais, D. ; Von Fritschen, M.; Cardoso Junior, E.L. *Plantas Mediciniais e Alimenticias*. Olinda, Centro Nordestino de Medicina Popular, Universidade Federal Rural de Pernambuco, v.1, p.45-47. 1996.
- Carson, C.F., Mee, B.J., Riley, T.V. Mechanism of action of Melaleuca alternifolia (tea tree) oil on Staphylococcus aureus determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrob. Agents Ch*, v.46, n.6, p.1914-1920. 2002.
- Caruso, N.C., Silva, I. V., Morales, M. M. and Lopes, A.G. Cytoskeleton elements mediate the inhibition of the Na/K ATPase activity by PKC in Rhodnius prolixus Malpighian tubules during hyperosmotic shock. *Arch. Insect Biochem.Physiol*, v.48, p.81-88. 2001.
- Catty, P., de Kerchove d' Exaerde, A., Goffeau, A. The complete inventory of the yeast Saccharomyces cerevisiae P- type transport ATPases. *FEBS Lett*, v.409, p. 325-332.
- Cereijido, M., Contreras, R.G., Shoshani, L. Cell adhesion, polarity, and epithelia in the dawn of metazoans. *Physiol. Rev*, v.84, p.1229-1262. 2004.
- Chatterjee, D., Chakraborty, M., Leit, M., Neff, L., Jamsakellokumpu, S., Fuchs, R., Baron, R. Sensitivity to vanadate and isoforms of subunit-a and subunit-b distinguish the osteoclast proton pump from other vacuolar H<sup>+</sup> ATPases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.89, p. 6257-6261.1992.
- Cheel, J., Theoduloz, C., Rodriguez, J., Schmeda-Hirschmann, G. Free Radical Scavengers and Antioxidants from Lemongrass (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.). *J. Agric.Food.Chem*, v.53, p.2511- 2517. 2005.
- Clements, A.N. The Biology of Mosquitoes: Development, Nutrition and Reproduction. Vol I. London: Chapman e Hall. 2000.
- Consoli, R.A.G.B., DeOliveira, R.L. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. 2 ed., Rio de Janeiro: Fiocruz, v.55, p.226. 1997.
- Côrrea, M.P. Dicionário de Plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro: IBDF, v.5, 687p. 1984.



- Cox, S.D., Gustafson, J.E., Mann, C.M., Markham, J.L., Liew, Y.C., Hartland, R.P., Bell, H.C., Warmington, J.R., Wyllie, S.G. Tea tree oil causes vazamento de  $K^+$  e inibe respiração em *Escherichia coli*. *Lett. Appl. Microbiol*, v.26, p.355-358. 1998.
- Cox, S.D., Mann, C.M., Markham, H.C., Bell, H.C., Gustafson, J.E., Warmington, J.R., Wyllie, S.G. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *J. Appl. Microbiol*, v.88, p.170-175. 2000.
- Craveiro, A. A; Machado, M.L.L. De aromas, insetos e plantas. *Ciência Hoje*, v.4, n.23, p.54-63. 1986.
- Cronin, S.R., Rajini, R., Hampton, R.Y. Cod 1p/Spf1p is a p-type ATPase involved in ER function and  $Ca^{+2}$  homeostasis. *J. Cell. Biol*, v.157, n.6, p.1017-1028. 2002.
- Del Pilar Corena, M., Seron, T.J., Lehman, H.K., Ochrietor, J.D., Kohn, A., Tu, C., Linser, P.J. Carbonic anhydrase in the midgut of larval *Aedes aegypti*: cloning, localization and inhibition. *J. Exp. Biol*, v.205, p.591-602. 2001.
- Deshpand, R.S. and Tipnis, H.P. Inseticidal activity of *Ocimum basilicum* Linn. *Pesticides*, v.11, p.11-2. 1977.
- Drose, S., Bindseil, K.H., Bowman, E.J., Siebers, A., Zeeck, A., Altendorf, K. Inhibitory effect of modified bafilomycins and concanamycins on P-type and V-type adenosine triphosphatases. *Biochemistry*, v.32, p.3902-3906. 1993.
- Eiras, A.E. Culicidae. Tít cap. In: Neves, D.P., Genaro, O., Linardi, P.M. *Parasitologia Humana* - 10<sup>o</sup> ed., Ed Atheneu, SP, p.320-333. 2003.
- Emery, A.M., Billingsley, P.F., Ready, P.D., Djamgoz, M.B.A. Insect  $Na^+/K^+$ -ATPase. *J. Insect. Physiol*, v.44, p.197-209. 1998.
- Fagan, M.J., Saier, M.H. P-type ATPases of eukaryotes and bacteria: sequence analyses and construction of phylogenetic trees. *J. Mol. Evol*, v.38, p.57-99. 1994.
- Filippova, M., Ross, L. S., Gill, S.S. Cloning of the V-ATPase B subunit cDNA from *Culex quinquefasciatus* and expression of the B and C subunits in mosquitoes. *Insect. Mol. Biol*, v.7, p.223-232. 1998.
- Forgac, M. Structure and properties of the vacuolar ( $H^+$ )-ATPase. *J. Biol. Chem*, v.274, n.19, p.12951-12954. 1999.
- Freitas, F.P. Atividade biológica de extratos de Plantas Medicinais sobre *Aedes aegypti*. Monografia apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia para obtenção do título em bacharel em Ciências Biológicas na Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos do Goytacazes, RJ. p.70. 2005.

- Freitas, M.S.M. Bioprodução de óleos essenciais em *Mentha arvensis* L. em resposta à inoculação com fungos micorrízicos arbusculares Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias para obtenção do título de mestre na Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, RJ. p.57. 2003.
- Futai, N.; Oka, T; Sun-Wada, G; Moriyama, Y; Kanazawa, H e Wada, Y. Luminal acidification of diverse organelles by V-ATPase in animal cells. *J. Exp. Biol*, v.203, p.107-116. 2000.
- Gerengser, G.A., Zhang, J. Chloride ATPase pumps in nature: do they exist? *Biol. Rev.* v.78, p.197-218. 2003.
- Gill, S.S., Chu, P.B., Smethurst, P., Pietrantonio, P.V., Ross, L.S. Isolation of the V-ATPase A and c subunit cDNAs from mosquito midgut and Malpighian tubules. *Arch. Insect Biochem. Physiol*, v.37, p.80-90. 1998.
- Glare T., O'callaghan M. *Bacillus thuringiensis: biology, ecology and safety*. Chichester: John Wiley and Sons; p.350. 2000.
- Gluck, S.L., Underhill, D.M., Iyori, M., Holliday, I.S., Kostrominova, T.Y., Lee, B.S. Physiology and Biochemistry of the kidney vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase. *Annu. Rev. Physiol*, v.58, p.427-445. 1996.
- Graham, L.A., Powell, B., Stevens, T.H. Composition and assembly of the yeast vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase complex. *J.Exp.Biol*, v.203, p.61-70. 2000.
- Gustafson, J.E., Liew, Y.C., Chew, S., Markham, J.L., Bell, H.C., Wyllie, S.G and Warmington, J.R. Effects of tree oil on *Escherichia coli*. *Letters in Appl. Microbiol*, v.26, p.194-198. 1998.
- Harris, R. Synergism in the essential oil world. *The International Journal of Aromatherapy*, v.42, n.4, p.179-186. 2002.
- Hegarty, J.L., Zhang, B., Pannabecker, T.L., Petzel, D.H., Baustian, M., Beyenbach, K.W. Dibutyl cAMP activates bumetanide-sensitive electrolyte transport in Malpighian tubules. *Am.J.Physiol*, v.261, p.C521-C529. 1991.
- Helander, I.M., Alakomi, H.L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I., Smid, E.J., Gorris, L.G.M., Von Wright, A. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. *J. Agrl. Food Chem*, v.46, p.3590-3595. 1998.

- Huss, M., Gruber, G., Harvey, W.R., Merzendorfer, H., Schmid, R., Wieczorek, H. Structural features of the insect V-ATPase: the catalytic  $V_1$  complex. *Zoology*, v.102, n.2, p.66-76. 1999.
- Huss, M., Sasse, F., Kunze, B., Jansen, R., Steinmtz, H., Ingenhorst, G., Zeeck, A., Wieczorek, H. Archazolid and apicularen: Novel specific V-ATPase inhibitors. *BMC Biochem*, v.4, p.6-13. 2005.
- Inesi, G & Kirtley, M.R. Structural features of cation transport ATPases. *J. Bioenerg Biomembr*, v.24, p.271-279. 1992.
- Jorgensen, P.L., & Anderson, J.P. Structural basis for  $E_1$ - $E_2$  conformational transitions in Na K-pumps and Ca pump proteins. *J. Membr. Biol*, v.103, p.95-103. 1988.
- Junge, W., Sabbert, D., Engelbrecht, S. Rotary catalysis: Real time recording of intersubunit rotation. *Ber.Buns. Phys. Chem*, v.100, p. 2014-2019. 1996.
- Kakko, I., Toimela, T., Tahti, H. The synaptosomal membrane bound ATPase as a target for the neurotoxic effects of pyrethroids. *Chemosphere*, v.51, p.475-480. 2003.
- Kakko, I. Toxic Mechanisms of Pyrethroids Studied in Vitro. Tese apresentada para obtenção do título de doutor Universidade de Tempere, Finlândia, p.55. 2004.
- Klein, U. The insect V-ATPase, a plasma membrane próton pump energizing secondary active transport: immunological evidence for the occurrence of a V-ATPase in insect ion-transporting epithelia. *J. Exp. Biol*, v.172, p.345-354. 1992.
- Knobloch, K., Pauli, A., Iberl, B., Weigand, H., Weis, N. Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. *Journal of Essential Oil Research*, v.1, p.119-128. 1989.
- Kostyukovsky, M., Rafaeli, A., Gileadi, C., Demchenko, N., Shaaya, E. Activation of octopaminergic receptors by essential oil constituents isolated from aromatic plants: possible mode of action against insect pests. *Pest Manag. Sc*, v.58, p.1101-1106. 2002.
- Lagunes, T.A., Rodriguez, H.C Los extractos acuosos vegetales con actividad insecticida: el combate de la conchuela del frijol. Tezcoco. 1992.
- Lahlou, Mouhssen Methods to Study the Phytochemistry and Bioactivity of Essential Oils. *Phytotherapy Res*, v.18, p.435-448. 2004.

- Lambert, R.J.W., Skandamis, P.N., Coote, P., Nychas, G.J.E. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano oil, thymol and carvacrol. *J. Appl. Microbiol*, v. 91, p.453-462. 2001.
- Leal, T.C.A.B. Produção de óleo essencial de capim cidreira *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf em função de fatores endógenos e exógenos. Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias para obtenção do título de Doutor em Produção Vegetal na Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, RJ. p.64. 1998.
- Leal-Cardoso, J.H; Moreira, M.R; Cruz, G.M.P. Da; Moraes, S.M. De; Lahlou, M.S; Souza, A.N.C De. Effects of essential oil of *Alpinia zerumbet* on the compound action potential of the rat sciatic nerve. *Phytomedicine*, v.11, p.549-553. 2004.
- Lemonica, I.P., Damasceno, D.C., Di-Stasi, L. C. Study of the embriotoxic effects of an extract of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) *Braz.J. Med.Biol*, v.29, n.2, p.223-227. 1996.
- Lukacs, G., Rotstein, O.D., Grinstein, S. Phagossomal acidification is mediated by a vacuolar-type H<sup>+</sup> ATPase in murine macrophages. *J.Biol.Chem*, v.265, p.21099-21107. 1990.
- Macvicker, J.A.K., Billingsley, P.F., Djamgoz, B.A. ATPase activity in the midgut of the mosquito, *Anopheles stephensi*: Biochemical characterization of ouabain-sensitive and ouabain-insensitive activities. *J.Exp. Biol*, v.174, p.167-183. 1994.
- Maddrell, S.H.P., O'Donnell, M.J. Insect Malpighian tubules: V-ATPase action in ion and fluid transport. *J.exp.Biol*. v.172, p.417-429. 1992.
- Martin, M.M., Martin, J.S., Kukor, J.J., Merrit, R.W. The digestion of protein and carbohydrate by the stream detritivore, *Tipula abdominalis* (diptera: Tipulidae). *Oecologia*, v.46, p.360-364. 1980.
- Martins, E.R., Castro, D.M., Castellani, D.C. E Dias, J.E. *Plantas Mediciniais*, Viçosa: UFV, Imprensa Universitária, p.220. 1995.
- Martínéz-Zaguilán, R., Lynch, R., Martínez, G., Gillies, R. Vacuolar-type H<sup>+</sup> ATPase are functionally expressed in plasma membrane of human tumor cells. *Am. J. Physiol*, v.265, p.1015- 1029. 1993.
- Matos, F.J.A. *Farmácias vivas: sistema de utilização de plantas medicinais projetado para pequenas comunidades*. 4ª ed. Fortaleza: Editora UFC, p.267. 2002.

- Maxfield, F.R. and Yamashiro, D. J. Endosome acidification and the pathways of receptor-mediated endocytosis. *Adv.Exp.Med.Biol*, v.225, p.189-198. 1987.
- McLachlin, D.T., Bestard, J.A., Dunn, S.D. The *b* and *d* subunits of the Escherichia coli ATP synthase interact via residues in their C-terminal regions. *J. Biomol. Chem*, V.273, n.24, p.15162-15168. 1998.
- Meier, T., Polzer, P., Diederichs, K., Welte, W., Dinmroth, P. Structure of the rotor ring of F-type Na<sup>+</sup>-ATPase from *Ilyobacter tartaricus*. *Science*, v.308, p.659-662. 2005.
- Mellman, I. The importance of being acid: the role of acidification in intracellular membrane traffic. *J.Exp.Biol*, v.172, p.39-45. 1992.
- Melo Santos, M.A.V. Eficiência de larvicidas à base de *Bacillus thuringiensis* sorovar *Israelensis* no controle de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Tese apresentada para obtenção do título de mestre em Mestrado em Biologia Animal na Universidade Federal de Pernambuco, p.80. 2001.
- Mendonça, V. L. M; Oliveira, C. L. A; Craveiro, A. A; Rao, V. S; Fonteles, M. C Pharmacological and Toxicological evaluation *Alpinia speciosa*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.86, p.93-97. 1991.
- Mishra, A.K. and Dubey, N.K. Evaluation of some essential oils for their toxicity against fungi causing deterioration of stored food commodities. *Appl. Environ. Microbiol*, v.60, p.1101-1105. 1994.
- Monath, T.P. Dengue: The risk to developed and developing countries. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.91, p.2395-2400. 1994.
- Narahashi, T. Neuronal ions channels as the target sites of insecticides. *Pharmacol Toxicol*, v.79, p.1-14. 1996.
- Natal, D. Bioecologia do *Aedes aegypti*. *Biológico*. v.2, p.205-207. 2002.
- Nguefack, J., Budd, B.B., Jacobsen, M..Five essential oils from aromatic plants of Cameroon: their antibacterial activity and ability to permeabilize the cytoplasmic membrane of *Listeria innocua* examined by flow cytometry. *Lett. Appl. Microbiol*. v.39, p.395- 400. 2004.
- Ohno, T.; Kita, M.; Yamaoka, Y.; Ymamura, S.; Yamamoto, T.; Mitsufuji, S.; Kodama, T.; Kashima, K.; Imanishi, J. Antimicrobial Activity of Essential Oils against *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*, v.8, n.3, p.202-215. 2003.

- Okorokova-Façanha, A. L., Appelgren, H., Tabish, M., Okorokov, L., Ekwall, K. The endoplasmatic reticulum cation P-type ATPase Cta4 is required for control of cell shape and microtubule dynamics. *J.Cell.Biol.* v.157, n.6, p.1029-1039. 2002.
- Onawumni, G.O., Yisak, W.A., Ogunlana, E.O. Antibacterial constituents in the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. *J. Ethnopharmacol*, v.12, p. 279-286. 1984.
- O'Neal, S.G., Rhoads, D.B., Racker, E. Vanadate inhibition of sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^+$ -ATPase and other ATPases. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, v.89, p.845-850. 1979.
- Pamplona, L.G.C., Lima, J.W.O., Cunha, J.C.L., Santana, E.W.P. Avaliação do impacto na infestação por *Aedes aegypti* em tanques de cimento no município de Canindé, Ceará, Brasil, após a utilização do peixe *Betta splendens* como alternativa de controle biológico. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop*, v.37, n.5, p.400-404. 2004.
- Panizza, S. *Plantas que curam: cheiro de mato*, IBRASA, São Paulo, p.138-139. 1997.
- Paranagama, P.A., Abeysekera K.H.T., Abeywickrama, K.; Nugaliyadde, L. (2003) Fungicidal and anti-aflatoxigenic effects of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. (lemongrass) against *Aspergillus flavus* Link. isolated from stored rice. *Lett. Appl. Microbiol*, v.37, n.1, p.86.
- Patrick, M., Bradley, T.J. Salt-lovin'skeeters: the osmoconforming strategy of mosquito larvae. *Am. Zool*, v.40, p.1166. 2000.
- Patrick, M.L., Aimanova, K., Sanders, H.R., Gill, S.S. P-type  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase and V-type  $\text{H}^+$ -ATPase expression patterns in the osmoregulatory organs of larval and adult mosquito *Aedes aegypti*. *J. Exp.Biol*, v.209, p.4638-4651. 2006.
- Peacock, A.J. Effects of sodium-transport inhibitors on diuresis and midgut ( $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase) in the tsetse fly *Glossina morsitans*. *J. Insect Physiol.* v.28, p.553-558. 1982.
- Pedersen, P.L. e Carafoli, E. Ion motive ATPase. Ibiquty, properties and significance to cell function. *Trends and Biochemical Sciences*, v.12, p.146-150. 1987.
- Ping, G., Yanping, L., Shigui, L Effects of dp-B on ATPase activity of insect plasma membrane. *Pestic. Biochem. Physiol.* v.80, p.157-162. 2004.
- Pohlit, A.M; Quignard, E.L.J; Nunomura,S. Tadei, M.W.P; Hidalgo, A.F., Pinto A. C. S., Santos E. V. M., Morais S. K. R., Saraiva R. C. G., Lin Chau Ming., Alecrim

- A.M., Ferraz, A. B., Pedroso, A. C. S., Diniz, E. V., Finney, E. K., Gomes, E.O., Dias, H. B., Souza, K. S., Oliveira, L. C. P., Don L.C., Queiroz, M. M. A., Henrique, M. C., Santos, M., Lacerda Júnior O.S., Pinto, P. S., Silva S. G. Graça, Y. R. Screening of plants found in Amazonas State, Brazil for activity against *Aedes aegypti* larvae. *Acta Amazonica*, v.34, n.1, p.97-105. 2004.
- Polanczyk, R.A.; Garcia, M.A.; Alves, S.B. Potencial de *Bacillus thuringiensis israelensis* Berliner no controle de *Aedes aegypti*. *Rev. Saúde Publ*, v.37, n.6, p.813-816. 2003.
- Ratajczak, R. Structure, function and regulation of plant vacuolar H<sup>+</sup>-translocating ATPase. *Biochim. Biophys. Acta*, v.1465, p.17-36. 2000.
- Rauber, C. S., Guterres, S.S., Schapoval, E.E.S. LC determination of citral in *Cymbopogon citratus* volatile oil. *J. Pharmaceut. Biomed. Analysis*, v.37, p.597-601. 2005.
- Regnault-Roger, C. The potential of botanical essential oils for insects pest control. *Integrated Pest Mgmt. Rev*, v.2, p.25-34. 1997.
- Rezende, M.E. Crescimento, florescimento e óleos essenciais de *Alpinia zerumbet*, em função da adubação orgânica e química e do manejo de irrigação. Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuária para obtenção do título de Doutor em Produção Vegetal da Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, RJ. p.108. 2004.
- Roel, A.R. Utilização de plantas com propriedades inseticidas: uma contribuição para o desenvolvimento rural sustentável. *Revista Internacional de Desenvolvimento Local*, v.1, n.2. 2001.
- Rodrigues, E.M.S., Dal-Fabbro, A.L., Salomão, R., Ferreira, I.B., Rocco, I.M., Fonseca, B.A.L. Epidemiologia da infecção pela dengue em Ribeirão Preto, S, Brasil. *Rev. Saúde Públ*. v.36, n.2, p.160-165. 2002.
- Samarão, S.S. Caracterização das atividades das V H<sup>+</sup>-ATPases e P H<sup>+</sup>-ATPases nas organelas da via secretória de levedura e da regulação destas enzimas pela glicose extracelular. Tese apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia, para obtenção do título de Doutor em Biociências e Biotecnologia. na Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, RJ. p.101. 2003.

- Sambongi, Y., Iko, Y., Tanabe, M., Omote, H., Iwamoto-Kihara, Ueda, I., Yanagida, T., Wada, Y., Futai, M. Mechanical rotation of c subunit oligomer in ATP synthase ( $F_0F_1$ ): direct observation. *Science*, v.286, p. 1722-1724.
- Sennoune, S., Luo, D., Martinez-Zaguilan, R. Plasmalemmal Vacuolar- type  $H^+$ -ATPase in Cancer Biology. *Cell Biochem. Biophys*, v.40, p.1 - 22. 2004.
- Shaaya, E., Ravid, U., Paster, N., et al. Fumigant toxicity of essential oils against four major stored-product insects. *J.Chem. Ecol* , v.17, p.499. 1991.
- Shenk M.A., Steele, R.E. A molecular snapshot of the metazoan "Eve". *Trends Biochem. Sci*, v.18, p.459- 463. 1993.
- Shoshani, L., Contreras, R.G., Roldan, M.L., Moreno, J., Lazaro, A., Balda, M.S., Matter, K., Cereijido, M. The polarized expression of  $Na^+$ ,  $K^+$ -ATPase in epithelia depends on the association between {beta}-subunits located in neighboring cells. *Mol. Biol. Cell*, v.16, p.1071- 1081. 2005.
- Sikkema, J., De Bont, J.A.M., Poolman, B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol. Res*, v.59, n.2, p.201-222. 1995.
- Simões, C. M. O., Spitzer, V. Óleos Voláteis In: Gosmou, G., Mello, J.C.P., Mentz, L. A., Petrovick, P.R. *Farmacognosia: da Planta ao medicamento* 1 ed. Porto Alegre: Ed. UFRGS, p.467-495. 2001.
- Simon, J.E. New crop introduction: exploration, research and commercialization of aromatic plants in the new world. *Act. Hort*, v.331, p.209-221. 1993.
- Solomon, T., Mallewa, M. Dengue and Other Emerging Flaviviruses. *J. infect*, v.42, p.104-115. 2001.
- Swallow, C.J., Grinstein, S., Sudsbury, R.A., Rotstein, O.D. Relative roles of  $Na^+/H^+$  exchange and vacuolar-type  $H^+$  ATPases in regulating cytoplasmic pH and function in murine peritoneal macrophages. *J. Cell. Physiol*, v.157, p.453-460. 1993.
- Sweadner, K.J., Wetzel, R.K., Arystarkhova, E. Genomic organization of the human FXD2 gene encoding the gamma subunit of the  $Na^+$ ,  $K^+$ -ATPase. *Biochem Biophys. Res. Commun*, v.279, p.196-201. 2000.
- Stevens, T.H. e Forgac, M. Structure, function and regulation of the vacuolar ( $H^+$ ) ATPase. *Annu Rev Cell Dev Biol*, v.13, p.779-808. 1997.
- Svergun, D.I., Konrad, S., Hub, M., Koch, M.H.J., Wiczorek, H., Altendorf, K., Volkov, V.V., Gruber, G. *Biochemistry*, v.37, p.17659-17663. 1998.



- Sze, D.M., Toellner, K.M., Garcia de Vinuesa, C., Taylor, D.R. and MacLennan, I.C. *J. Exp. Med*, v.192, p.813-821. 2000.
- Taiz, L., Zeiger, E. *Fisiologia Vegetal*. Porto Alegre: Artmed. p. 449-484. 2002.
- Tauil, P.L. Urbanização e ecologia do dengue. *Cad. Saúde Pública*, v.17, p.99-102. 2001.
- Tauil, P. Febre amarela, estado de alerta. *Boletim de informação e atualização da Sociedade Brasileira de Infectologia*, p.6-7. 2003.
- Throne, J.E., Weaver, D.K., Baker, J.E. Probit Analysis: Assessing Goodness-of-Fit Base don Backtransformation and Residuals. *J.Econ.Entomol*, v.88, n.5, p.1513-1516. 1995.
- Tomashek, J.J. and Brusilow, W.S.A. Stoichiometry of energy coupling by proton-translocating ATPases: A history of variability. *J. Bionerg. Biomembr*, v.32, p.493-500. 2000.
- Torrie, L.S., Radford, J.A.T. Resolution of the insect ouabain paradox. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.101, p.13689-13693. 2004.
- Younis, H.M., Abo-El-Saad, M.M., Abdel-Razik, R.K., Abo-Seda, S.A. Resolving the DDT target protein in insects as a subunit of the ATP synthase. *Biotechnol. Appl. Biochem*, v.35, p.9-17. 2002.
- Yu, S.P. Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase: the new face of an old player in pathogenesis and apoptotic/hydric cell death. *Biochem. Pharmacol*, v.66, p.1601-1609. 2003.
- Ultee, A., Kets, E.P.W., Smid, E.J. Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol*, v.65, n.10, p.4606-4610. 1999.
- Ultee, A., Smid, E.J. Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*. *Int. J. Food Microbiol*, v.64, p.373-378. 2001.
- Ultee, A., Bennik, M.H.J., Moezelaar, R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol*, v.68, p.1561-1568. 2002.
- Wannissorn, B., Jarikasse, S., Soontornantasart, T. *Phytother. Res*, v.10, p.551-554. 1996.
- Wannissorn, B., Jarikasem, S., Siriwangchai, T., Thubthimthed, S. Antibacterial properties of essential oils from Thai medicinal plants. *Fitoterapia*, v.76, p.233-236. 2005.

- Weng, X-H., Huss, M., wieczorek, H., Beyenbach, K.W. The V-type H<sup>+</sup>-ATPase in Malpighian tubules of *Aedes aegypti*: localization and activity. *J. Exp. Biol.* v.206, p. 2211-2219. 2003.
- Wieczorek, H., Brown, D., Grinstein, S., Ehrenfeld, J., Harvey, W. R. Animal plasma membrane energization by proton-motive V-ATPases. *BioEssay*, v.21, p.637-648. 1999.
- Wieczorek, H., Gruber, G., Harvey, W.R., Huss, M., Merzendorfer, H., Zeiske, W. Structure and Regulation of Insect Plasma Membrane H<sup>+</sup> V-ATPase. *J. Exp. Biol.* v.203, p.127-135. 1999
- Wieczorek, H., Huss, M., Merzendorfer, H., Reineke, S., Vitavska, O. e Zeiske, W.J. *Bioenerg. Biomembr.* v.35, p.359-366. 2003.
- Wortelboer, H.M., Usta, M., Zanden van, J.J., Bladeren van, P.J., Rietjens, I.M.C.M., Cnubben, N.H.P. Inhibition of multidrug resistance proteins MRP1 and MRP2 by a series of  $\alpha,\beta$ -unsaturated carbonyl compounds. *Biochem. Pharmacol.* v.69, p.1879-1890. 2005
- Viegas Júnior, C. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. *Quim. Nova*, v.26, n.3, p.390-400. 2003.
- Zakaraya, D., Fkih-Tetouani, S., Hajji, F. Chemical composition-antimicrobial relationships of Eucalyptus essential oils. *Plantes Medicinales et Phytotherapie*, v.4, p.319-331. 1993.
- Zhuang, Z., Linser, P.J., Harvey, W.R. Antibody to H<sup>+</sup> V-ATPase subunit E colocalizes with portosomes in alkaline larval midgut of a freshwater mosquito (*Aedes aegypti* L.). *J.Exp.Biol.* v.202, p.2449-2460. 1999.
- Zoghbi, M.G.B; Andrade, E.H.A; Maia, J.G.S. Volatile constituents from leaves and flowers of *Alpinia speciosa* K. Schum. and *A. purpurata* (Viell.) Schum. *Flavours and Fragranve Journal*, v.14, n.6, p.411-414 .1999.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)