

## A SÍNTESE DE NOVOS ATIVOS LARVICIDAS PARA CONTROLE POPULACIONAL DO *Aedes aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE)

### **Ernane Simões Carbonaro**

Aluno de Mestrado em Ciência Ambiental e Tecnologia, UFGD, 79804-970, Dourados-MS, Brasil. E-mail: [ernanecarbonaro@gmail.com](mailto:ernanecarbonaro@gmail.com)

### **Eduardo José de Arruda**

Engenheiro Químico, Prof. Doutor, Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia/Química, UFGD, 79804-970, Dourados-MS, Brasil. E-mail: [ejarruda@gmail.com](mailto:ejarruda@gmail.com)

### **Lincoln Carlos Silva Oliveira**

Químico, Prof. Doutor e Diretor do Instituto de Química, UFMS, 79074-460, Campo Grande-MS, Brasil, E-mail: [lincoln.cso@gmail.com](mailto:lincoln.cso@gmail.com)

### **Paulo César Cavalcante Vila Nova**

Aluno de Doutorado do Departamento de Química, UFMS, 79074-460, Campo Grande-MS, Brasil. E-mail: [vilanovapc@gmail.com](mailto:vilanovapc@gmail.com)

### **Andréa Haruko Arakaki**

Bióloga, DCR/FUNDECT Departamento de Pós-graduação de Química, UFMS, 79074-460. E-mail: [andkaki@yahoo.com.br](mailto:andkaki@yahoo.com.br)

### **Amilcar Machulek Junior**

Químico, Prof. Doutor e Coordenador do Curso de Pós-graduação de Química, UFMS, 79074-460. E-mail: [machulekjr@gmail.com](mailto:machulekjr@gmail.com)

---

## **RESUMO**

Os ativos inseticidas são propostos há décadas a partir de fontes vegetais, toxinas de microorganismos, moléculas sintéticas e, até, utilizando novos complexos metálicos. Este trabalho teve por objetivo a síntese de novos ativos inseticidas que considerem os conceitos da química de coordenação, organização molecular e alterações de rotas bioquímicas no inseto através da atividade de complexos metálicos. Esta síntese foi realizada utilizando complexos baseados em aminopolycarboxilatos (APCs) com metais de transição para atividade abrangente (ovicida, larvicida e biológica), visando à redução populacional do mosquito atingindo suas formas imaturas e impondo restrições na sua cadeia alimentar, pois inseticidas com Cu(II) e Fe(III), inviabilizam os ovos e são tóxicos para larvas de *Aedes aegypti* (cepa Rockfeller), além de apresentarem intensa atividade biológica para bactérias Gram negativa e Gram positiva e outros microrganismos. Os produtos foram obtidos por duas rotas sintéticas: via sódica e via carbonato. Os resultados mostraram que somente os complexos APCs Na[Cu(NTA)], [Fe(NTA)], Na<sub>2</sub>[Cu(EDTA)] através dos íons complexos [Cu(NTA)]-1, [Fe(NTA)] e [Cu(EDTA)]-2 possuem atividade inseticida contra as formas imaturas do *A. aegypti*. Os complexos metálicos de Cu(II) e Fe(III) de MGDA, HEDTA, EDTA e DTPA, apesar de não possuírem atividade inseticida até 1000 ppm, possuem intensa atividade biológica para bactérias Gram positiva e Gram negativa.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Aedes aegypti*, inseticida, controle populacional

**ACTIVE NEW SYNTHESIS OF POPULATION CONTROL LARVICIDES *Aedes aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE)**

**ABSTRACT**

The proposed insecticides are active for decades from plant sources, microbial toxins, synthetic molecules, and even using new metal complexes. This work aimed at the synthesis of active insecticide to consider the concepts of coordination chemistry, molecular organization and changes in biochemical pathways in the insect through the activity of metal complexes. This synthesis was performed using complexes based aminopolycarboxilatos (APCs) with transition metals for activity inclusive (ovicidal, larvicidal and biological), aimed at reducing the mosquito population reaching its immature forms and imposing restrictions on their food chain, because insecticides with Cu (II) and Fe (III), precludes the eggs and larvae are toxic to immature stages of *Aedes aegypti* (Rockefeller strain), and offer intense biological activity for Gram negative and Gram-positive and other microorganisms. The products were obtained by two synthetic routes, via path sodium and sodium carbonate. The results showed that only the complex APCs The [Cu(NTA)], [Fe(NTA)], Na<sub>2</sub>[Cu (EDTA)] by means of ion complex [Cu (NTA)]-1, [Fe(NTA)] and [Cu(EDTA)]-2 have insecticidal activity against the immature stages of *A. aegypti*. The metal complexes of Cu(II) and Fe(III) MGDA, HEDTA, DTPA and EDTA, although not having insecticidal activity to 1000 ppm, have intense biological activity to Gram positive and Gram negative bacteria.

**KEYWORDS:** *Aedes aegypti*, insecticide, population control

**A SÍNTESE DE NOVOS ATIVOS LARVICIDAS PARA CONTROLE POPULACIONAL DO *Aedes aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE)**

**INTRODUÇÃO**

A dengue é uma doença virótica transmitidas por mosquitos do gênero *Aedes* sp. O *Aedes (Stegomyia) aegypti* é o inseto de maior significância epidemiológica (FUNASA, 2001). Os repetidos surtos evidenciam que a incidência da doença, depende do controle do vetor. A dengue constitui um sério problema de Saúde Pública Mundial, estima-se que 3,5 bilhões de pessoas estejam sob risco da doença.

Não há estratégia disponível para o controle da doença, a não ser o controle populacional do mosquito *Aedes aegypti*. O controle se da pela eliminação dos criadouros, o que é dependente da participação da comunidade e do uso de inseticidas (larvicidas e adulticidas) (TAUIL, 2002). Por décadas o controle dos insetos ou sua tentativa de erradicação por utilização de inseticidas convencionais mostrou-se ineficiente e com sério problema humano e ambiental. O uso continuado e indiscriminado dos inseticidas convencionais ocasionam resistência, tornando o método de controle de vetores inadequado (MACORIS et al., 1999; CAMPOS e ANDRADE, 2003), além de ser inespecífico, podendo atingir outros insetos e formas de vida benéficas (WHO, 2001).

Este trabalho teve por objetivo a síntese de uma nova classe de ativos inseticidas que abordem conceitos da química de complexo, organização molecular, alterações de rotas bioquímicas com a produção de ativos inseticidas que utilizem as interações entre espécies moleculares e iônicas para obtenção de uma funcionalidade molecular. A pesquisa propõe utilizar novos inseticidas (ovicidas e larvicidas) para a redução populacional do mosquito através do controle das formas imaturas do inseto e restrições a partir da cadeia alimentar nos criadouros. Estudos recentes mostram a atividade biológica de sais e íons complexos de Cu(II) e Fe(III) para o controle do *A. aegypti*. Os inseticidas propostos são sais ou complexos de  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$  que inviabilizam ovos e são tóxicos para larvas de *A. aegypti* com intensa atividade biológica para bactérias Gram negativa e Gram positiva.

Portanto foram formulados ativos inseticidas não convencionais baseados em complexos metálicos de NTA, EDTA, HEDTA, DTPA e MGDA (aminopolicarboxilatos, APCs) com íons  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$  com atividade larvicida para controle de formas imaturas do inseto (ovos e larvas) do *Aedes aegypti*. A literatura disponibiliza inúmeras informações sobre o desenvolvimento de complexos de  $\text{Cu}^{2+}$  para uso terapêutico e aplicações biológicas (SORENSEN, 1981). O desenvolvimento dos novos inseticidas e possíveis formas de aplicação poderão permitir o controle prolongado do *Aedes aegypti* por ciclos de reprodução nos criadouros, atuando sobre formas imaturas do inseto e microrganismos do ambiente de reprodução.

## METODOLOGIA

### Síntese de complexos APC(s) - $\text{Me}^{2+}$ e APC - $\text{Me}^{3+}$

#### Síntese por Via Sódica

Os complexos foram sintetizados por via sódica através de metodologia clássica Skoog *et al.* (2004). Nas sínteses dos complexos metálicos por via sódica, utilizou-se sais sódicos dos ácidos aminopolicarboxilatos, APCs, que incluem os ácidos nitrilotriacético (NTA), metilglicinodiacético (MGDA), hidroxietilenodiaminotriacético (HEDTA), etilenodiaminotetracético (EDTA), dietilenotriaminopentacético (DTPA). As reações foram realizadas em água destilada, por mistura e agitação a 25°C. As concentrações utilizadas foram calculadas para resultarem complexos metálicos 1:1 (relação ligante-metal) 1 mol de quelante (sais sódicos de NTA, MGDA, HEDTA, EDTA e DTPA) com 1 mol de sal de  $\text{Cu}^{2+}$  ou  $\text{Fe}^{3+}$  ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ), que resultaram na formação de 1 mol de APCs- $\text{Me}^{2+}$  ( $\text{Cu}^{2+}$ ) e APC -  $\text{Me}^{3+}$  ( $\text{Fe}^{3+}$ ).

#### Síntese por Via Carbonato

Todas as sínteses dos complexos APCs de  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$  com NTA e EDTA seguem o mesmo procedimento operacional, por adequação da estequiometria de reação. Nas sínteses dos complexos metálicos por via carbonato foram utilizados os ácidos nitrilotriacético (NTA) e etilenodiaminotetracético (EDTA) para síntese dos complexos APCs na relação ligante-metal 1:1 que mostraram atividade inseticida nos estudos realizados. Amostras de sais metálicos  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  foram dissolvidos em água destilada por agitação magnética a 25°C. Após completa dissolução foi adicionado  $\text{NaHCO}_3$  para a precipitação do íon metálico na forma de carbonatos  $\text{CuCO}_3$  e  $\text{Fe}_2(\text{CO}_3)_3$  com liberação de  $\text{CO}_2$ .

Após o final da efervescência, a reação estabeleceu equilíbrio químico com a precipitação dos carbonatos. Por centrifugação a 3500 rpm no período de 10 minutos, o precipitado de carbonato metálico foi separado do sobrenadante que continha íons  $\text{SO}_4^{2-}$  e  $\text{Na}^+$ . Sucessivas lavagens do precipitado em número de quatro (4) e seguida de centrifugação com água destilada foram realizadas. O sobrenadante obtido foi descartado, com o restante dos íons  $\text{SO}_4^{2-}$  e  $\text{Na}^+$ . Para comprovação da ausência dos íons foi realizado teste com  $\text{BaCl}_2$  a 0,2 Mol/L para comprovar a ausência de íons  $\text{SO}_4^{2-}$  e, encerrar os ciclos de lavagem com água destilada.

Posterior a retirada dos íons interferentes, os carbonatos metálicos de cobre e ferro foram adicionados respectivos ácidos APCs NTA- $\text{H}_3$  e EDTA- $\text{H}_4$ , em solução aquosa com agitação a 25°C, para a formação dos íons complexos,  $[\text{Cu}(\text{NTA})]^{-1}$ ,  $[\text{Fe}(\text{NTA})]$ ,  $[\text{Cu}(\text{EDTA})]^{-2}$  e  $[\text{Fe}(\text{EDTA})]^{-1}$ . A reação de complexação ocorreu por substituição do íon  $\text{CO}_3^{2-}$  pelo íon  $\text{NTA}^{-3}$  ou  $\text{EDTA}^{-4}$ . Após o equilíbrio, pode-se observar a deposição de precipitado de fundo constituído por carbonato de cobre que não reagiu com ácido NTA- $\text{H}_3$  ou EDTA- $\text{H}_4$ . Os íons complexos de  $[\text{Cu}(\text{NTA})]^{-1}$ ,  $[\text{Fe}(\text{NTA})]$ ,  $[\text{Cu}(\text{EDTA})]^{-2}$  e  $[\text{Fe}(\text{EDTA})]^{-1}$  solúveis no sobrenadante foram separados em ciclos de centrifugação. A seguir, a solução com os íons complexos, separadamente, foram aquecidas a 50°C por algumas horas para evaporação da água. As amostras secas foram acondicionadas em embalagem plástica para proteção da umidade e cobertas de alumínio para evitar fotodegradação.

### **Espectroscopia de UV - Vis**

As medidas de absorção molecular foram realizadas com amostras dos ácidos nitrilotriacético (NTA- $\text{H}_3$ ) e etilenodiaminotetracético (EDTA- $\text{H}_4$ ) e sais complexos APCs de  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$  diluídos em água destilada a diferentes concentrações a 25°C para estabelecimento das curvas padrões de calibração para uso na determinação da concentração. As medidas foram realizadas em Espectrofotômetro UV-Vis. VARIAN, modelo Cary 50, com varreduras na região de 200 a 800 nm.

### **Ensaio de Atividade Biológica**

#### **Ovos de *Aedes aegypti* - Cepa Rockefeller/FIOCRUZ-RJ**

A linhagem padrão de inseto para análise de toxicidade para *Aedes aegypti* foi estabelecida no Rockefeller Institute (Nova York, NY - USA) por D.W Jenkins (1959) e utilizada como padrão de susceptibilidade a inseticida para o *Aedes aegypti* (HARTBERG e CRAIG-Jr, 1970). Os ovos de *Aedes aegypti* foram obtidos no Centro de Controle de Zoonoses em Campo Grande-MS e Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ-RJ. Nos experimentos de toxicidade foram utilizadas larvas de 3º instar, após a muda (ecdíase), por serem larvas mais resistentes para os estudos de toxicidade.

#### **Bioensaio de toxicidade com larvas de *Aedes aegypti***

O bioensaio de toxicidade foi realizado com metodologia da Organização Mundial da Saúde (WHO, 1981; WHO, 2001) e descrita na literatura com modificações (GADELHA, 1985; HAMBURGER et al., 1991 e HOTETTSMANN, 2003). Os ovos de *Aedes aegypti* (cepa Rockefeller) foram fornecidos pelo CCZ – Campo Grande-MS e

IOC/FIOCRUZ/IBEX/Entomologia-RJ. Os ovos de *Aedes aegypti* foram eclodidos em água isenta de cloro, sob condições controladas de temperatura ( $27 \pm 2$  °C), umidade relativa (UR =  $70 \pm 5\%$ ). As larvas foram colocadas em bandeja plástica e alimentadas com ração de peixe (1g/L) até o 3<sup>o</sup> instar (GADELHA; TODA, 1985). Os bioensaios foram realizados no intervalo de concentração de 0 a 1000 ppm (mg/L) com larvas de 3<sup>o</sup> instar de *Aedes aegypti*. A mortalidade das larvas foram registradas após 24 horas (considerou-se morta a larva que não responde ao estímulo com pipeta Pasteur). Para observações de atraso na reprodução, troca de muda (ecdíase), pupa e inseto adulto; as larvas foram deixadas até 72 horas de exposição ao tratamento). Solução aquosa de DMSO 0,5% foi utilizada para garantia da solubilidade e como controle negativo. Temephós pestanal (Fluka) foi utilizado como controle positivo.

### **Análise Estatística**

Os dados obtidos foram calculados em programa Probits da mortalidade X concentrações ( $\mu\text{g/mL}$  ou  $\text{mg/L}$ ), para calcular as dosagens letais,  $\text{CL}_{10}$ ,  $\text{CL}_{50}$  e  $\text{CL}_{90}$  (FINNEY, 1971; McLAUGHLIN, 1991). Os dados de toxicidade foram submetidos à análise pelo método de probits para ajustar a relação de larvas mortas em função das concentrações dos sal metálico e complexos metálicos de NTA, MGDA, HEDTA, EDTA e DTPA para definição das  $\text{CL}_{10}$ ,  $\text{CL}_{50}$  e  $\text{CL}_{90}$  por intervalo de confiança de 95% de significância. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  dpm e as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas para  $p < 0,05$ .

### **Antibiogramas com bactérias Gram positiva e Gram negativa**

Os antibiogramas permitem verificar atividade biológica das substâncias para os microrganismos. A metodologia utilizada foi descrita pelo CLSI (2003). Os testes foram pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) e utilizados para análise de susceptibilidade das bactérias *Gram negativa* e *Gram positiva* aos complexos APCs por disco difusão. As bactérias *Gram negativas* e *Gram positivas* apresentam resistências diferenciadas aos antibióticos utilizados. Nestes experimentos, buscou-se avaliar a atividade bactericida dos complexos APCs, em diferentes concentrações molares ( $\text{mol/L}$ ). O substrato utilizado como meio de cultura foi Agar de Mueller Hinton. Este substrato é recomendado pelo U.S. Food and Drug Administration (FDA) e Organização Mundial da Saúde (OMS) para análise de sensibilidade ou resistência aos antibióticos de bactérias *Gram positiva* e *Gram negativa*. O antibiograma foi realizado por uso de discos de difusão de celulose com a substância ativa impregnada e depositada sobre a superfície do substrato (meio nutritivo), onde se inoculou a bactéria, por espalhamento, de amostra de cultura bacteriana previamente, sob condições controladas, crescida em meio nutritivo líquido.

As bactérias utilizadas foram *E. coli* ATCC - 25922 (*Gram negativa*) e *S. aureus* ATCC - 25923 (*Gram positiva*). A *Escherichia coli* (*E. coli*) é bacilo *Gram* negativo e *Staphylococcus aureus* é um coco *Gram* positivo. Por espalhamento foi realizado a semeadura por espalhamento com alça de Drigalski esterilizada, uma alíquota de 100  $\mu\text{L}$  da cultura bacteriana em placa de Petri contendo meio Ágar de Mueller Hinton. Em seguida, depositou-se os discos de papel filtros impregnados, separadamente, com quantidades de complexos APCs e acetatos sobre a superfície do meio de cultura em disposição ordenada e foi realizado a incubação das placas a 37°C por 48 horas. Em seguida realizada a medição dos halos de inibição e cálculo da média e desvios-padrões.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Bioensaios toxicidade com complexos metálicos APCs

As análises foram realizadas em diferentes concentrações de complexos Na[Cu(NTA)], [Fe(NTA)], Na[Cu(MGDA)], [Fe(MGDA)], Na<sub>2</sub>[Cu(EDTA)], Na[Fe(EDTA)], Na<sub>3</sub>[Cu(DTPA)] e Na<sub>2</sub>[Fe(DTPA)]. A exposição de 24 horas aos complexos evidenciaram a toxicidade diferenciadas dos complexos até 1000 ppm (mg/L). A exposição das larvas de 3<sup>o</sup> instar mostraram que as larvas do grupo de controle (não exposto aos complexos metálicos) apresentaram movimentos serpentiformes e desenvolvimento normal, com ocorrência das mudas indicando a ecdise e o alcance da fase adulta. As larvas expostas aos complexos metálicos apresentavam pouca movimentação ou até nenhuma movimentação, a depender do tipo de complexo, mesmo quando estimuladas com pipeta de Pasteur. Nas diferentes concentrações dos complexos metálicos, foram observadas, em variáveis intensidades, mudanças no comportamento das larvas como diminuição gradativa dos movimentos e até redução do tamanho das larvas.

Durante os experimentos pode-se observar alterações de comportamento das larvas, em alguns casos, estado letárgico, quando as larvas permanecem imóveis sob estímulo por toque. As larvas mortas foram analisadas e observadas o escurecimento da cápsula cefálica, menores e mais escuras que as larvas de controle.

Os resultados observados com Na[Cu(NTA)], [Fe(NTA)] e Na<sub>2</sub>[Cu(EDTA)] evidenciaram a ação tóxica diferenciadas dos complexos metálicos [Fe(NTA)], Na[Fe(EDTA)], Na<sub>2</sub>[Fe(DTPA)], [Fe(MGDA)], Na[Cu(NTA)], Na<sub>2</sub>[Cu(EDTA)], Na<sub>3</sub>[Cu(DTPA)], Na[Cu(MGDA)] e Na<sub>2</sub>[Cu(EDTA)], mostraram diferenças significativas com relação à toxicidade para larvas de terceiro 3<sup>o</sup> instar de *Aedes aegypti*. Os resultados são mostrados na Tabela 1, que a toxicidade do Trilon A [Fe<sup>+3</sup> (NTA)<sup>-3</sup>], nas concentrações de CL<sub>10</sub>, CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub>, foram respectivamente 181, 12 mg/L, 340,56 mg/L e 500,00 mg/L. Os bioensaios realizados para complexos de Trilon B [Fe<sup>3+</sup> (EDTA)<sup>-4</sup>]<sup>1-</sup>, Trilon C [Fe<sup>3+</sup> (DTPA)<sup>-5</sup>]<sup>2-</sup> e Trilon M [Fe<sup>3+</sup> (MGDA)<sup>-3</sup>]<sup>0</sup> obteve-se ausência de mortalidade.

Na Tabela 01 são mostrados os resultados dos bioensaios de toxicidade para determinação das concentrações letais, CL, para uma população de larvas de 3<sup>o</sup> instar de *Aedes aegypti* (cepa Rockefeller/FIOCRUZ,RJ). Os resultados indicam que somente o complexo de [Fe(NTA)] possui toxicidade para larvas no intervalo de até 1000 ppm (mg/L). Os resultados mostram que para a CL<sub>50</sub> são necessários 340,56 mg/L para matar 50% da população de larvas de *Aedes aegypti* com o complexo, enquanto 484,92 mg/L são necessários de FeCl<sub>3</sub>. 6H<sub>2</sub>O.

Os resultados de toxicidade podem ser comparados para as concentrações letais, CLs, em termos da concentração do metal disponível a partir da relação ( $m_{\text{metal}} / MM_{\text{composto}}$ ) no complexo. A análise mostra que o complexo [Fe(NTA)] é 30% mais efetivo que o FeCl<sub>3</sub>. 6H<sub>2</sub>O. A literatura mostra que a toxicidade de um complexo é pH dependente e esta fortemente relacionado ao valor da constante condicional. Pode-se inferir que, possivelmente, tal advento origina-se do estágio de desenvolvimento das larvas, em razão, de diferenças metabólicas que ocorrem em cada estágio larval. Os resultados das CLs com Temephós são para comparações de toxicidade entre o inseticida padrão utilizado no controle do inseto vetor e os novos ativos propostos.

**Tabela 01 – Concentrações letais (CL) de íons complexos  $\text{Na}_x[\text{Fe}(\text{APC})]$  para 10%, 50% e 90% das larvas de 3º instar de *Aedes aegypti*.**

Tratamento	CL <sub>10</sub>	Intervalo de confiança	CL <sub>50</sub>	Intervalo de confiança	CL <sub>90</sub>	Intervalo de confiança
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	284,97	241<50%<336,63	484,92	433<50%<542,55	825,17	705,33<50%<965,37
[Fe(NTA)]	181,12	57,46<50%<244,11	340,56	286,94<50%<391,20	500,00	440,25<50%<614,46
[Fe(MGDA)]	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
[Fe(HEDTA)]	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Na[Fe(EDTA)]	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Na <sub>2</sub> [Fe(DTPA)]	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Temephós	0,011	0,011<CL<0,013	0,017	0,017<CL<0,019	0,029	0,026<CL<0,032

Bioensaios toxicidade realizados com amostras em quadruplicata em três dias alternados. (-) Ausência de mortalidade até 1000 ppm (Limite de biotoxicidade). Os complexos estão na relação de 1:1 (quelante:metal).

Na tabela 02 as concentrações letais (CL) de íons Cobre para 10%, 50% e 90% das larvas de 3º instar de *Aedes aegypti* para Trilon A [ $\text{Cu}^{2+}(\text{NTA})^{3-}$ ]<sup>1-</sup>, Trilon B [ $\text{Cu}^{2+}(\text{EDTA})^{4-}$ ]<sup>1-</sup> e [ $\text{Cu}(\text{EDTA})$ ]<sup>2-</sup> forma respectivamente 95,35 mg/L, 224,01 mg/L, 343,74 mg/L e 111,75 mg/L, 263,08 mg/L, 415,41 mg/L. Os complexos Trilon C [ $\text{Cu}^{2+}(\text{DTPA})^{5-}$ ]<sup>2-</sup> e Trilon M [ $\text{Cu}^{2+}(\text{MGDA})^{3-}$ ]<sup>0</sup> não apresentaram atividade larvicida em todas as concentrações testadas. Excluindo os complexos que se obteve ausência de mortalidade os resultados das análises mostrou que os complexos são potenciais larvicidas para larvas de *Aedes aegypti*, pois possui toxicidade inferior a 1000 ppm, dessa forma, são considerado bioativo, tal fenômeno pode estar associado com as reações oxidativas.

O quelato de [Cu(EDTA)] demonstrou mais letal em relação aos possíveis ativos testados e possibilitou observar que a associação entre a molécula sequestrante (EDTA) e o íon metálico ( $\text{Cu}^{2+}$ ) constituiu uma espécie tóxica de interesse para fins inseticidas ou larvicidas. A molécula sequestrante serve para a inversão de carga da espécie química e como transportador e competitivo de outros íons metálicos ou ainda para a internalização do íon tóxico através de membranas biológicas dos insetos.

**Tabela 02 – Concentrações letais (CL) de complexos  $\text{Na}_x[\text{Cu}(\text{APC})]$  para 10%, 50% e 90% das larvas de 3º instar de *Aedes aegypti*.**

Tratamento	CL <sub>10</sub>	Intervalo de confiança	CL <sub>50</sub>	Intervalo de confiança	CL <sub>90</sub>	Intervalo de confiança
CuSO <sub>4</sub> .5 H <sub>2</sub> O	130,59	49,18<50%<213,50	262,05	184,56<50%<332,73	541,24	407,58<50%<674,13
Na[Cu(NTA)]	95,35	29,17<50%<141,83	224,01	195,69<50%<260,09	343,74	297,04<50%<43,53
Na[Cu(MGDA)]	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Na[Cu(HEDTA)]	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Na <sub>2</sub> [Cu(EDTA)]	111,75	66,16<50%<150,01	263,08	223,14<50%<308,38	415,41	359,50<50%<509,86

Na <sub>3</sub> [Cu(DTPA)]	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Temephós	0,011	0,011<50%<0,013	0,017	0,017<50%<0,019	0,029	0,026<50%<0,032

Bioensaios de toxicidade realizados com amostras em quadruplicata em três dias alternados. ( - ) Ausência de mortalidade até 1000 ppm (Limite de biotoxicidade). Os complexos estão na relação de 1:1 (quelante:metal).

Os resultados dos bioensaios de toxicidade com larvas de 3<sup>o</sup> instar de *Ae. aegypti* foram analisados pelo programa Probits para determinação das concentrações letais, CL(s). Estas concentrações são mostradas na Tabelas 1 e 2. Para os complexos de EDTA, as concentrações letais para 50% da população de larvas, CL<sub>50</sub>, são para Na[Cu(NTA)] 224,01 mg/L, para Na[Cu(EDTA)] 263,08 mg/L, e para CuSO<sub>4</sub>. 5H<sub>2</sub>O 262,05 mg/L. A análise por conteúdo de metal contido na molécula revela que as quantidades em termos de metal são 51,79 mg/L para Na[Cu(NTA)], 41,78 mg/L para Na<sub>2</sub>[Cu(EDTA)] e 66,69mg/L para CuSO<sub>4</sub>. 5H<sub>2</sub>O, respectivamente. O complexo Na<sub>2</sub>[Cu(EDTA)] mostrou-se mais tóxico para larvas de *Aedes aegypti* em relação aos outros ativos, mas possuem a mesma ordem de grandeza.

Os resultados sugerem que a não letalidade quando expostos aos outros complexos APCs estão relacionados a elevada constante de estabilidade dos ativos e a não labilidade dos complexos no ambiente intracelular. Os valores das constantes de formação dos complexos metálicos com atividade são mostrados na Tabela 3.

**Tabela 03 – Logaritmo da Constante de estabilidade dos APCs NTA e EDTA com íons de transição Cu<sup>2+</sup> ou Fe<sup>3+</sup>.**

Ligante APC	Complexo APC – Metal	
	Log de K (Fe <sup>3+</sup> )	Log de K (Cu <sup>2+</sup> )
NTA	15,9	12,9
EDTA	25,1	18,8

Os complexos [Fe(NTA)], Na[Cu(NTA)] e Na<sub>2</sub>[Cu(EDTA)] mostraram atividade biológica e inseticida contra larvas de *Aedes aegypti*. As atividades podem estar relacionadas Constantes condicionais de estabilidade. A constante condicional é a variação do valor da constante de formação em função do pH. A labilidade dos complexos pode ser importante para a toxicidade dos íons metálicos que dependem do processo de redução de Cu<sup>2+</sup> para Cu<sup>1+</sup> e de Fe<sup>3+</sup> para Fe<sup>2+</sup> no ambiente celular (reduzidor) para produção de espécies radicais e oxidantes numa reação de estresse oxidativo e a ocorrência dos danos celulares e morte das larvas. Pode-se ver que na Tabela 3 o logaritmo da constante de estabilidade do complexo, Na[Fe(EDTA)] possui o valor de 25,1. Este valor indica a maior estabilidade entre os complexos mostrados, e, portanto, menor labilidade.

Estudo realizado por Rossi (2009) demonstram a bioatividade e toxicidade dos íons metálicos de transição, Cu<sup>2+</sup> e Fe<sup>3+</sup> na forma de aquocomplexo e quelato com EDTA para larvas de *Aedes aegypti* e náuplios de *Artemia salina*. Os resultados experimentais

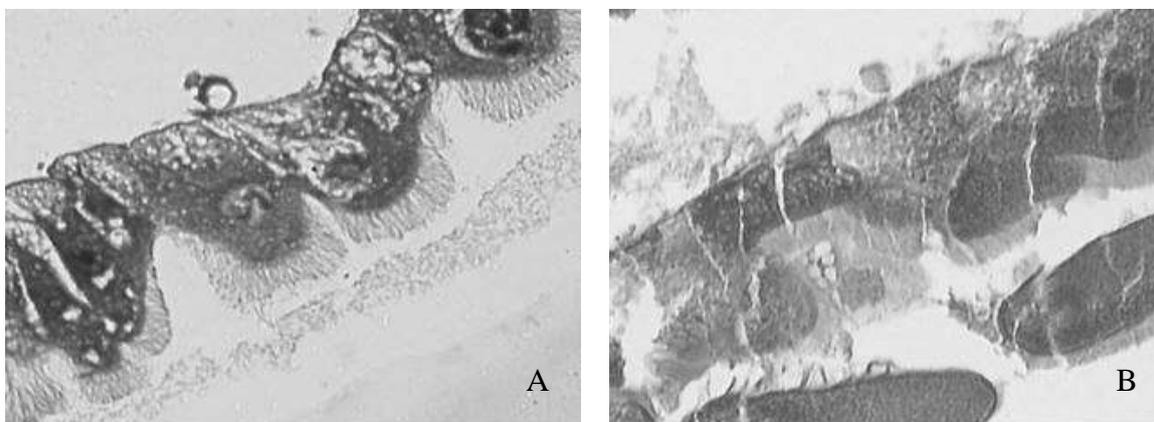
evidenciaram a ação tóxica dos íons dos sais de metal de transição como aquocomplexo associados e quelato metálico,  $\text{Co}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$ ,  $[\text{Ni}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ ,  $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ ,  $[\text{Zn}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ ,  $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$  e  $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$  e quelatos metálicos de  $\text{Na}_2[\text{Co}(\text{EDTA})]$ ,  $\text{Na}_2[\text{Ni}(\text{EDTA})]$  e  $\text{Na}_2[\text{Cu}(\text{EDTA})]$ .

Rayms - Keller *et al* (1998) observaram os efeitos biológicos sobre o *Aedes aegypti* quando submetidos a diferentes concentrações dos metais potencialmente tóxicos ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  e  $\text{Hg}^{2+}$ ) como forma de propor um sistema modelo para investigação destes metais em insetos aquáticos. Os resultados mostraram que o *Aedes aegypti* é sensível a efeitos crônicos ou de curta duração a metais de transição e dentre os seus efeitos observados inclui a inibição da eclosão dos ovos, mesmo quando submetido à concentração subletal, talvez pelo fato que o canal sirva como rota de entrada para a fertilização do esperma (micropile) e, desse modo ser permeável aos íons metálicos para o microambiente do ovo.

Um estudo anterior mostrou a desorganização da matriz peritrófica (MP) em larvas de *Aedes aegypti* quando expostas aos metais de transição, no intervalo de pH de 3 a 7. O sistema digestório responsável pela absorção de nutrientes e digestão extracelular é o alvo primário para toxicidade para metais de transição em insetos aquáticos, que afeta a integridade da membrana peritrófica (HARE, 1992).

Os resultados demonstram a atividade dos íons complexos  $[\text{Cu}(\text{NTA})]^{1-}$ ,  $[\text{Fe}(\text{NTA})]$  e  $[\text{Cu}(\text{EDTA})]^{2-}$  como ativos inseticidas para controle de formas imaturas de ovos e larvas de *Ae. aegypti*. Os íons complexos mostraram ser eficientes para inviabilizarem a eclosão dos ovos (resultados não mostrados) e induzirem danos irreversíveis e continuados ao sistema digestório das larvas a partir da desorganização da matriz peritrófica (MP).

Os complexos de  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$ , apesar da não atividade inseticida, possuem atividade diferenciada para controle de microrganismos, que estão presentes nos criadouros do *Aedes aegypti*, e, podem atuar sobre a cadeia alimentar dos insetos em concentrações muito baixas, predispondo uma situação não favorável à reprodução dos insetos. Adicionalmente, a esta situação é possível que mesmo em concentrações subletais os íons complexos possuam a habilidade de induzir a produção de radicais livres e espécies oxidantes, com danos celulares de menor intensidade, mas continuados por estresse oxidativo, alterando o metabolismo e comportamento das larvas de *Ae. aegypti*, em situação desfavorável ao inseto. Na Figura 01 mostra-se micrografia dos danos celulares provocados no sistema digestório de larva de 3º instar de *Aedes aegypti*.



**Figura 01** – Microscopia óptica da região do mesêntero com células epiteliais de larvas de *Ae. aegypti* de 3º instar submetidas diferentes concentrações de sal complexo

Na<sub>2</sub>[Cu(EDTA)]; **A)** controle (H<sub>2</sub>O); **B)** tratamento com 500 mg/L. 400X, coloração Eosina-Hematoxilina.

As imagens mostram as diferenças entre células normais (controle) e células do sistema digestório, região do mesêntero submetidas a ação de Na<sub>2</sub>[Cu(EDTA)] em concentração de 500 ppm. Pode-se visualizar a desorganização da matriz peritrófica (MP), danos celulares e teciduais crescentes, alterações de metaplasia das microvilosidades dos cecos gástricos em toda região do mesêntero; vacuolização citoplasmática nas células do epitélio do tubo digestório e destruição total das células do mesêntero das larvas de *Aedes aegypti* (parte intermediária do sistema digestório; pH 6-7).

### Antibiogramas com complexos APCs e acetatos metálicos

Os antibiogramas permitem verificar a sensibilidade ou susceptibilidade ou ainda a resistência das bactérias, *E. coli* ATCC – 25922 (*Gram negativa*) e *S. aureus* ATCC 25923 (*Gram positiva*) aos complexos APCs e aos acetatos Cu(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub> e Fe(CH<sub>3</sub>COO)<sub>3</sub>. As eficiências de inibição dos complexos APCs e acetatos no crescimento das bactérias no substrato gel (substrato nutritivo) foram avaliadas em diferentes concentrações molares (mol/L), pelo método de difusão em ágar (Método de Kirby-Bauer). A susceptibilidade do microrganismos aos complexos e acetatos foram diferenciadas e os resultados são mostrados pelos halos de inibição e respectivos desvios-padrões (mm) nas Tabelas 04, 05, 06 e 07. Os resultados de maior atividade biológica dos complexos APCs e acetatos são mostrados pelos maiores halos de inibição no substrato gel.

**Tabela 04 – Valores dos halos de inibição (mm) nos antibiogramas com a bactéria *E. coli* ATCC - 25922 (*Gram negativa*) com complexo Na<sub>x</sub>[Cu(APC)].**

Conc., Mol/L	Cu(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub>	Na[Cu(NTA)]	Na[Cu(HEDTA)]	Na[Cu(MGDA)]	Na <sub>2</sub> [Cu(EDTA)]	Na <sub>3</sub> [Cu(DTPA)]
0,1 Mol/L	12,3±0,23	11,6±1,5	3,95±0,15	12,3±0,25	14,7±0,20	19,6±0,15
0,01 Mol/L	9,6±0,22	11,6±1,5	3,80±0,13	12,1±0,05	14,3±0,18	19,5±0,1
0,001 Mol/L	8,6±0,25	11,0±1,0	–	–	11,3±0,16	14,5±0,1
0,0001Mol/L	7,6±0,21	10,6±1,5	–	–	8,4±0,17	8,8±0,1

Na Tabela 04 são mostrados os halos de inibição medidos para o Cu(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub> e complexos APCs para *E. coli* ATCC - 25922 (*Gram negativo*).

A maior atividade biológica foi obtida para Na<sub>3</sub>[Cu(DTPA)]. Os resultados mostram que os demais ativos também possuem atividade biológica diferenciada e decrescentes com a concentração. Os resultados sugerem que atividade biológica dos sais estão relacionados a hidrossolubilidade dos compostos para as bactérias *E. coli* ATCC - 25922. Pode-se observar que houve efeito inibitório no crescimento das bactérias para todos sais complexos. Os valores médio dos halos de inibição de 11,8 mm são superiores a sensibilidade da bactéria à oxacilina, que é o antibiótico mais utilizado no tratamento de infecções relacionadas a este microrganismo.

**Tabela 05 – Valores dos halos de inibição (mm) nos antibiogramas com a bactéria *E. coli* ATCC - 25922 (Gram negativa) com complexo Na<sub>x</sub>[Fe(APC)].**

Conc. Mol/L	Fe(CH <sub>3</sub> COO) <sub>3</sub>	[Fe(NTA)]	[Fe(HEDTA)]	[Fe(MGDA)]	Na[Fe(EDTA)]	Na <sub>2</sub> [Fe(DTPA)]
0,1 Mol/L	12,0±0,30	10,6±2,3	–	–	12,4±1,4	14,2±0,07
0,01 Mol/L	10,5±0,36	9,6±1,5	–	–	9,4±1,3	13,8±0,05
0,001 Mol/L	10,0±0,29	9,6,0±1,5	–	–	8,7±0,83	8,5±0,06
0,0001Mol/L	9,7±0,15	6,0±0,50	–	–	7,7±0,67	2,5±0,06

Na Tabela 05 são mostrados os halos de inibição medidos para o Fe(CH<sub>3</sub>COO)<sub>3</sub> e complexos APCs para *E. coli* ATCC - 25922 (Gram negativa). A maior atividade biológica foi obtida para Na<sub>2</sub>[Fe(DTPA)]. Os resultados mostram que os demais ativos possuem atividade biológica diferenciadas e decrescentes com a concentração, excetuando-se o [Fe(HEDTA)] e [Fe(NTA)].

A análise dos compostos mostram que ambos não possuem carga. Nestes complexos com Fe<sup>3+</sup> os resultados sugerem que atividade biológica desses sais estão relacionados a hidrossolubilidade dos compostos para atividade contra as bactérias *E. coli* ATCC - 25922. Os valores médio dos halos de inibição de 9,8 mm são superiores a sensibilidade da bactéria à oxacilina, que é o antibiótico mais utilizado no tratamento de infecções relacionadas ao microrganismo.

**Tabela 06 – Valores dos halos de inibição (mm) nos antibiogramas com a bactéria *S. aureus* ATCC 25923 (Gram positiva) com complexo Na<sub>x</sub>[Cu(APC)].**

Conc., Mol/L	Cu(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub>	Na[Cu(NTA)]	Na[Cu(HEDTA)]	Na[Cu(MGDA)]	Na <sub>2</sub> [Cu(EDTA)]	Na <sub>3</sub> [Cu(DTPA)]
0,1 Mol/L	9,8±1,4	11,6±1,5	13,3±0,12	16,5±0,25	17,3±0,24	20,5±0,15
0,01 Mol/L	9,6±0,4	11,4±1,5	13,0±0,15	16,1±0,15	16,8±0,19	20,0±0,13
0,001Mol/L	9,3±0,3	11,0±1,0	9,0±0,17	9,3±0,05	9,5±0,26	13,5±0,11
0,0001Mol/L	9,0±0,1	10,6±1,5	–	7,2±0,05	8,7±0,29	4,8±0,10

Os halos de inibição da Tabela 06 revelam que os sais acetato e complexo APCs são efetivos contra a bactéria *S. aureus*, em praticamente, todas as concentrações testadas. Os resultados mostraram que *S. aureus* é mais sensível aos ativos que *E. coli*.

**Tabela 07 – Valores dos halos de inibição (mm) nos antibiogramas com a bactéria *S. aureus* ATCC 25923 (Gram positiva) com complexo Na<sub>x</sub>[Fe(APC)].**

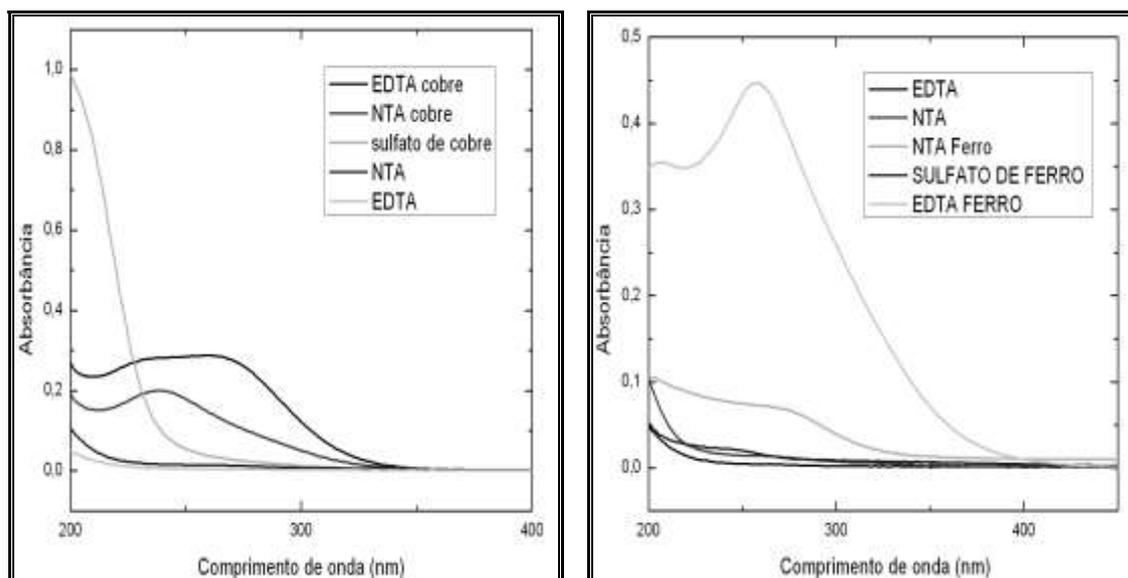
Conc., Mol/L	Fe(CH <sub>3</sub> COO) <sub>3</sub>	[Fe(NTA)]	[Fe(HEDTA)]	[Fe(MGDA)]	Na[Fe(EDTA)]	Na <sub>2</sub> [Fe(DTPA)]
0,1 Mol/L	9,6±0,22	10,6±2,3	8,3±0,23	6,7±0,13	12,6±1,1	16,3±0,25
0,01 Mol/L	9,3±0,23	9,6±1,5	8,0±0,15	6,5±0,10	11,4±0,9	15,8±0,28
0,001 Mol/L	0,9±0,25	9,6±1,5	–	–	9,5±0,63	9,8±0,14
0,0001Mol/L	0,8±0,21	6,0±0,50	–	–	7,3±0,87	2,3±0,05

Os resultados da Tabela 07 mostram que os antibiogramas realizados para o sais e complexo APCs-Fe<sup>3+</sup> contra a bactéria *S. aureus*, apresentaram atividade bactericida com formação do halo de inibição em quase todas as concentrações testadas, exceção para [Fe(HEDTA)] e [Fe(MGDA)]. Os resultados mostram na Tabela 07 que os antibiogramas realizados para o sal complexo [Fe(MGDA)] e a bactéria *S. aureus*, apresentam halo de inibição apenas na concentração até 0,01 Mol/L. Nas concentrações de 0,001 Mol/L e 0,0001Mol/L, não houve ação bactericida e a formação de halos de inibição.

A análise dos antibiogramas mostraram que os acetatos possuem ação antibiótica no intervalo de concentração de 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-4</sup> Mol/L. Os resultados sugerem que a presença da carga é importante para a atividade contra microrganismos. Estes resultados são importantes para investigação e proposição das estratégias para o controle de microrganismos (bactérias, fungos, microalgas, protozoários e até de outras espécies que podem se interrelacionar). Estes microrganismos estão nos criadouros do inseto e devem participar da cadeia alimentar das larvas de *Aedes aegypti*. Esta atividade secundária pode permitir o controle da larva do *Aedes aegypti*, em extensões variadas. As restrições impostas a alimentação ou desenvolvimento das larvas, pode controlar a dinâmica da reprodução para o mosquito da dengue.

### Espectroscopia de UV – Vis

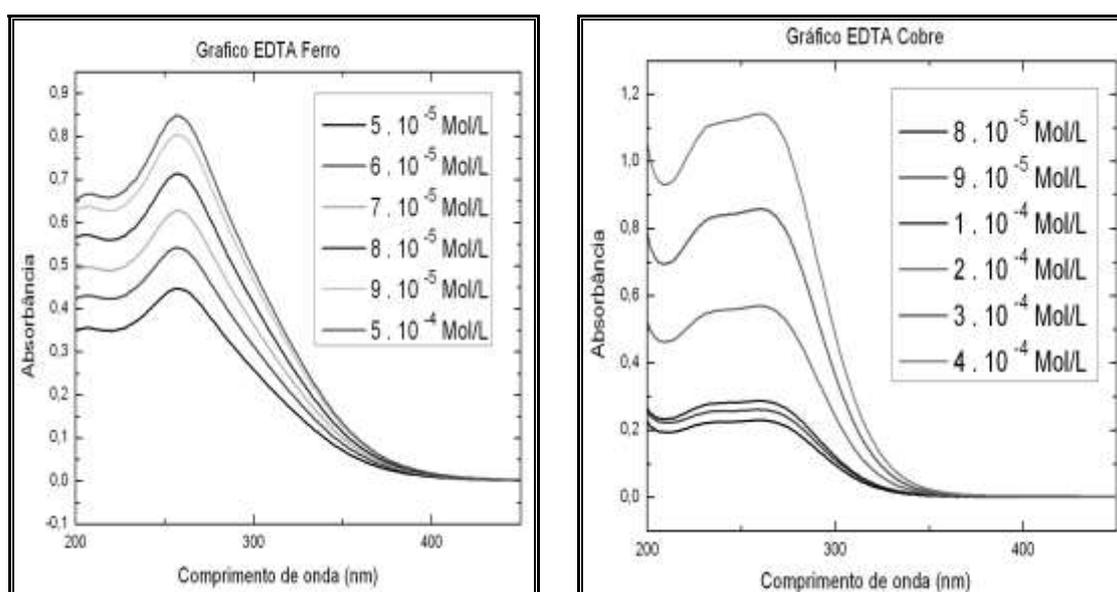
Estudos mostraram que os ligantes APCs, não apresentam absorção característica na região entre 200nm e 800nm. Os sais dos metais utilizados para a síntese dos complexos não apresentaram bandas características na faixa superior a 200 nm. Os resultados são mostrados na Figura 02.



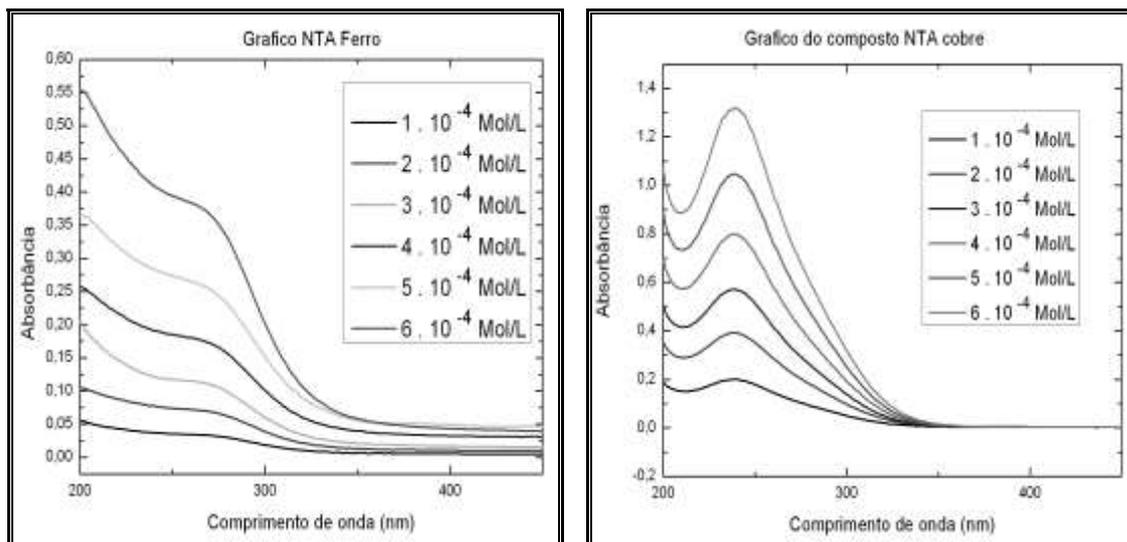
**Figura 02 – Estudo da variação da absorvância em função das alternâncias dos quelantes nos íons cobre (II) e ferro (III).**

Os gráficos da Figura 02 mostram que pode-se sugerir a formação dos complexos metálicos de  $\text{Na}[\text{Cu}(\text{NTA})]$ ,  $[\text{Fe}(\text{NTA})]$ ,  $\text{Na}_2[\text{Cu}(\text{EDTA})]$  e  $\text{Na}[\text{Fe}(\text{EDTA})]$ , a partir do deslocamento dos espectros dos ligantes, NTA e EDTA, que possuem absorvância na região inferior a 200 nm (HAASE *et al.*, 1969) e sais de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$  e  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$  que possuem máximo em absorvância abaixo de 200nm (XING *et al.*, 1998). Os complexos APCs possuem bandas características na região do visível.

O intervalo de linearidade de concentração *versus* absorvância para os comprimentos de onda característicos dos complexos e de máxima absorção. Os comportamentos dos espectros UV-Vis são apresentados nas Figuras 03 e 04.

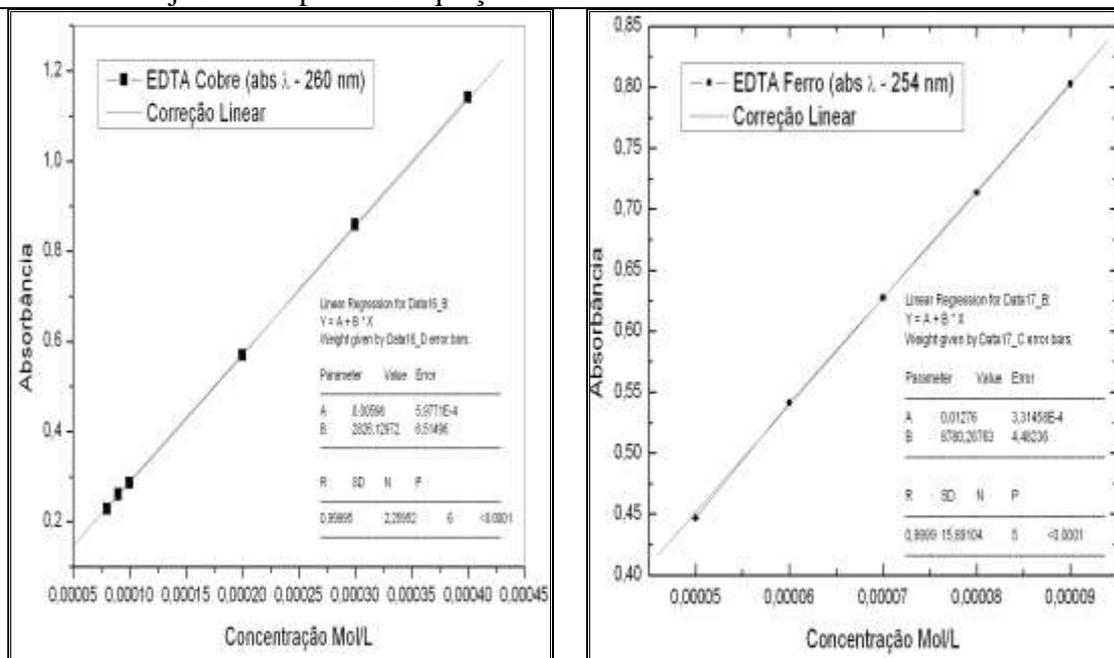


**Figura 03 – Espectros UV-Vis. das soluções  $\text{Na}[\text{Fe}(\text{EDTA})]$  de  $5 \cdot 10^{-4}$  a  $5 \cdot 10^{-5}$  e  $\text{Na}_2[\text{Cu}(\text{EDTA})]$  de  $4 \cdot 10^{-4}$  a  $8 \cdot 10^{-5}$ .**

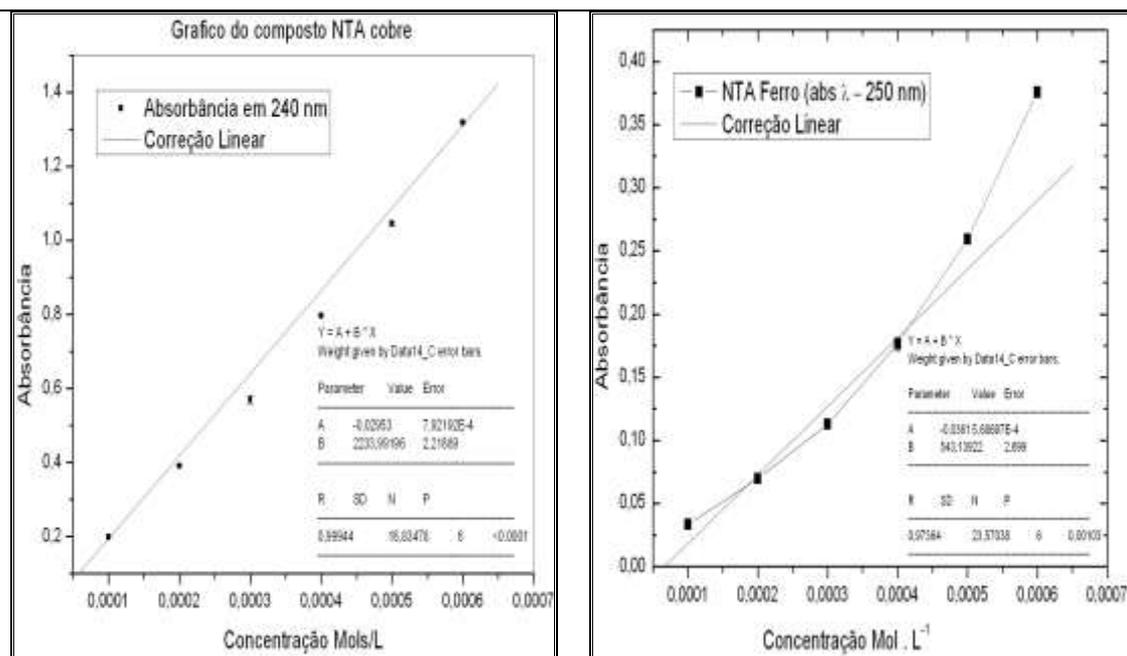


**Figura 04 – Espectros UV-Vis. das soluções [Fe(NTA)] e Na[Cu(NTA)] de  $1 \cdot 10^{-4}$  a  $6 \cdot 10^{-4}$ .**

A linearidade das absorbâncias pela concentração dos ativos produzidos, indicam que a espécie absorvedora ou cromóforo em termos de absorção comporta-se da mesma forma no intervalo, e, que a absorção é proporcional a concentração dessa espécie num comprimento de onda determinado ou seja existe uma linearidade entre a concentração e a absorbância dos ativos. As Figuras 05 e 06 mostram ajuste gráfico aos pontos experimentais, a qualidade do ajuste e respectivas equações matemáticas.



**Figura 05 - Linearidade e ajustes experimentais dos complexos  $Na_2[Cu(EDTA)]$  e  $Na[Fe(EDTA)]$ , respectivamente.**



**Figura 06 – Linearidade e ajustes experimentais dos complexos Na[Cu(NTA)] e [Fe(NTA)], respectivamente.**

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os sais e íons complexos APCs foram sintetizados, e analisados por duas vias, via sódica e via carbonato. Os bioensaios de toxicidade foram realizados com larvas de 3<sup>o</sup> instar de *Aedes aegypti* com sais complexos APCs de NTA, MGDA, HEDTA, EDTA e DTPA. Os antibiogramas foram realizados com bactérias *Gram positivas* e *Gram negativas* para análise da atividade biológica dos sais e íons metálicos para microrganismos. Os resultados mostraram que somente os complexos APCs Na[Cu(NTA)], [Fe(NTA)], Na<sub>2</sub>[Cu(EDTA)] através dos íons complexos [Cu(NTA)]<sup>-1</sup>, [Fe(NTA)] e [Cu(EDTA)]<sup>-2</sup> possuem atividade inseticida contra as formas imaturas do *Aedes aegypti*.

Estudos demonstraram que a toxicidade do Na<sub>2</sub>[Cu(EDTA)] é diferenciada em relação aos inseticidas convencionais (organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides), mas muito semelhante ao Bti - *Bacillus thuringiensis israelensis* - e alguns extratos vegetais, que atuam no sistema digestório do inseto. Os organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides atuam no sistema nervoso central (SNC) e periférico (SNP) do inseto por paralisia e inibição enzimática, enquanto os ativos complexos metálicos, atuam na desorganização da matriz peritrófica (considerada a primeira linha de defesa dos insetos), causando danos celulares e teciduais por produção de radicais livres (estresse oxidativo).

Tomando por base a análise dos gráficos de absorção molecular sugere-se a formação dos ativos estabelecendo uma relação constante entre sua concentração e grau de absorbância. Pode-se, assim, estabelecer a toxicidade/atividade inseticida dos íons complexos APCs de Cu<sup>2+</sup> e Fe<sup>3+</sup> de NTA e EDTA para larvas e ovos de *Ae. aegypti*. Os complexos metálicos de Cu<sup>2+</sup> e Fe<sup>3+</sup> de MGDA, HEDTA, EDTA e DTPA, apesar de não possuírem atividade inseticida até 1000 ppm, possuem intensa atividade biológica para bactérias *Gram positiva* e *Gram negativa*. Esta atividade biológica pode ser utilizada para controle do ambiente de

reprodução do inseto, a partir do controle da cadeia alimentar do inseto que é composta de microrganismos, matéria orgânica e protozoários.

Os complexos de Na[Cu(NTA)], [Fe(NTA)] e Na<sub>2</sub>[Cu(EDTA)] possuem as atividades larvicida e bactericida para controle de larvas de *Ae. aegypti* e microrganismos dos criadouros da cadeia alimentar das larvas de *Ae. aegypti*. A literatura mostra que a formação do complexo metálico reduz a reatividade e toxicidade do íon Cu<sup>2+</sup> e Fe<sup>3+</sup> para humanos e ambientes, apesar do aumento da mobilidade do íon metálico no ambiente e da baixa degradabilidade do EDTA.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CAMPOS, J, ANDRADE, C.F.S. Susceptibilidade larval de populações de *Aedes Aegypti* e *Culex* a inseticidas químicos. Rev. saúde pública, v.37, n.4, p.523-527, 2003.
2. CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) para análise de sensibilidade a antimicrobianos por disco difusão: Norma Aprovada – Oitava Edição - Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão, 2003. [http://www.anvisa.gov.br/servicosade/manuais/clsi/clsi\\_OPASM2-A8.pdf](http://www.anvisa.gov.br/servicosade/manuais/clsi/clsi_OPASM2-A8.pdf)
3. FINNEY, D.J. Probit Analysis: a statistical treatment of the sigmoid response curve. Cambridge University Press, Cambridge (UK), p.50-55, 1971.
4. FUNASA. Fundação Nacional da Saúde, Boletim Epidemiológico Brasília – DF, p.51, 2001.
5. GADELHA, D.P., TODA, A.T. Biologia e comportamento do *Aedes aegypti*. Revista Brasileira de Malariologia e doenças tropicais, v.37, p.29-36, 1985.
6. HAASE, G., DUNKLEY W. L. Ascorbic acid and copper in linoleate oxidation. III. Catalysts in combination J. Lipid Res., v.10, n.5, p.568-576, 1969.
7. HAMBURGER, M., HOSTETTMANN, K. Bioactivity in plants: the link between phytochemical and medicine, Phytochemistry, v.12, n.30, p.3864, 1991.
8. HARE, L. Aquatic insects and trace metals: bioavailability, bioaccumulation, and toxicity. Crit. Rev. Toxicol., v.22, p.327-369, 1992.
9. HARTBERG, W.K., CRAIG-Jr G.B. Reproductive isolation in *Stegomyia* mosquitos. II Hybrid breakdown between *Aedes aegypti* and *A. mascarensis*. Evolution, v.24, p.692-703, 1970.
10. HOSTETTMANN, K., QHEIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C. Princípios ativos de plantas superiores. Editora EDUFSCar, São Carlos, 2003.
11. JENKINS, D.W., Neuro-hormonal regulation of sexual receptivity in female *Aedes aegypti* Department of Biology, University of Notre Dame, Notre Dame, Indiana 46556 USA, 1959.
12. MACORIS, M.L.G., ANDRIGHETTI, M.T., TAKAKU, L., GLASSER, C.M., GARBELOTO, V.C., CIRINO, V.C.B. Alteração de resposta de suscetibilidade de *Aedes aegypti* a inseticidas organofosforados em municípios do Estado de São Paulo, Brasil. Rev Saúde Pública, v.33, p.521-2, 1999.
13. McLAUGHLIN, J.M. Crown gall tumours on potato discs and brine shrimp lethality: two simple bioassays for higher plant screening and fractionation. In K. Hostettmann,

- Assays for Bioactivity, Methods in Plant Biochemistry. Academic Press, San Diego, p.2-32, 1991.
14. RAYMS-KELLER, A., OLSON, K. E., MCGAW, M., ORAY, C., CARLSON, J. O., BEATY, B. J. Effect of heavy metals on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, v.39, p.41-47, 1998.
  15. ROSSI, A.P.L. Análise dos efeitos tóxicos de íons metálicos de transição ( $\text{Co}^{+2}$ ,  $\text{Ni}^{+2}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+3}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ ) e EDTA em larvas de *Aedes aegypti* (Culicidae) e *Artemia salina* L., 1758 (Artemidae). Dissertação de mestrado, Universidade Católica Dom Bosco - Mestrado em Biotecnologia, Campo Grande, MS. 2009.
  16. SKOOG, D.A., WEST, D.M., HOLLER, F.J., CROUCH, S.R. Fundamentals of analytical chemistry. 8oed. Ed(s). Thomson/Brooks/Cole - Thomson Learning, Belmont, CA, USA, Chapter 17, p.449-485, 2004.
  17. SORENSON, J.R. Development of copper complexes for potential therapeutic use. *Agents Actions Suppl.*, v.8, p.305-325, 1981.
  18. TAUIL, P.L. Aspectos críticos do controle do dengue no Brasil. *Cad. Saúde Pública*, v.18, n.3, 2002.
  19. WHO –World Health Organization. Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides: WHO-VBC, v.81, n.807, p.1-6, 1981.
  20. WHO -World Health Organization. Dengue / dengue haemorrhagic fever in the Americas. Summary of research and control in the Americas. 2001.
  21. XING, X., BAFFIC, J., SPARROW, C.P. LDL oxidation by activated monocytes: characterization of the oxidized LDL and requirement for transition metal ions. *J. Lipid Res.*, v.39, n.11, p.2201-2208, 1998.