

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE

Harry Luiz Pilz Júnior

**AÇÃO DE SAIS IMIDAZÓLICOS SOBRE A MICROBIOTA DE LARVAS DE *Aedes
aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE)**

Porto Alegre
2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE

AÇÃO DE SAIS IMIDAZÓLICOS SOBRE A MICROBIOTA DE LARVAS DE *Aedes aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE)

Harry Luiz Pilz Júnior

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Onilda Santos da Silva

Coorientadora :Prof^a. Dr^a. Gertrudes Corção

Porto Alegre

2018

CIP - Catalogação na Publicação

Pilz Júnior, Harry Luiz

Ação de sais imidazólicos sobre a microbiota de larvas de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) / Harry Luiz Pilz Júnior. -- 2018.

63 f.

Orientadora: Onilda Santos da Silva.

Coorientadora: Gertrudes Corção.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. Controle Químico. 2. Bactérias. 3. Culturômica. 4. Axênico. I. Santos da Silva, Onilda, orient. II. Corção, Gertrudes, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

*“The greatest enemy of knowledge is not ignorance, it is
the illusion of knowledge”*

Daniel Boorstin

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, dedico este trabalho a minha mãe, Rejane, por todo o apoio (em todos os sentidos) e por me mostrar o quão forte um ser humano pode ser, você é um exemplo, seu legado continuará para sempre em mim.

Agradeço a minha irmã, Anelise e minha sobrinha, Laura, por me apoiarem e me demonstrar o que é amor no contexto familiar.

Ao meu namorado, Alisson, sem você, com certeza, esta etapa da minha vida não teria sido possível. Agradeço pelo amor, apoio, paciência, companheirismo e todos momentos juntos.

A minha amiga, Ana, por ter continuado comigo durante todos estes anos, me auxiliando e provendo alegria, distração e por me ouvir em momentos de ansiedade.

As colegas e amigas, Alessandra e Emanuelle. Muito obrigado por toda a ajuda durante a realização deste trabalho e pelos momentos fora do ambiente profissional, que tanto me ajudaram no crescimento profissional como no pessoal.

A minha orientadora, Onilda, por ter me acolhido como orientado e ter me mostrado tanto conhecimento que com certeza será de grande valia para o meu futuro como pesquisador e docente.

A minha co-orientadora Gertrudes, por toda ajuda disponibilizada, inclusive nas horas de “aperto”.

Aos colegas e laboratoristas do departamento de Parasitologia, meu muito obrigado pela ajuda no cotidiano de trabalho.

Agradeço ao Instituto do Petróleo e dos Recursos Naturais, especialmente a Leticia, pela ajuda na parte das técnicas moleculares.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq) pela concessão da bolsa.

AÇÃO DE SAIS IMIDAZÓLICOS SOBRE A MICROBIOTA DE LARVAS DE *Aedes aegypti* (DIPTERA:CULICIDAE)

Autor: Harry Luiz Pilz Júnior

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Onilda Santos da Silva

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Gertrudes Corção

RESUMO

Mosquitos são considerados importantes vetores de agentes patogênicos devido à sua característica hematofágica. Dentre as diversas espécies de importância para a saúde pública, *Aedes aegypti* se destaca por ser capaz de manter, replicar e transmitir inúmeros microrganismos causadores de doenças como a dengue, febre amarela urbana, zika e chikungunya. Contudo, algumas relações podem ser benéficas, especialmente com bactérias, cuja interação auxilia no desenvolvimento, nutrição, reprodução e imunidade do mosquito. O controle deste vetor é a principal forma de impedir a disseminação dos patógenos, porém o uso de produtos químicos e biológicos levou ao desenvolvimento de populações resistentes e, conseqüentemente, a uma maior dificuldade em controlar suas populações. Recentemente, sais imidazólicos mostraram-se extremamente eficazes como larvicidas, mesmo em baixas concentrações. Estes já são utilizados na indústria farmacêutica como antifúngicos, antibacterianos e até no tratamento contra o câncer. Considerando essa atividade bactericida, este estudo propôs testar se sais imidazólicos teriam ação sobre a microbiota de larvas de *Ae. aegypti* que pudesse induzir a sua morte. Assim, as larvas foram expostas a diferentes concentrações de dois sais imidazólicos sendo, em seguida, identificada a microbiota cultivável através de uma abordagem culturômica e diversidade de bactérias através de técnicas moleculares. Além disso, comparou-se a ação do sal em larvas axênicas. Os resultados mostraram que houve alteração tanto nas espécies cultiváveis, como na diversidade, inclusive modificando as comunidades bacterianas. Além disso, larvas axênicas se tornam menos suscetíveis aos sais imidazólicos. Este é o primeiro trabalho que demonstra sais imidazólicos interagindo com a microbiota de larvas de *Ae. aegypti*, além de prover um primeiro *insight* sobre o seu modo de ação.

Palavras-chave: Controle Químico, Bactérias, Culturômica, Axênico.

¹Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (63 p.) 08, 2018.

ACTION OF IMIDAZOLIUM SALTS ON THE MICROBIOTA OF *Aedes aegypti*
(DPTERA: CULICIDAE) LARVAE

Author: Harry Luiz Pilz Júnior

Advisor: Prof. Dr. Onilda Santos da Silva

Co-Advisor: Prof. Dr. Gertrudes Corção

ABSTRACT

Mosquitoes are considered important vectors of pathogens due to their hematophagy characteristics. Among the several species of importance for public health, *Aedes aegypti* stands out for being able to maintain, replicate and transmit numerous microorganisms that cause diseases such as dengue fever, urban yellow fever, zika, and chikungunya. However, some relationships may be beneficial, especially with bacteria, whose interaction assists in the development, nutrition, reproduction and immunity of the mosquito. Controlling this vector is the main way to prevent pathogens from spreading, but the use of chemical and biological products has led to the development of resistant populations and, consequently, to greater difficulty in controlling them. Recently, imidazole salts have proven to be extremely effective as larvicides, even at low concentrations. They are already used in the pharmaceutical industry as anti fungal, anti bacteria and even as cancer treatment. Considering this bactericidal activity, this study proposed to test if imidazolic salts would have action on the microbiota of *Ae. aegypti* that could induce its death. Thus, the larvae were exposed to different concentrations of two imidazole salts, and then the cultured microbiota was identified through a culturomics approach and bacterial diversity through molecular techniques. In addition, the action of salt on axenic larvae was compared. The results showed that there was alteration both in the cultivable species, as in the diversity, including the modification of bacterial communities. In addition, axenic larvae became less susceptible to imidazole salts. This is the first work that demonstrates imidazole salts interacting with the larval microbiota of *Ae. aegypti*, as well as it provides the first insight into its mode of action.

Key-words: Chemical Control, Culturomics, Axenic.

¹Master of Science Thesis in Agricultural and Environmental Microbiology – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (63 p.) 08, 2018.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo Geral	3
2.3 Objetivos Específicos	3
3 REVISÃO DA LITERATURA	4
3.1 <i>Aedes aegypti</i>	4
3.1.1 Histórico e Distribuição.....	4
3.1.2 Biologia e Desenvolvimento	6
3.1.3 Arboviroses	8
3.2 Microbiota de Insetos	9
3.2.1 Bactérias Simbiontes em Insetos	9
3.2.2 Microbiota em culicídeos	10
3.3 Controle de Insetos	13
3.4 Sais Imidazólicos	14
4 MATERIAL E MÉTODOS	17
4.1 Manutenção dos mosquitos	17
4.2 Sais de Imidazol	17
4.3 Ensaio de exposição das larvas com os sais imidazólicos	18
4.4 Isolamento das bactérias cultiváveis	18
4.5 Identificação das bactérias cultiváveis	19
4.6 Avaliação da diversidade bacteriana através Análise do Espaço Intergênico Ribossomal - RISA	20
4.6.1 Extração e amplificação de DNA.....	20
4.6.2 Aplicação e análise do gel de RISA	21
4.7 Ensaios de toxicidade com larvas axênicas	21
4.7.1 Produção de larvas axênicas	21
4.7.2 Ensaios de Toxicidade	23
4.7.3 Ensaios de Recolonização e Reexposição.....	23
4.7.4 Análise estatística	25
5 RESULTADOS	26
5.1 Bactérias cultiváveis em adultos de <i>Ae. aegypti</i>	26

5.2 Bactérias cultiváveis em larvas de <i>Aedes aegypti</i> tratadas com os sais imidazólicos.....	28
5.3 Análise da diversidade bacteriana por RISA	29
5.4 Efeito dos sais imidazólicos sobre larvas axênicas de <i>Aedes aegypti</i>.....	33
5.4.1 Efeito dos sais imidazólicos em larvas axênicas expostas, re-colonizadas e re-expostas.....	34
6 DISCUSSÃO	36
7 CONCLUSÃO	41
REFERÊNCIAS.....	42
APÊNDICE A – ANÁLISE DO PERFIL DE BANDAS PARA CONSTRUÇÃO DE ÁRVORES FILOGENÉTICAS.....	49

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 Sequência dos oligonucleotídeos indicadores utilizados para a análise por RISA.....	20
Tabela 2 Lista de espécies bacterianas identificadas através da abordagem culturômica nos diferentes grupos avaliados.....	27
Tabela 3 Lista de espécies bacterianas identificadas pela abordagem culturômica nas larvas tratadas com os sais imidazólicos.....	29

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 Fêmea de <i>Aedes aegypti</i> realizando repasto sanguíneo.....	4
Figura 2 Distribuição de <i>Aedes aegypti</i> demonstrando regiões de maior e menos suscetibilidade a doenças associadas ao vetor.....	5
Figura 3 Fases de desenvolvimento do mosquito <i>Aedes aegypti</i>	8
Figura 4 Gêneros bacterianos encontrados em culicídeos, baseado no gene 16S rRNA.....	12
Figura 5 Estrutura geral de um sal imidazólico.....	15
Figura 6 Desenho esquemático para a produção de larvas de <i>Ae. aegypti</i> axênicas.....	23
Figura 7 Desenho experimental para o teste de reexposição e recolonização de larvas de <i>Ae. aegypti</i>	24
Figura 8 Diagrama de Venn com as espécies bacterianas encontradas nos diferentes grupos.....	28
Figura 9 Perfil de bandas (<i>fingerprint</i>) gerado a partir das larvas tratadas com diferentes concentrações de C18MImCl, CL99 são as larvas expostas a concentração de 20 µg/L e CL50 expostas a concentração de 10 µg/L. C são larvas sem nenhum tratamento.....	30
Figura 10 Perfil de bandas (<i>fingerprint</i>) gerado a partir das larvas tratadas com diferentes concentrações de C16MImMeS, CL99 são as larvas expostas a concentração de 20 µg/L e CL50 expostas a concentração de 10 µg/L. C são larvas sem nenhum tratamento.....	31
Figura 11 Arvore filogenética a partir dos perfis de banda gerados através de RISA das comunidades bacterianas tratadas com o C16MImMeS nas diferentes concentrações. Arvore construída através do <i>software</i> PyElph através do coeficiente de Dice e agrupadas pelo algoritmo UPGMA, as distâncias estão apresentadas por dissimilaridade.....	32
Figura 12 - Arvore filogenética a partir dos perfis de banda gerados através de RISA das comunidades bacterianas tratadas com o C18MImCl nas diferentes concentrações. Arvore construída através do <i>software</i> PyElph através do coeficiente de Dice e agrupadas pelo algoritmo UPGMA, as distâncias estão apresentadas por dissimilaridade.....	32

Figura 13 Índice de diversidade de Shannon (H') estimado para a microbiota após os tratamentos com ambos SI testados em diferentes concentrações. As barras representam o desvio padrão.....	33
Figura 14 Mortalidade de larvas (axênicas e saudáveis) expostas em ambos sais imidazólicos, temephos e controle, em 24 horas e 48 horas após a exposição.....	34
Figura 15 Mortalidade de larvas após serem re-colonizadas e re-expostas ao ambos sais imidazólicos.....	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μg	Microgramas
μL	Microlitros
ANOVA	Análise de Variância
B.O.D	Câmara de Germinação
<i>Bt</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
<i>BTi</i>	<i>Bacillus thuringiensis serovar Israliensis</i>
CHIKV	Vírus da Chikungunyua
CL	Concentração Letal
CL ₂₀	Concentração Letal que ocasiona morte de 20%
CL ₅₀	Concentração Letal que ocasiona morte de 50%
CL ₉₉	Concentração Letal que ocasiona morte de 99%
DENV	Vírus da Dengue
g	Gramas
H'	Diversidade de Shannon
LB	Meio Luria-Bertrani
MALDI-TOF	Espectrometria de Massa por Ionização e dessorção a laser assistida por matriz com tempo de voo
mL	Mililitros
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão Fosfato-Salino
PCR	Reação em cadeia da Polimerase
RISA	Análise do Espaço Intergênico Ribossomal
SI	Sais Imidazólicos
TSA	Ágar Triptona de Soja
UPGMA	Algoritmo de Média Aritmética
ZIKV	Vírus da Zika

1 INTRODUÇÃO

A família dos culicídeos está representada, especialmente, por insetos que podem transmitir inúmeros agentes patogênicos a vertebrados, justamente por apresentarem característica hematófaga. Neste contexto, os mosquitos são considerados um dos principais vetores de agentes de doenças, tais como arboviroses, plasmódios, filarias e outros agentes pouco conhecidos. (Biteye et al., 2018).

Aedes aegypti é uma espécie de mosquito amplamente conhecida por conseguir manter, replicar e transmitir agentes patogênicos, como os vírus da dengue, febre amarela urbana, zika e chikungunya. Essas arboviroses tem aumentado gradativamente ao passar das décadas, causando um grande impacto na saúde pública mundial (Ducheyne et al., 2018). Esse diptero desenvolve interações ecológicas com outras espécies, principalmente com micro-organismos (além de outros insetos e organismos). A microbiota de insetos vetores, especialmente de mosquitos, tem desempenhado papel crucial no processo evolutivo desses organismos, influenciando várias funções biológicas como: nutrição, reprodução, desenvolvimento, imunidade, além de mediar ou impedir a instalação de patógenos e, conseqüentemente, sua transmissão (Ricci et al., 2012).

Atualmente, uma vacina para a dengue foi registrada, porém a sua eficácia é de 60%. Isso demonstra que o controle e a prevenção dessa e outras doenças arbovirais ainda dependem do controle do vetor. A Organização Mundial da Saúde estabelece normativas para o controle das populações desse mosquito, utilizando um mesclado de produtos de origem química e biológica a fim de se atingir um manejo eficaz de formas larvais e adultas (OMS, 2017).

No entanto, os métodos de controle atuais apresentam problemas, como o seu alto custo tanto para o controle químico como para o biológico. O controle químico apresenta, ainda, baixa especificidade a organismos alvo, e, portanto, é tóxico para organismos não-alvo, incluindo a espécie humana. A resistência de populações frente a diferenciados produtos está sendo detectada desde 1999, com o produto Temephos e, desde 2005, com bioformulados a base de *Bacillus thuringiensis* (Bt) (Aguirre-Obando et al., 2016; Tabashnik et al., 2013).

Recentemente, Goellner et al., (2018) demonstraram a eficácia de dois sais imidazólicos cloreto de 1-n-octadecil-3-methylimidazolium ($C_{18}MImCl$) e Metanossulfonato de 1-n-hexadecil-3-methylimidazolium ($C_{16}MImMeS$) para o controle de larvas de *Ae. aegypti* em condições de laboratório. Entretanto, o mecanismo de ação dessas moléculas na mortalidade das larvas ainda não está elucidado. De acordo com Furlani et al (2013), sais imidazólicos apresentam ação antibacteriana em várias espécies. Assim, se os mesmos poderiam afetar a microbiota das larvas dessa espécie de mosquito, inibir o seu desenvolvimento – por apresentar ação antimicrobiana – e, conseqüentemente, a morte das larvas.

Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar o potencial das duas moléculas de sais imidazólicos sob a microbiota de larvas de *Ae. aegypti* para, possivelmente, se obter um uma primeira elucidação do mecanismo de ação destes sais na mortalidade de larvas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Estudar a microbiota cultivável de *Aedes aegypti* mantidos em laboratório e avaliar a ação de sais imidazólicos sobre sua diversidade.

2.3 Objetivos Específicos

- Padronizar uma técnica de identificação microbiana cultivável através de uma abordagem culturômica para adultos do mosquito;
- Identificar a microbiota cultivável de larvas expostas a diferentes concentrações letais dos sais;
- comparar a diversidade bacteriana de larvas expostas a diferentes concentrações letais dos sais através de RISA;
- verificar a mortalidade de larvas axênicas expostas a uma CL₉₉ dos sais.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 *Aedes aegypti*

3.1.1 Histórico e Distribuição

Aedes aegypti (Diptera: Culicidae) (Linnaeus, 1762) é pertencente ao subgênero *Stegomyia*, originário do continente africano e descrito, posteriormente, no Egito. Espalhou-se para os trópicos por meio do rápido avanço marítimo, industrial e comercial entre os séculos XVII e XIX. No Brasil, a introdução do mosquito, provavelmente, ocorreu com as colonizações europeias indiretamente, sendo relatado pela primeira vez em 1898. Nos anos 30, o mosquito já ocupava pequenas áreas brasileiras e o controle dele começou a ser realizado nos anos 40. Desde então, a espécie passou momentos de erradicação e reaparecimento. Atualmente o mosquito é encontrado em todos os estados brasileiros (Guedes, 2012; Gubler, 2011)



Figura 1 - Fêmea de *Aedes aegypti* realizando repasto sanguíneo. Fonte: IOC-FIOCRUZ

Aedes aegypti é um mosquito cosmopolita, distribuído em zonas tropicais e subtropicais, geralmente em localidades onde as temperaturas no inverno não ultrapassam 10°C e em zonas isotermais de 20°C. Ou seja, apesar da sua

distribuição ser influenciada por vários fatores abióticos, o principal fator é a temperatura (Courlet e Bendict, 2014). A chuva não é um fator limitante para o desenvolvimento do inseto, uma vez que ele pode se desenvolver em criadouros artificiais, nos quais a água é preenchida pelo homem. A pluviosidade tem mais influência em *Aedes albopictus*, pois seus criadouros não se dão, preferencialmente, em ambiente domiciliar. No Brasil, a ocorrência da espécie acontece, preferivelmente, em áreas urbanas, dentro de domicílios e peridomicílios, isto é, zonas de alteração provocado pelo ser humano, com grande densidade populacional e pouca cobertura vegetal (Consoli e Oliveira, 1994).

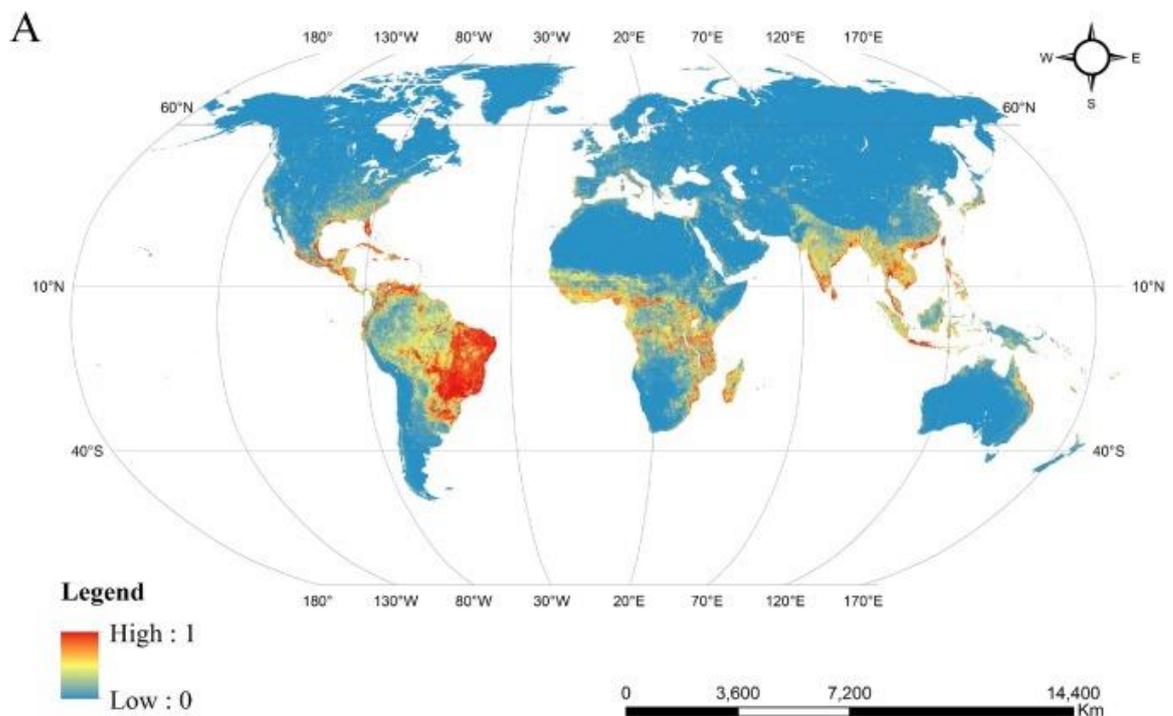


Figura 2 – Distribuição de *Aedes aegypti* demonstrando regiões de maior e menor suscetibilidade a doenças associadas ao vetor. Fonte: Adaptado de Ding et al.

2018

Entretanto, este mosquito apresenta a habilidade de se adaptar a várias condições adversas ambientais, sendo encontrado em localidades cujas temperaturas no inverno ficam abaixo de 0°C (Ding et al. 2018). Outros fatores limitadores podem ser a altitude e condições extremas como, por exemplo, as desérticas e regiões populacionais isoladas (Braks et al., 2003).

3.1.2 Biologia e Desenvolvimento

Aedes aegypti é uma espécie de mosquito que tem hábitos diurnos, são antropofílicos e seu ciclo biológico é do tipo holometábolo (Figura 3). A oviposição ocorre no amanhecer e no período crepuscular, geralmente em criadouros artificiais contendo água limpa e parada, ou seja: em apoios de vasos de planta, caixas de água, telhas, cisternas, entre outros. Raramente, o mosquito pode ser encontrado em criadouros naturais como bromélias e buracos de árvores (Edman et al., 1992; Consoli e Lourenço-de-Oliveira, 1994).

Por apresentar essa característica de ovipositar em lugares com água parada, a densidade populacional deste mosquito está relacionada a grandes volumes de chuvas, e, conseqüentemente, estações de índices de pluviosidade elevados apresentam abundância maior dessa espécie (Souza, et al., 2010).

A cada dois ou três dias após o repasto sanguíneo, as fêmeas fazem a desova, reiniciando o ciclo gonotrófico (período entre um repasto sanguíneo e outro), podendo, ainda, a fêmea realizar outros repastos sanguíneos dentro do ciclo. Essa característica faz com o que esse vetor esteja sempre em contato com o ser humano, potencializando as chances de transmissão de algum arbovirus (Halstead, 2008; Weaver e Reisen, 2010).

Ao ovipositar, uma fêmea pode colocar cerca de 120 ovos por repasto sanguíneo. Esse mosquito desenvolveu uma estratégia evolutiva de ovipositar pequenas partes dos ovos, em diferentes localidades, para assegurar uma maior distribuição de ovos e, conseqüentemente, amenizar a predação por outros organismos. Além disso, um ovo pode resistir até um ano após a sua postura, auxiliando ainda mais no crescimento populacional da espécie. Os ovos possuem como característica coloração clara após a postura, e, com o tempo, tornam-se escuros (Consoli e Lourenço-de-Oliveira, 1994; Forattini, 2002).

Quanto à morfologia dos ovos, esses possuem cerca de 1mm de comprimento, sem estruturas de flutuação. Sua simetria bilateral tem aspecto alongado, possui cório e pode ser dividida em três principais camadas: vitelo interno delgado, endócrino rígido e exocório delgado (Consoli e Lourenço-de-Oliveira, 1994).

O início da fase aquática ocorre quando o ovo se submerge na água e inicia o processo de eclosão. Essa eclosão está diretamente ligada a vários

fatores, geralmente a temperaturas de amplitude de 27°C a 30°C e a um aumento significativo da pluviosidade ou oferta de criadouros artificiais. (Consoli e Lourenço-de-Oliveira, 1994).

As larvas possuem um par de antenas não-segmentadas, peças bucais formadas por uma epifaringe, mandíbulas, maxilas, hipofaringe, lábio superior com escovas, um tórax globular sem segmentação (maior que a cabeça), abdômen segmentado (9 segmentos) e região anal com quatro papilas anais. A larva também possui espiráculos no penúltimo segmento na região dorsal e no sifão respiratório. Os péctens estão localizados em forma de fileira no sifão, bem como no oitavo segmento abdominal e não possuem uma funcionalidade morfológica descrita, mas servem como um bom indicador para identificação no gênero *Aedes* e as espécies relacionadas. A larva possui, ainda, quatro estádios de desenvolvimento (Christophers, 1960).

No primeiro estágio as larvas são pequenas e com presença de uma estrutura quitinosa na região anterior da cabeça, cuja função é auxiliar em sua eclosão do ovo. Os outros três estádios são diferenciados pelo tamanho em cada um, com um aumento no número de cerdas ao longo do corpo (Christophers, 1960).

A pupa pode ser caracterizada por duas regiões: cefalotórax e abdome, sendo que o último apresenta oito segmentos. O cefalotórax possui duas trompas respiratórias subcônicas e o abdômen apresenta duas estruturas laminares denominadas paletas natatórias (Christophers, 1960).

O adulto possui o corpo constituído por cabeça, tórax e abdômen. As antenas, em machos, possuem pelos plumosos e, em fêmeas, pilosos. Em sua totalidade corporal, possui corpo escuro e manchas brancas. No tórax, possui linhas brancas-prateadas em forma de lira. Internamente, possui um canal alimentar constituído por esôfago, divertículos ventrais e dorsais, glândulas salivares e – assim como na larva – um intestino constituído em três partes (anterior, médio e posterior) (Christophers, 1960).

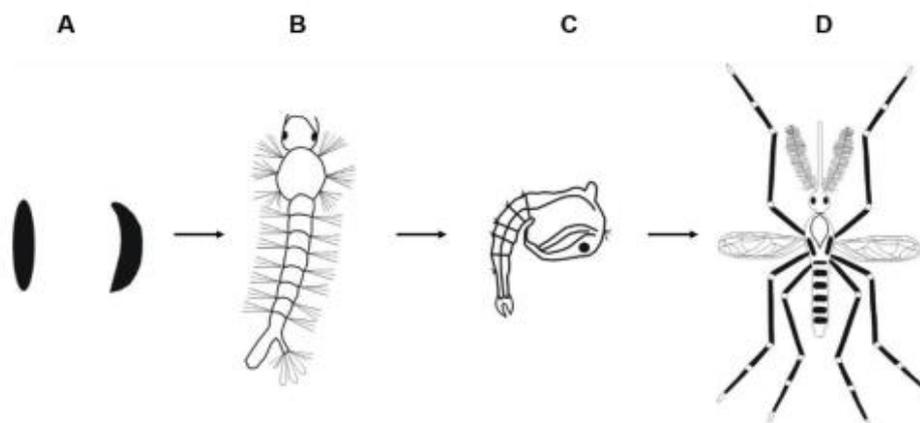


Figura 3 – Fases de desenvolvimento do mosquito *Aedes aegypti*. Fonte: Lemos, 2016.

3.1.3 Arboviroses

Aedes aegypti possui capacidade e competência vetorial para inúmeros arbovírus como febre amarela, dengue, Chikungunya e Zika (Franz et al. 2015). A febre amarela foi a primeira doença associada a esse mosquito e hoje está fundamentada sob duas formas diferentes, a febre amarela silvestre e urbana. A forma silvestre não está relacionada a *Ae. aegypti*, mas aos culicídeos do gênero *Haemagogus* e *Sabethes*. Esse vírus se apresenta na forma de um sorotipo e possui uma vacina, que é largamente usada para a imunização frente a essa doença. (Bisset, 2002).

A dengue (DENV) é considerada uma das mais importantes arboviroses que acometem os seres humanos. Conforme a OMS (2018), por ano, mais de 390 milhões de pessoas do mundo são atingidas, demonstrando a relevância que essa doença possui. Ela é caracterizada por um vírus do gênero *Flavivirus*, da família *Flaviviridae*, que possui sua multiplicação garantida em espécies de mosquitos hematófagos, como os do gênero *Aedes*. Por apresentar quatro sorotipos principais, essa doença ainda não apresenta uma vacina totalmente eficaz, e, portanto, o controle do mosquito ainda é a principal forma de conter a doença. (Barth, 2000). Atualmente, uma vacina para a dengue foi registrada, porém, nos estudos realizados, ela mostrou cerca de 60% de eficácia, demonstrando que a prevenção e o controle dessa doença dependem do controle do vetor ainda. (OMS, 2017).

Aedes aegypti também, está associado a transmissão de Chikungunya (gênero *Alphavirus*) (CHIKV) e o Zika Vírus (gênero *Flavivirus*) (ZIKV). Ambos estão relacionados com grandes surtos modernos provocados pela associação desses com o mosquito e apresentam características preocupantes na saúde pública. Ainda vale constar que esse mosquito pode, ainda, transmitir uma variedade de mais de 60 arboviroses, conforme o Catálogo Internacional de Arbovírus. Isso demonstra que, ao longo do tempo, outras doenças podem acometer humanos e mostra, novamente, a relevância desse vetor na saúde pública. (Schilte et al., 2013; Plourde e Bloch, 2016).

3.2 Microbiota de Insetos

3.2.1 Bactérias Simbiontes em Insetos

A microbiota em quaisquer organismos pode ser definida como o conjunto de micro-organismos que habitam e colonizam espaços ou órgãos em seus hospedeiros. Essa associação está descrita em vários organismos – desde pequenos protozoários até plantas – e podem ultrapassar a quantidade genética intrínseca do hospedeiro. Sendo assim, alguns autores denominam a microbiota como um “órgão”, uma vez que possui características importantes para a sobrevivência do hospedeiro (Klepzig et al., 2009; Willing e Jansson, 2011; Sender et al., 2016).

As bactérias, ao longo da história evolutiva dos insetos, contribuíram de forma positiva sobre o *fitness* e características adaptativas, uma vez que auxiliam na síntese e na captação de nutrientes que muitas vezes não estão disponíveis a níveis satisfatórios na alimentação do inseto. Essa associação, bactéria-inseto, é encontrada em pelo menos 20% dos insetos que foram estudados até hoje e pelo menos 10% dos insetos necessitam da microbiota mutualística para sobrevivência e reprodução (Moran e Baumann, 2000).

As associações que podem ser estabelecidas em insetos são, atualmente, definidas como: simbiote primário ou obrigatório e simbiote secundário ou facultativo, podendo essa interação acontecer a nível intracelular formando bacteriócitos ou até mesmo por órgãos especializados chamados de bacterioma (Baumann, 2005).

Bactérias podem ser encontradas em diferentes órgãos nos insetos. Por exemplo, no intestino médio, túbulos de Malpighi (Chavshin et al., 2015), glândulas salivares (Sharma et al., 2014) e ovários (Gusmão et al., 2010). Um dos simbiontes mais mencionados na literatura é a *Wolbachia*, estando ela presente em 60% dos insetos. Essa espécie apresenta características na sobrevivência e no bloqueio de infecções de vírus de RNA (Dutra, et al., 2016).

É sabido que bactérias que estão no lúmen do intestino em insetos são capazes de influenciar aspectos fisiológicos, como na quebra de celulose em alguns artrópodes e no fornecimento de vitaminas e na digestão de sangue em insetos hematófagos. (Dillon e Dillon, 2014)

3.2.2 Microbiota em culicídeos

Em culicídeos, a microbiota parece ser um fator extremamente importante no desenvolvimento e sobrevivência, uma vez que estudos demonstram que organismos criados em ambientes totalmente estéreis possuem seu desenvolvimento mais longo, enquanto que alguns não são capazes de realizar ecdise (Coon et al., 2014).

Uma característica importante da microbiota em mosquitos é a capacidade de certas espécies bacterianas de impedir a instalação de agentes patogênicos, como o caso das arboviroses. Em *Ae. aegypti*, foi comprovado que, ao eliminar parte da microbiota, esses insetos tornam-se mais sensíveis ao vírus DENV (Xi et al., 2008).

O papel das bactérias nesse tipo de proteção pode ser ativado por meio do sistema imune inato ou, até mesmo, de forma competitiva com o patógeno. Em *Ae. aegypti*, a microbiota é capaz de induzir genes que expressam peptídeos com ação antimicrobianas, sendo esses utilizados na resposta aos títulos virais (como o DENV). Portanto, ao ativar o sistema imune inato, a microbiota interfere na capacidade vetorial (Engel e Moran, 2015; Lemaitre e Hoffmann, 2007).

Alguns exemplos de bactérias que podem interferir na instalação de arboviroses são as dos gêneros *Proteus* e *Chromobacterium*, que, ao serem introduzidas isoladamente, reduziram os níveis de infecção de DENV e CHIKV. Bactérias do gênero *Serratia sp.* demonstraram possuir proteínas que interagem diretamente no intestino, bloqueando-as e permitindo uma maior infecção de

DENV e CHIKV nas células epiteliais (Ramirez et al., 2012; Apte-Deshpande, et al., 2012).

Os principais determinantes que explicam a diversidade da microbiota em culicídeos são o potencial redox, enzimas digestivas e pH, além dos comportamentos alimentares, habitat, tipos de criadouro, antropofilia, entre outros. Esses aspectos definem as características nutricionais que são disponibilizadas às bactérias e, conseqüentemente, exercem função na abundância e na riqueza das espécies bacterianas no intestino (Dilon e Dilon, 2004).

A maioria das bactérias encontradas em mosquitos, geralmente, está no intestino, e, portanto, a transmissão delas para outros estágios de desenvolvimento está diretamente ligado a este órgão, uma vez que a cada ecdise, os intestinos anterior e posterior são eliminados por apresentar origem ectodérmica e cutícula. Na fase de pupa, o intestino, então, é eliminado; em contrapartida, os túbulos de Malpighi ficam inertes e passam das larvas para os adultos e, conseqüentemente, levam consigo as bactérias que ali estariam instaladas. Já a membrana peritrófica, é responsável pelo acúmulo de alimento e, por isso, apresenta enzimas digestivas, além de exercer função de proteção do epitélio intestinal contra possíveis patógenos ou toxinas. Tendo isso, as bactérias estão no espaço endoperitrófico, o que evita o seu contato direto com o intestino (Consoli e Lourenço-de-Oliveira, 2004; Gusmão et al, 2010).

Os estágios de vida do mosquito parecem ser outros determinantes da microbiota, já que as larvas são aquáticas com alimentação restrita a matéria orgânica e os adultos são terrestres com alimentação a partir de seiva/néctar de plantas e sangue. Assim, espera-se que a diversidade bacteriana seja moldada justamente por esses fatores. Os sexos dos mosquitos também são descritos como determinantes da microbiota, mais pelo hábito hematofágico das fêmeas em adultos (Wang et al., 2011; Minard et al., 2012).

A microbiota dos mosquitos pode servir como biomarcadores auxiliando na resposta fisiológica dos insetos frente a uma invasão por algum arbovirus, como é o caso do Zika Virus (ZIKV), que em mosquitos de laboratório modula a comunidade bacteriana, como por exemplo o aparecimento de famílias bacterianas (*Desulfuromonadaceae* e *Rhodothermaceae*) que não estão na microbiota normal dos mosquitos, sendo a sua função fisiológica ainda desconhecida (Villegas et al. 2018).

Minard e colaboradores (2013), em um estudo usando metagenômica, demonstraram a microbiota bacteriana presente em culicídeos do gênero *Mansonia*, *Culex*, *Anopheles* e *Aedes*. A árvore filogenética, na qual é possível observar gêneros bacterianos em comum e exclusivos, está exposta na figura 4.

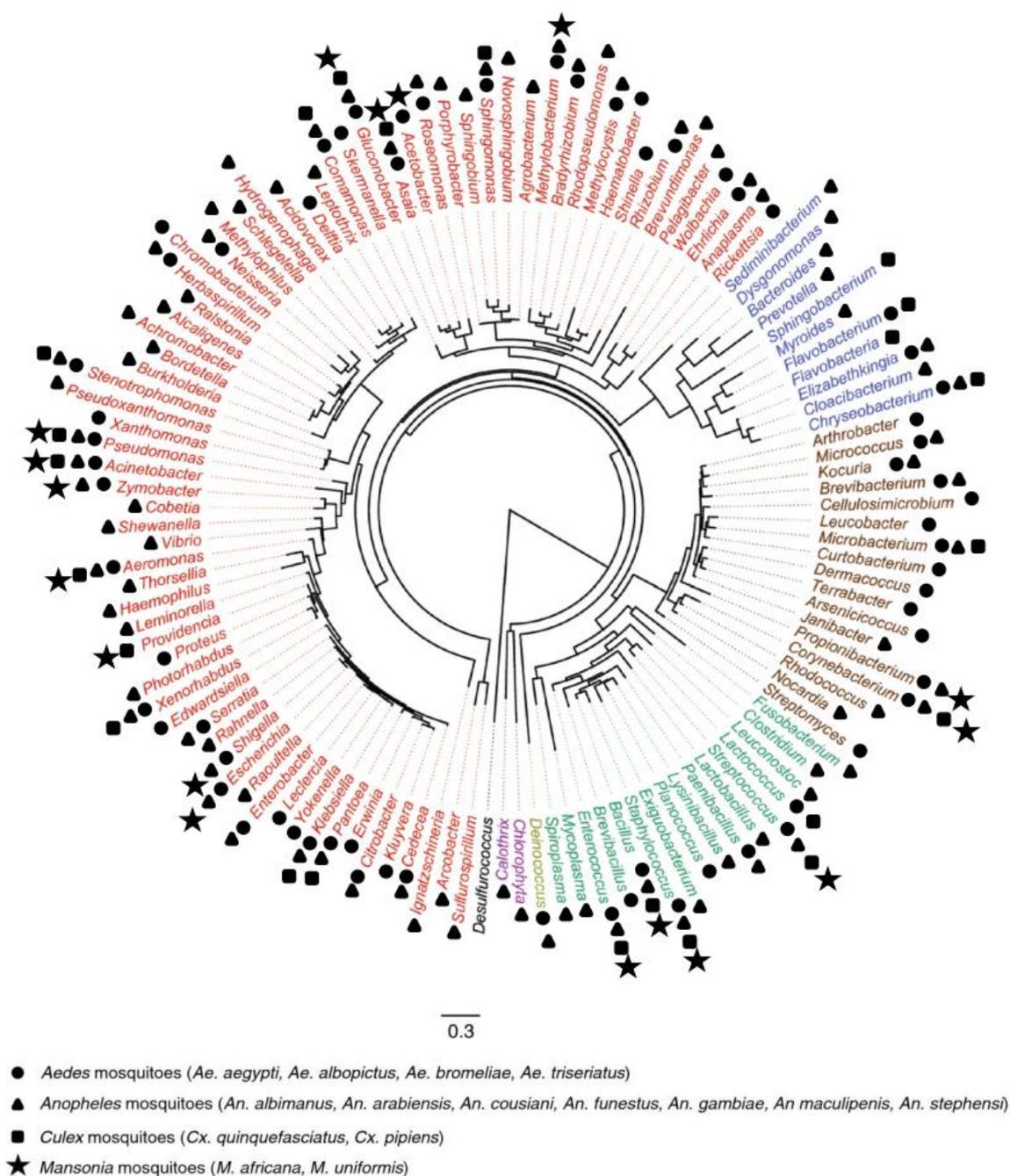


Figura 4 – Gêneros bacterianos encontrados em culicídeos, baseado no gene 16S rRNA. Fonte: Minard et al., 2013

3.3 Controle de Insetos

No caso de *Ae. aegypti*, seu controle é a única forma de prevenção da dengue, pois não existe uma vacina totalmente eficaz para essa doença (Esu et al., 2010). Nesse contexto, a Organização Mundial da Saúde prevê um manejo integrado desse vetor utilizando medidas de controle com substâncias de origem química e/ou biológica, além de medidas econômicas para o aumento de saneamento básico e popularização de políticas públicas voltadas para a educação ambiental (OMS, 2006).

Os inseticidas químicos têm uma função chave na prevenção e controle de inúmeras doenças transmitidas por vetores, como é o caso da malária e dengue, por exemplo, e são os mais utilizados para este fim (Rose, 2001). Para os estádios larvais de *Ae. aegypti*, os formulados químicos mais utilizados são o temefós (organofosforado) e cipermetrina (piretróide). Porém a utilização dessas substâncias acarreta em grande dano ambiental, efeitos nocivos em organismos não-alvo, entre outros. (Silva et al., 2008).

O uso contínuo dessas moléculas químicas contribuiu para a resistência desses organismos no Brasil, como tem sido relatado por diversos autores (Braga et al., 2004; Prophiro et al., 2011; da Cunha et al., 2005). O monitoramento da resistência de mosquitos frente a inseticidas é extremamente importante, uma vez que uma alta resistência pode elevar a transmissão e o re-aparecimento de arboviroses. Um dos métodos para controlar as taxas de resistência é a aplicação de inseticidas apenas em regiões onde há alta incidência de casos de dengue, entre outras arboviroses (Luz et al., 2009).

Uma das alternativas para a resistência é a utilização de formulados de origem biológica ou botânica. Quanto ao controle biológico, ele pode ser definido como uma estratégia de redução populacional de um vetor ou praga, utilizando predadores, parasitos ou micro-organismos que expressam toxinas (Woodring e Davidson, 1996). O controle com moléculas de origem botânica é feito com produtos – geralmente extrações de óleos essenciais – com propriedades repelente, antialimentar e inseticida (Maciel et al., 2010).

No controle biológico, a espécie mais utilizada é *Bacillus thuringiensis* (Bt), que, em sua fase de esporulação, produz inclusões proteicas cristalinas paraesporais. Essas se solubilizam no intestino do inseto (que apresenta um pH

alcalino), transformando-se em polipeptídeos tóxicos que, ao se ligarem com as microvilosidades, criam poros levando à lise celular e, como consequência, à morte do inseto (Sarker e Mahbub, 2012). Para o controle de *Ae. aegypti*, a cepa de *Bt* mais eficaz é a *israelensis*. Contudo, desde 2005, é relatado que alguns insetos já apresentam resistência a algumas proteínas de *Bt* (Tabahnick et al., 2013).

Atualmente, novas espécies bacterianas estão sendo estudadas dentro dessa finalidade por se mostrarem igualmente eficazes ao *Bt*, como, por exemplo, as bactérias simbióticas do gênero *Photorhabdus* e *Xenorhabdus*. Elas também apresentam características entomopatogênicas, e possuem uma infecção ativa, diferente das espécies de *Bt*. (da Silva et al., 2013).

3.4 Sais Imidazólicos

Os líquidos iônicos são compostos que apresentam em sua estrutura apenas íons e baixo ponto de fusão – menor que 100°C. Sobre outras características químicas, pode-se mencionar que eles possuem uma energia livre de Gibbs de solvatação negativa, em função de possuírem grandes compostos orgânicos e ânions flexíveis. Ainda, consideram-se uma baixa energia reticular e alta entropia, o que faz dessas substâncias termoestáveis. Além disso, possuem uma ampla janela eletroquímica, alta condutividade e ajustável solubilidade. (Wasserscheid e Keim, 2000; Krossing et al., 2006).

Dentro dos líquidos iônicos estão os sais imidazólicos. Esses são derivados de anéis de imidazol via a alquilação de átomos de nitrogênio e apresentam na sua forma um discreto cátion e ânion. Apesar de, na sua maioria, serem sintetizados artificialmente, podem ser encontrados naturalmente, como nas raízes de *Lepidium meyenii* (autor). Anéis imidazólicos são extremamente flexíveis, podendo se ligar a metais e formar ligações hidrogenadas com drogas e proteínas. Em contrapartida, sais de imidazol não possuem as atividades mencionadas anteriormente, porém interagem com sistemas biológicos de modo eletroestático (Cui et al., 2003; Anderson e Long, 2010; Geng et al., 2010).

Uma das propriedades que fazem dos sais imidazólicos gerarem grande interesse na pesquisa e na indústria é consequência dos cátions e dos ânions, que podem ser modificados de forma independente e, assim, mudar suas

propriedades biológicas, físicas e químicas. Em suma, um sal imidazólico é estruturado como uma molécula anfifílica, com uma região hidrofóbica e outra hidrofílica, conforme exposto na figura 5 (Riduan e Zhang, 2013).



Figura 5 – Estrutura geral de um sal imidazólico. Região em vermelho: hidrofóbica; Região em azul: hidrofílica. Fonte: Riduan e Zhang, 2013

Os sais imidazólicos parecem ter poucos impactos negativos sobre o ambiente e efeitos toxicológicos mínimos sobre micro-organismos de importância ambiental. A sua toxicidade a organismos não-alvo geralmente está associada à sua estrutura catiônica hidrofílica que é capaz de realizar interações com componentes biológicos como membranas celulares e DNA (Ranke et al., 2007). Experimentos ecotoxicológicos foram conduzidos com *Raphanus sativus* (Brassicaceae) (Nome popular: rabanete), nos quais os sais imidazólicos testados demonstraram algum efeito sobre o desenvolvimento da planta, somente em dosagens muito altas, além de relacionar os efeitos tóxicos em função de SI com maiores cadeias carbônicas (Biczak et al., 2014). Em adição, estudos realizados com cultura de células de mamíferos demonstrou que SI não possuem atividade citotóxica (Ranke et al., 2006).

Uma das maiores utilizações dos sais de imidazol é como anti-bacteriano. Seu modo de ação dá-se pelo fato de que as bactérias possuem em média 70% da sua membrana formada por grupos de fosfatidiletanolamina e esses são carregados negativamente, enquanto os sais de imidazol possuem uma natureza catiônica e são atraídos eletrostaticamente pela membrana celular. Assim, seus componentes hidrofóbicos promovem um distúrbio na membrana, acarretando no vazamento de substâncias intracelular e, por fim, morte celular (Riduan e Zhang, 2013).

A atividade antimicrobiana de sais de imidazol parece estar relacionada ao tamanho da cadeia do grupo N-alkyl. Cadeias com menos de seis carbonos parecem não ser tóxicas frente a espécies bacterianas, enquanto cadeias de 10 a

14 carbonos podem ser consideradas tóxicas. As propriedades químicas que estão relacionadas a SI de maior cadeia também estão atreladas a sua toxicidade, como por apresentar característica hidrofóbica, ótima adsorção, concentração micelar crítica, entre outros (Garcia et al., 2013).

Como larvicida, dois SI mostraram-se extremamente eficazes no controle de larvas de *Ae. aegypti*, apresentando altas taxas de mortalidade, em testes de efeito residual mesmo em baixas concentrações (CL₉₉ de ambos sais testados, são 20 µg/L). Pela análise morfológica das larvas tratadas, essas se apresentaram curvas e com o interior do intestino médio danificado, porém o modo de ação ainda não está definido (Goellner et al., 2018).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Manutenção dos mosquitos

Para todos os experimentos conduzidos neste trabalho, foram utilizadas larvas de *Ae. aegypti* cepa Rockefeller, provenientes do Laboratório de Parasitologia da UFRGS, sob a temperatura de ± 28 °C, fotoperíodo de 12 horas claro e 12 horas escuro e umidade relativa de 80%. Para a continuidade da população dos mosquitos, as larvas foram mantidas em bandejas com água filtrada e alimentadas com um alimento à base de ração de gato (marca). As pupas foram retiradas diariamente e realocadas em outro recipiente até a forma adulta.

Os adultos foram mantidos em gaiolas de 30x30x30cm. A fonte de carboidrato foi de uma solução aquosa com mel de abelhas e o repasto sanguíneo para as fêmeas foi realizado através de um alimentador artificial com sangue de rato, recolhido em tubos com solução de heparina.

Para a oviposição, a cada dois dias após o repasto sanguíneo, foi disposto dentro das gaiolas um recipiente circular com substrato de cor escura com a parte interna revestida com papel filtro, após 24h, estes filtros foram retirados, secados em temperatura ambiente e devidamente armazenados.

4.2 Sais de Imidazol

Os sais imidazólicos (SI) escolhidos para este trabalho foram baseados no estudo conduzido por Goellner et al. (2018), em que se demonstrou a eficácia dos mesmos para o controle de larvas. As moléculas utilizadas foram 1-n-octadecyl-3-methylimidazolium chloride ($C_{18}MImCl$), compradas na CJC CHINA JIE CHEMICAL e 1-n-hexadecyl-3-methylimidazolium methanesulfonate ($C_{16}MImMeS$), sintetizado pelo Laboratório de Processos Tecnológicos e Catálises da UFRGS. As doses utilizadas para o estudo da microbiota foram as CL_{99} (20 $\mu g/L$), CL_{50} (10 $\mu g/L$) e CL_{20} (4 $\mu g/L$) de ambas as moléculas.

4.3 Ensaio de exposição das larvas com os sais imidazólicos

Para a avaliação da microbiota cultivável, bem como para o índice de diversidade realizado através da RISA, foram utilizados três grupos para cada uma das moléculas estudadas: larvas controle (não expostas), larvas expostas a CL₂₀, larvas expostas a CL₅₀ e larvas expostas a CL₉₉.

Para os experimentos de diversidade, foram usadas as CL₉₉ e CL₅₀. Para tanto, ovos de *Ae. aegypti* foram postos para a eclosão em 1 litro de água destilada estéril. Após a eclosão e possível visualização das larvas, estas foram mantidas em B.O.D, a 28°C com umidade relativa de 80%. As mesmas foram alimentadas com ração de gato previamente esterilizada. Quando atingiram o estágio de L2 final e L3 inicial, uma parte das larvas foi retirada e encaminhada para o processamento como controle, imediatamente em seguida, a outra parte foi submetida aos tratamentos. Neste caso, foram utilizadas 25 larvas para o tratamento com as diferentes concentrações com o SI C₁₆MImMeS e C₁₈MImCl. Então, as 25 larvas foram dispostas em recipiente de vidro estéril, com 100 mL de água destilada autoclavada com a dosagem de concentração.

Para todos os ensaios foram utilizadas as larvas que se apresentavam letárgicas. Em nenhum momento foram utilizadas larvas mortas, pois estas poderiam apresentar uma diferente microbiota e os resultados não poderiam ser confiáveis.

4.4 Isolamento das bactérias cultiváveis

Para a realização do estudo das bactérias cultiváveis, foi utilizado um protocolo modificado de Tadina e colaboradores (2016). Esse método utiliza uma abordagem culturômica, a qual nunca havia sido utilizado em *Aedes aegypti*. Portanto, foi realizado um teste piloto com mosquitos adultos saudáveis, replicando o método utilizado no artigo original e, posteriormente, utilizado com as larvas expostas às diferentes concentrações do sal. Os experimentos descritos a seguir foram realizados em triplicata.

Para tanto, mosquitos adultos saudáveis (machos, fêmeas recém-emergidas e fêmeas alimentadas com sangue) 5 larvas do controle e 5 larvas expostas às concentrações CL₉₉, CL₅₀ e CL₂₀ de cada sal de imidazol passaram por lavagens em etanol 70% (3 minutos) seguidas por três lavagens em água ultra-pura estéril, afim de obter uma desinfecção superficial. Os indivíduos foram macerados em 2mL de água destilada estéril e submetidos a um meio de pré-incubação composto por caldo infusão cérebro-coração (10g/L), extrato de levedura (5g/L) e peptona bacteriológica (5g/L) e 1000mL de água destilada, incubados em estufa a 28 °C no período de 30 dias. A cada cinco dias, a partir do primeiro, foram retiradas alíquotas de 1mL deste meio de pré-incubação.

Todas as alíquotas realizadas, sofreram uma diluição seriada até 1×10^{-10} , e cada diluição foi semeada em placas de Petri contendo ágar tripticaseína de soja (TSA). A partir do crescimento das colônias bacterianas, cada uma que apresentava um morfotipo diferente foi isolada em uma nova placa de Petri e, assim, submetida à identificação.

4.5 Identificação das bactérias cultiváveis

Cada colônia foi submetida ao MALDI-TOF, em duplicata diretamente na placa-alvo (MSP 96 target polished steel, Bruker Daltonics) e coberta com a solução matriz Bruker Matrix HCCA (Bruker Daltonics), diluída em acetonitrila 50% (v/v), ácido trifluoroacético 2,5% (v/v) e água ultrapura Milli-Q, seguido por um período de secagem em temperatura ambiente. A calibragem do aparelho foi realizada pelo reagente Bruker Bacterial Test Standard (Bruker Daltonics). O espectro foi gravado no modo linear, com o alcance de intervalo de massas de 2.000 a 20.000 daltons. Os picos de cada espectro foram comparados com o banco de dados e o score considerado ideal para este estudo será de maior ou igual a 1,9. Quando não houve a identificação da espécie bacteriana, as colônias foram testadas por pelo menos mais três repetições.

4.6 Avaliação da diversidade bacteriana através Análise do Espaço Intergênico Ribossomal - RISA

4.6.1 Extração e amplificação de DNA

Para a avaliação da diversidade microbiana das larvas expostas aos sais imidazólicos, foi utilizada a técnica de RISA (Análise do Espaço Intergênico Ribossomal). Para tanto, 5 larvas do controle e 5 larvas expostas – em triplicata – às concentrações CL₅₀ e CL₉₉ de cada sal imidazólico passaram por lavagens em etanol 70% (3 minutos), seguidas por três lavagens em água ultra-pura estéril, a fim de obter uma desinfecção superficial. Os indivíduos foram macerados em 2mL de água destilada estéril e submetidos ao kit PowerSoil® para a extração do DNA total, conforme orientações do fabricante, sendo este, quantificado através de NanoDrop®. Foi realizado um PCR a partir dos produtos de extração, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores 23S e 1406. Estes iniciadores amplificam uma região do *operon* do gene rRNA entre as pequenas (16S) e grandes (23S) subunidades denominadas região espaçadora intergênica. As descrições nucleotídicas dos iniciadores estão dispostos na tabela 1.

Cada mostra foi preparada com 5µL do tampão 5X, 0,2 mM de dNTP, 10µM dos primers, 1U de Taq DNA polimerase, 50ng do DNA extraído e água milli-Q estéril para completar o volume de 50µL. A reação se deu por uma desnaturação inicial de 94°C por 2 minutos, 35 ciclos de desnaturação de 94°C por 30 segundos, anelamento de 51°C por 30 segundos e extensão de 72°C por 1 minuto, seguido por uma extensão final de 72°C por 5 minutos.

Tabela 1. Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a análise por RISA

Oligonucleotídeos iniciadores	Sequências	Referência
23 S (Reverse)	5'GGGTTBCCCATTCRG 3'	Solaiman &
1406 (Forward)	5' TGYACACACCGCCCGT 3'	Marschner, 2007

4.6.2 Aplicação e análise do gel de RISA

Para a realização da técnica, foi utilizado o protocolo descrito por Solaiman & Marschner (2007). Os produtos do PCR foram aplicados em gel de agarose 3%, em TBE 0,5X, corridos 75V, 120mA por três horas. Para cada poço foi utilizado 30µL de cada reação de PCR e corado com GelRed com bromofenol.

Para a análise das bandas, as mudanças na estrutura das comunidades bacterianas foram realizadas através do cálculo da distância genética entre as amostras. Para isso, foi utilizado o *software* PyElph, em que as bandas foram normalizadas, criando, conseqüentemente, um padrão de ausência-presença de bandas e gerando uma matriz binária. Essa matriz foi utilizada para o cálculo do coeficiente de Dice. Os resultados obtidos foram analisados e agrupados pelo método do grupo de pares não-ponderado através do algoritmo de média aritmética (UPGMA). Através das árvores filogenéticas geradas foi possível verificar a similaridade entre fingerprints gerados pelo RISA (Ciesielski et al., 2013).

A diversidade das comunidades bacterianas foi calculada através do índice de diversidade geral de Shannon (H'). Para o cálculo, foi levada em consideração a intensidade das bandas do fingerprint gerado pela análise RISA, sendo ela estimada pela curva densitométricas, utilizando o programa ImageJ. A equação utilizada foi: $H' = -\sum (n_i/N) \log (n_i/N)$, em que n_i é a quantidade gerada pelo pico de cada banda e N a soma de todos os picos gerados pela curva densitométrica (Ciesielski et al., 2013).

4.7 Ensaios de toxicidade com larvas axênicas

4.7.1 Produção de larvas axênicas

Para verificar o comportamento dos sais imidazólicos sobre larvas axênicas, seguiu-se um protocolo modificado de Correa et al. (2018). Desse modo, uma tira em papel filtro com ovos de *Ae. aegypti* de laboratório foi

previamente desinfetado e imerso por 5 minutos em álcool 70%, seguido por 5 minutos em hipoclorito de sódio 2,5% e mais uma vez em álcool 70% por 5 minutos. Os ovos foram lavados 3 vezes em água destilada autoclavada. Para eclosão, os ovos foram filtrados e imergidos em 250mL de solução PBS e expostos a vácuo a 25Hz por 15 minutos em temperatura ambiente. Após a eclosão, as larvas foram expostas a dois diferentes antibióticos, sendo esses suplementados à solução de eclosão dos ovos, 75µg/L de ampicilina e 125µg/L de penicilina, seguindo um período de incubação de 4 horas a uma temperatura de 28° C.

Assim, as larvas foram resubmetidas a um novo meio contendo 500mL de água destilada e 4 gramas de ágar *E. coli* e armazenadas a uma temperatura de 28°C, até chegar no estágio de 3º instar. Para o controle de axenia, 15 larvas foram retiradas no início do tratamento (primeiro instar) e no final do tratamento (terceiro instar) e separadas em uma triplicata de 5 indivíduos que foram macerados e submetidos em 14mL de caldo LB, por 48 horas a uma temperatura de 28° C. Para fins de comparação, o mesmo foi feito com as larvas usuais de laboratório e a axenia foi comprovada pelo crescimento bacteriano no caldo por meio da turbidez do meio.

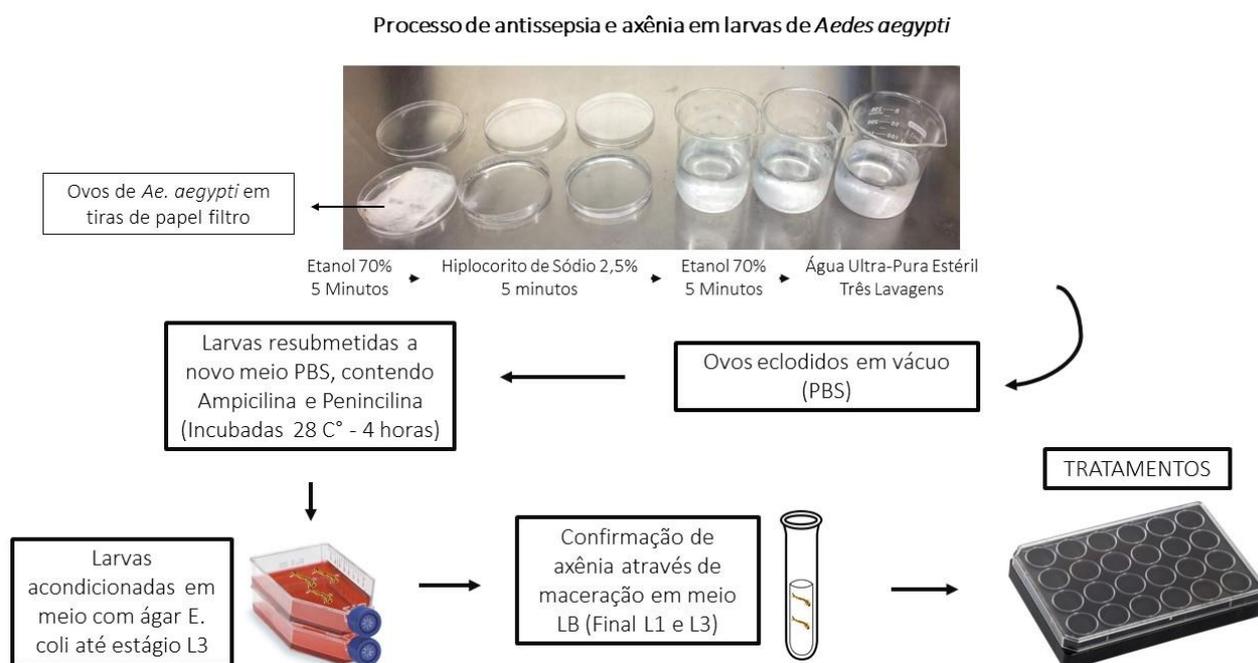


Figura 6 – Desenho esquemático para a produção de larvas de *Ae. aegypti* axênicas

4.7.2 Ensaios de Toxicidade

Com as larvas em estágio de terceiro instar e a axenia comprovada, as mesmas foram expostas à concentração CL_{99} dos dois sais imidazólicos testados, além de também serem expostas também a Temephos para se verificar se este larvicida também tem a sua eficiência na mortalidade pela falta de microorganismos nas larvas. Para tanto, estes bioensaios foram conduzidos em placas de 24 poços, em triplicata e repetidos quatro vezes. Para cada poço foi utilizado 10 larvas e 2mL dos tratamentos ($CL_{99} = 20 \mu\text{g/L}$ de SI $C_{18}\text{MImCl}$ e $C_{16}\text{MImMeS}$ e Temephos ($6\mu\text{g/mL}$), sendo também utilizadas larvas “saudáveis” do laboratório como controle. A mortalidade das larvas foi acompanhada por 24 e 48 horas.

4.7.3 Ensaios de Recolonização e Reexposição

Para avaliar o comportamento das larvas axênicas que foram expostas aos tratamentos com os sais imidazólicos e não apresentaram mortalidade, essas foram expostas ao meio usual de laboratório. Posteriormente, expostas novamente aos sais de imidazol para checar se a reintrodução de bactérias adquiridas do meio influencia na mortalidade. Em seguida, foram realizados os mesmos procedimentos descritos no item 4.7.1 para produção de larvas axênicas. Porém, neste caso, foram utilizadas larvas de segundo instar para os ensaios. 60 larvas foram expostas a 500mL de contendo a CL₉₉ de ambos os sais imidazólicos por 48 horas a 28°C. Depois, todas larvas vivas que não se apresentavam letárgicas foram submetidas a um meio em que estavam larvas da criação de mosquito por 48 horas a 28°C. A fim de padronizar o número de larvas re-expostas, retiraram-se 25 larvas de cada primeira exposição. Após essa etapa, todas as larvas foram novamente expostas aos sais imidazólicos e a contagem da mortalidade foi realizada em 12h, 24h e 48 horas. O controle da axenia e de recolonização foi realizado expondo-se 5 larvas em triplicata a 14 mL de caldo LB a 28°C por 48 horas. Esse teste era feito logo que as larvas chegaram no segundo instar, antes de serem expostas pela primeira vez aos SI e após as 48 horas no meio normal de criação de larvas de laboratório. Esses procedimentos podem ser melhor entendidos na figura 7.

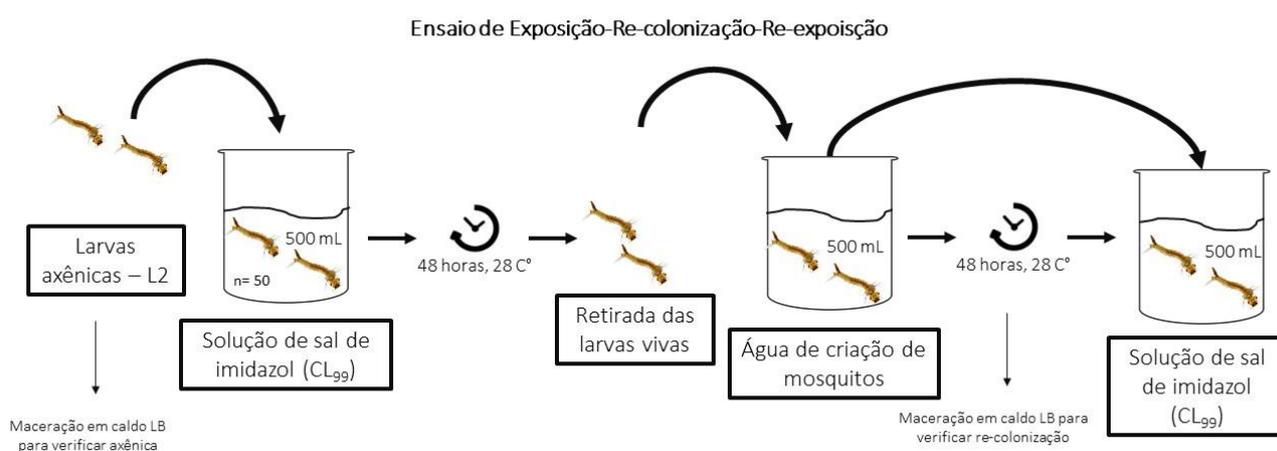


Figura 7 – Desenho experimental para o teste de reexposição e recolonização de larvas de *Aedes aegypti*

4.7.4 Análise estatística

Os resultados foram analisados por meio do programa Graphpad. Efeitos significativos dos compostos na mortalidade de larvas axênicas foram determinados pela análise de variância two-way (ANOVA). A diferença entre os grupos foi determinada através do teste Tukey's, sendo o nível de significância $<0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Bactérias cultiváveis em adultos de *Ae. aegypti*

Com a finalidade de estabelecer o protocolo de abordagem culturômica para a identificação da microbiota cultivável, foi realizado um teste piloto com mosquitos adultos (machos, fêmeas ingurgitadas e fêmeas não-ingurgitadas) com base no protocolo proposto por Tandina et. al (2016). Sendo assim, foi possível isolar 16 diferentes morfotipos. Dentre eles o MALDI-TOF identificou 11 até o nível de espécie. Os principais filos bacterianos encontrados nos três grupos avaliados foram: Proteobacteria (77,5%), Bacteroidetes (15,7%) e Firmicutes (7%). Todas as espécies bacterianas identificadas estão listadas na tabela 2.

Algumas espécies foram encontradas exclusivamente em cada um dos tratamentos, como por exemplo, *Citrobacter freundii* foi identificada apenas em machos, *Bacillus cereus* apenas em fêmeas ingurgitadas. *Enterobacter cloacae* e *Pseudomonas chlororaphis* foram encontradas nos três grupos avaliados. *Serratia marcescens*, *Serratia ureilytica* e *Acinetobacter baylyi* foram encontradas apenas em fêmeas ingurgitadas. Esta dinâmica está exposta na figura 8.

Tabela 2. Lista de espécies bacterianas identificadas através da abordagem culturômica nos diferentes grupos avaliados.

	Machos (n = 5)	Fêmeas (Ingurgitadas) (n = 5)	Fêmeas (não- ingurgitadas) (n = 5)
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	X	X	X
<i>Pseudomonas corrugata</i>	X	X	-
<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	X	-	X
<i>Pseudomonas koreensis</i>	X	X	X
<i>Elizabethkingia meningoseptica</i>	X	-	X
<i>Bacillus cereus</i>	-	-	X
<i>Citrobacter freundii</i>	X	-	-
<i>Serratia marcescens</i>	-	X	-
<i>Serratia ureilytica</i>	-	X	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	X	X	X
<i>Acinetobacter baylyi</i>	-	X	-

(x) representa a presença e (-) ausência da espécie nos grupos avaliados.

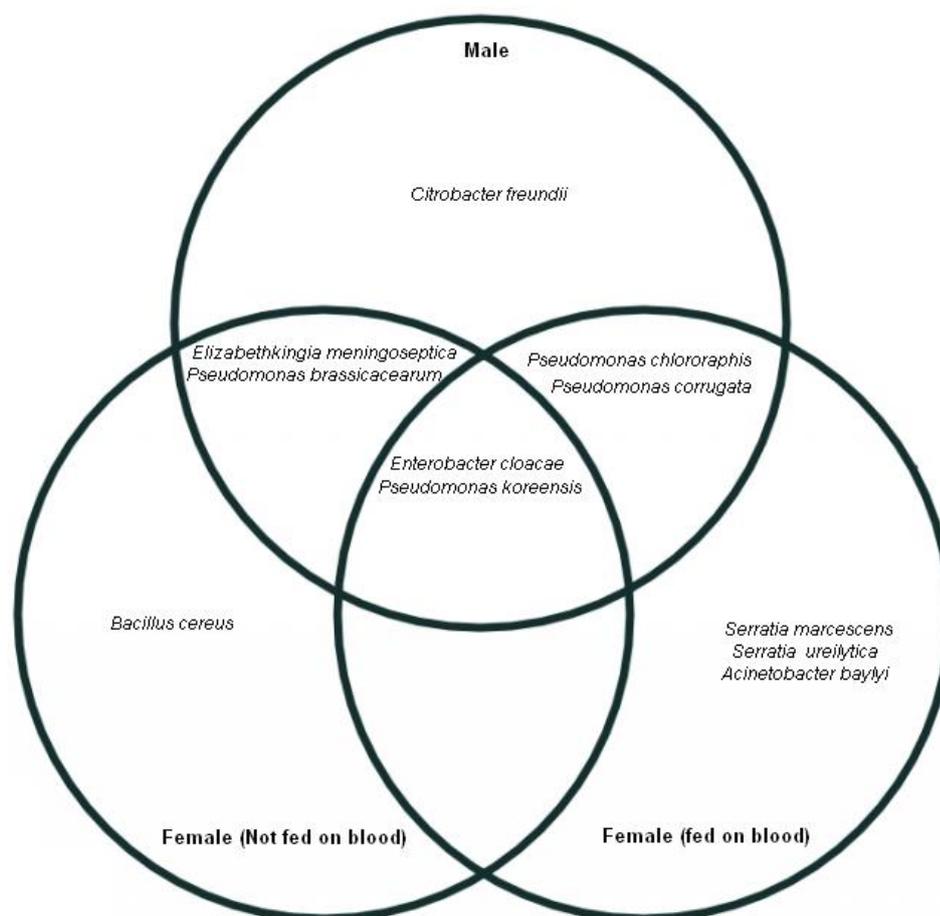


Figura 8 - Diagrama de Venn com as espécies bacterianas encontradas nos diferentes grupos

5.2 Bactérias cultiváveis em larvas de *Aedes aegypti* tratadas com os sais imidazólicos

Para a identificação da microbiota cultivável das larvas de *Ae. aegypti*, foi utilizado o protocolo para os mosquitos adultos. As larvas foram expostas aos dois diferentes SI, em três concentrações diferentes (CL₉₉, CL₅₀ e CL₂₀). Para cada tratamento foi possível observar mudanças na microbiota. Observou-se o desaparecimento de espécies, ou, até mesmo, pelo aparecimento de outras, quando comparado com o grupo controle. Todas as espécies bacterianas identificadas estão listadas na tabela 3.

Foi possível isolar 11 diferentes morfotipos diferentes bacterianos. O MALDI-TOF identificou todos os isolados, sendo 7 a nível de espécie e 4 a nível de gênero. Com o sal C₁₈, foi possível observar uma diminuição no número de

espécies bacterianas conforme o aumento da concentração do sal. Quando as larvas foram tratadas com o SI C₁₆MImMeS o número de espécies bacterianas foi igual em todos os tratamentos, mas ligeiramente menor do que o controle.

Tabela 3. Lista de espécies bacterianas identificadas pela abordagem culturômica nas larvas tratadas com os sais imidazólicos.

Controle	C18MImCl			C16MImMeS		
	CL ₉₉	CL ₅₀	CL ₂₀	CL ₉₉	CL ₅₀	CL ₂₀
<i>Serratia marcescens</i>	-	-	X	X	-	X
<i>Enterobacter asburiae</i>	-	-	X	X	X	X
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	-	-	X	X	X	X
<i>Klebsiella oxytoca</i>	X	X	X	X	X	X
<i>Delftia acidovorans</i>	-	X	X	X	X	X
<i>Enterobacter kobei</i>	X	X	X	X	X	X
<i>Providencia rettgeri</i>	-	X	X	X	X	X
<i>Aeromonas sp.</i>	X	-	X	X	X	X
<i>Pseudomonas sp.</i>	X	X	X	-	X	X
<i>Burkholderia sp.</i>	-	-	-	-	-	X
<i>Microbacterium sp.</i>	X	X	-	-	-	-

(x) representa ocorrência e (-) ausência da espécie no tratamento

5.3 Análise da diversidade bacteriana por RISA

A análise do espaço intergênico ribossomal dá-se por uma amplificação por PCR da região do gene operon rRNA entre a pequena (16S) e a grande (23S) subunidade, conhecida como região do espaço intergênico. Utilizam-se oligonucleotídeos iniciadores para essa região conservada, gerando fragmentos das espécies dominantes do ambiente. Nesse caso, da microbiota das larvas avaliadas. Em comparação com técnicas como o PCR-DGGE, a RISA possui algumas vantagens: a região amplificada é maior, não se faz necessário um grampo GC no oligonucleotídeo *forward*, as espécies se diferenciam pelo número de pares de bases gerados pela amplificação e o gel pode ser realizado utilizando tanto agarose, como acrilamida (Solaiman e Marschner, 2007).

Com esta análise, foi possível construir árvores filogenéticas baseando-se pela posição e número de bandas e análise de diversidade de Shannon (H') através da intensidade das bandas. Foram avaliadas larvas tratadas, de ambos SI, nas concentrações de CL₉₉ e CL₅₀, além do controle. A visualização dos fingerprints gerados estão apresentados nas figuras 9 e 10.

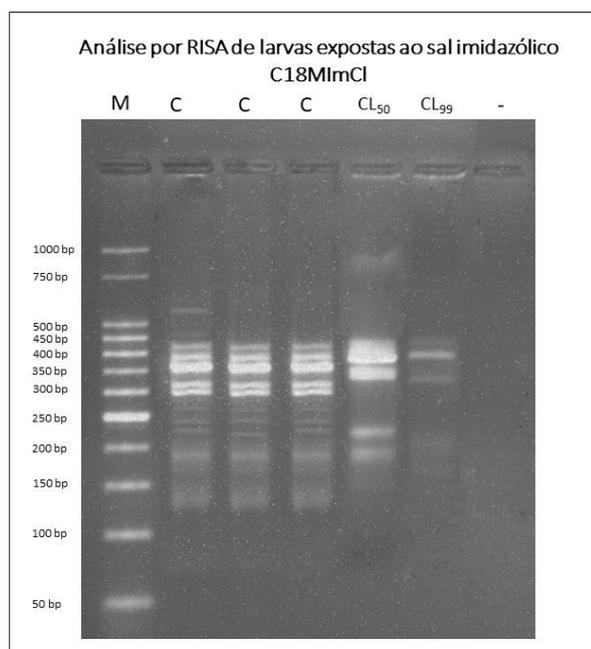


Figura 9 – Perfil de bandas (*fingerprint*) gerado a partir das larvas tratadas com diferentes concentrações de C18MImCl, CL₉₉ são as larvas expostas a concentração de 20 µg/L e CL₅₀ expostas a concentração de 10 µg/L. C são larvas sem nenhum tratamento.

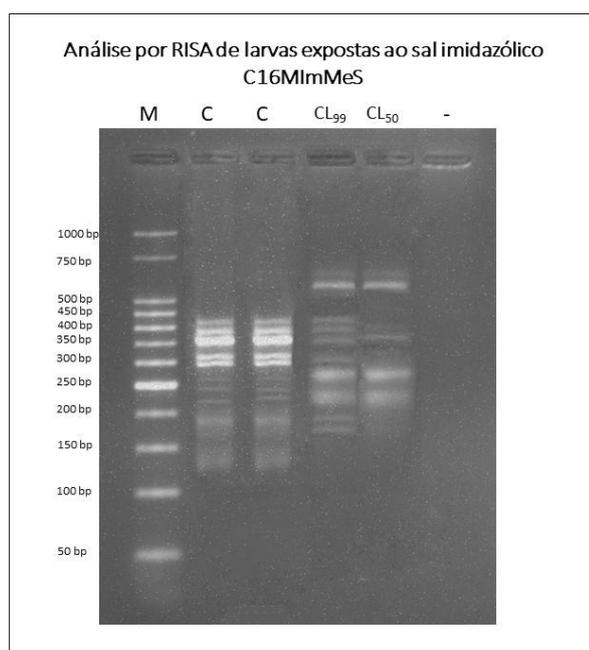


Figura 10 - Perfil de bandas (*fingerprint*) gerado a partir das larvas tratadas com diferentes concentrações de C16MImMeS, CL99 são as larvas expostas a concentração de 20 µg/L e CL50 expostas a concentração de 10 µg/L. C são larvas sem nenhum tratamento.

Para analisar a direção das comunidades bacterianas nas larvas expostas aos dois SI, a distância genética entre amostras foi calculada pelo coeficiente de Dice. Os resultados obtidos foram agrupados pelo algoritmo UPMGA e estão demonstrados nas figuras 11 e 12. As comunidades bacterianas mudam em comparação ao grupo controle. As larvas tratadas com o SI16 mostraram que a comunidades bacterianas, quando tratadas com a CL₅₀, são similares ao controle, pois apresentam o mesmo coeficiente de similaridade. A CL₉₉ afetou a comunidade bacteriana, uma vez que é possível observar um maior distanciamento e a criação de um novo ramo na árvore filogenética (Figura 11). O mesmo ocorre com as larvas tratadas com o SI C18. Porém, nesse caso, os coeficientes de similaridade são diferentes entre os grupos e a CL₉₉ não se distancia do ramo principal, mesmo criando um novo ramo (Figura 12).

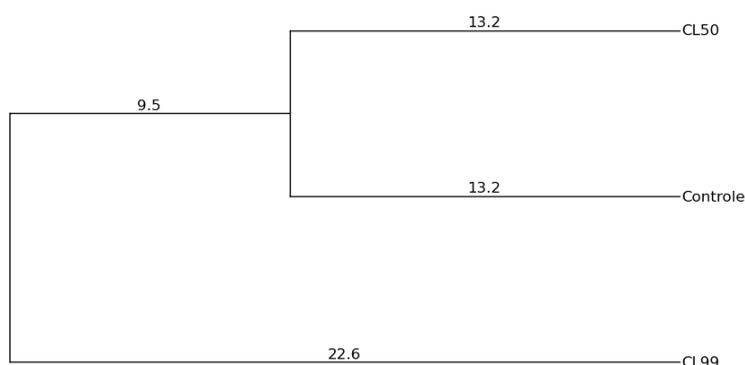


Figura 11 - Arvore filogenética a partir dos perfis de banda gerados através de RISA das comunidades bacterianas tratadas com o C16MImMeS nas diferentes concentrações. Arvore construída através do *software* PyElph através do coeficiente de Dice e agrupadas pelo algoritmo UPGMA, as distâncias estão apresentadas por dissimilaridade.

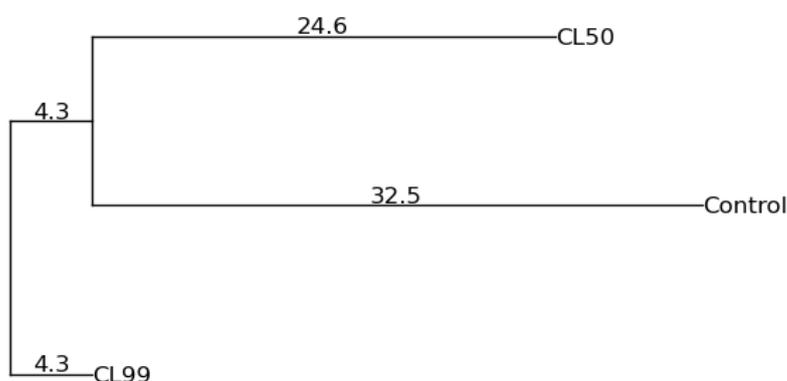


Figura 12 - Arvore filogenética a partir dos perfis de banda gerados através de RISA das comunidades bacterianas tratadas com o C18MImCl nas diferentes concentrações. Arvore construída através do *software* PyElph através do coeficiente de Dice e agrupadas pelo algoritmo UPGMA, as distâncias estão apresentadas por dissimilaridade

A diversidade de Shannon (H') foi calculada por meio da intensidade das bandas do perfil gerado pela RISA, através da fórmula proposta por Ciesielski e colaboradores (2013). Em ambos os tratamentos com o SI, a diversidade diminuiu

conforme aumenta a concentração do SI. O grupo controle teve uma diversidade calculada em 3,4594. Para as larvas tratadas com o grupo controle, foram: C18MImCl: CL₉₉ (1,585); CL₅₀ (2,585) e C16MImMeS: CL₉₉ (2,585); CL₅₀ (3,3219) (Figura 13). O SI C16MImMeS foi o que menos apresentou diferença na diversidade quando comparado com o C18MImCl.

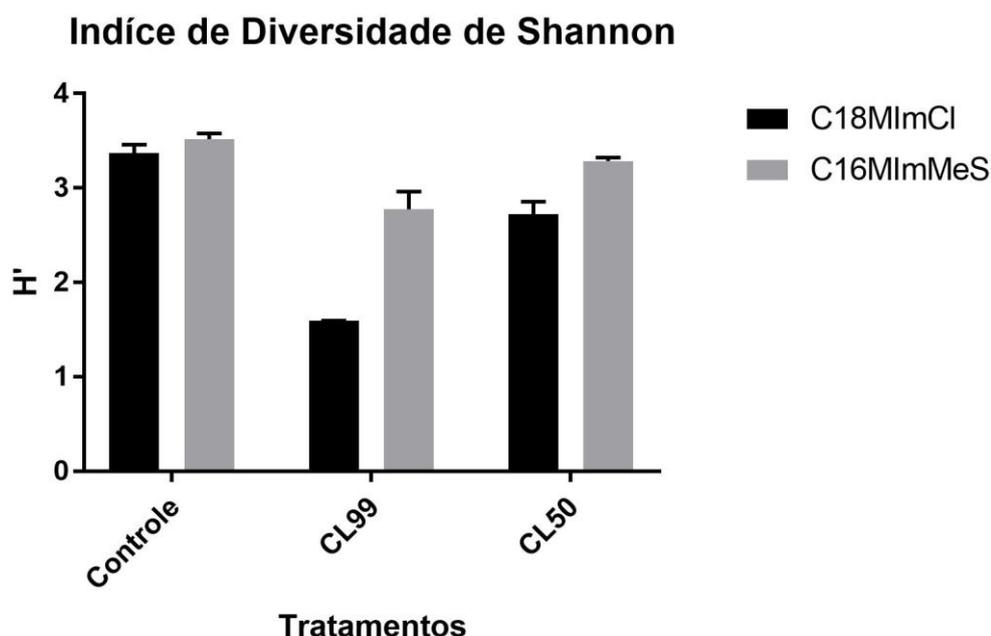


Figura 13 – Índice de diversidade de Shannon (H') estimado para a microbiota após os tratamentos com ambos SI testados em diferentes concentrações. As barras representam o desvio padrão.

5.4 Efeito dos sais imidazólicos sobre larvas axênicas de *Aedes aegypti*

Foi verificada a ação dos sais e Temephos sobre larvas axênicas, ou seja, livre de micro-organismos. A axenia foi comprovada com a maceração de larvas em triplicata em meios de cultura e, quando comparadas com um grupo controle (larvas não-axênicas), não mostrou nenhum crescimento bacteriano. O papel filtro no qual estavam os ovos dos mosquitos também foi imerso em triplicata em meios de cultura e não apresentou crescimento bacteriano visível.

Na figura 14, pode-se observar a mortalidade nos grupos de larvas não-axênicas/saudáveis e axênicas. Os sais de C₁₈MImCl e C₁₆MImMeS, quando

comparados com o Temephos e o grupo controle, mostraram ter diferenças significativas ($p < 0,05$). O Temephos mostrou um padrão igual em ambos grupos de larvas (axênicas e saudáveis) testados, apresentando $\geq 80\%$ de mortalidade.

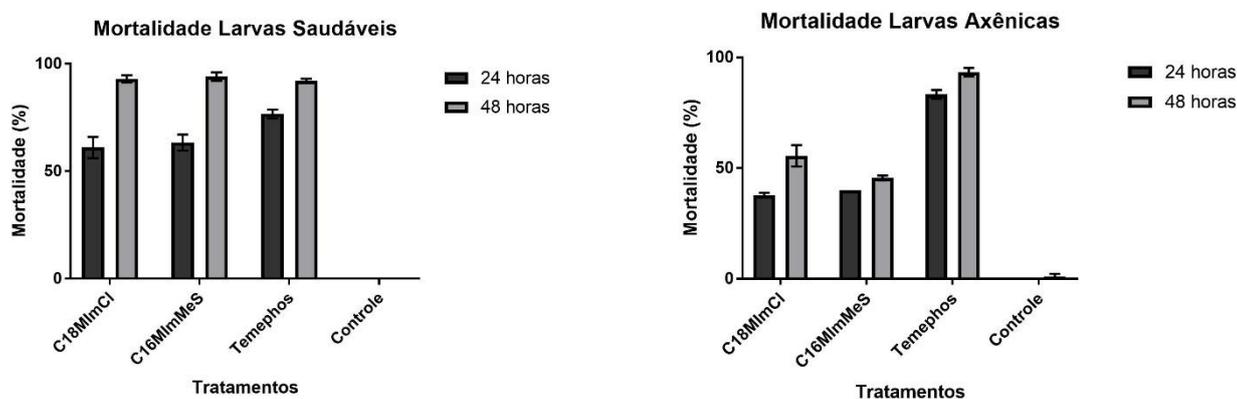


Figura 14 – Mortalidade de larvas (axênicas e saudáveis) expostas em ambos sais imidazólicos, Temephos e controle, em 24 horas e 48 horas após a exposição.

5.4.1 Efeito dos sais imidazólicos em larvas axênicas expostas, re-colonizadas e re-expostas.

Observou-se que metade das larvas sobrevive quando expostas a uma concentração letal ($20\mu\text{g/L}$) após 48 horas. Assim, verificou-se que essas, ao serem novamente expostas a um ambiente não-estéril e usual para a criação de larvas, e, então, serem novamente colonizadas por bactérias, tornar-se-iam novamente sensíveis aos SI. A confirmação de axenia foi realizada antes e depois da re-colonização. No primeiro caso, não foi possível visualizar crescimento bacteriano e, após a recolonização, foi possível observar turbidez no meio depois da maceração das larvas.

Nas 48 horas pós-exposição, foi possível observar mortalidades superiores a 95% em ambos tratamentos, conforme demonstrado na figura 15.

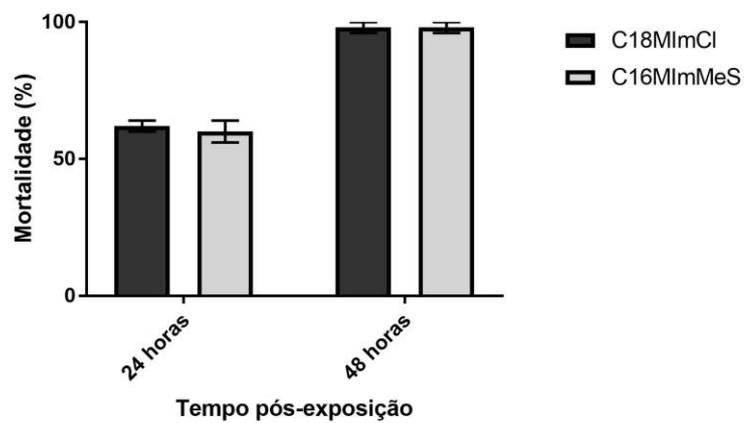
Mortalidade de Larvas Re-Colonizadas e Re-expostas

Figura 15 – Mortalidade de larvas após serem re-colonizadas e re-expostas aos sais imidazólicos

6 DISCUSSÃO

Buscar novos compostos com atividade larvicida é de suma importância, uma vez que diversas populações de *Ae. aegypti* estão se tornando cada vez mais resistentes aos produtos que hoje estão disponibilizados no mercado. Os sais imidazolicos utilizados nesse trabalho foram previamente testados em *Ae. aegypti* por Goellner et al., (2018) e se mostraram muito eficazes para o controle das larvas em concentração muito baixa, quando comparados com outros larvicidas. Contudo, entender possíveis variações de seu modo de ação poderá contribuir para melhorar o entendimento sobre a forma com que essas moléculas atuam nas larvas de mosquitos.

Sais de imidazol possuem atividade anti-inflamatória, anticâncer, antifúngica e antibacteriana (Riduan e Zhang, 2013). A ação antibacteriana foi a base norteadora para este estudo, uma vez que as moléculas de sal podem estar influenciando a microbiota normal das larvas e induzindo ou auxiliando em sua mortalidade. Portanto, identificar as possíveis bactérias cultiváveis e não cultiváveis é necessário para entender essa dinâmica.

O teste piloto realizado com os mosquitos adultos, mostrou que, através da abordagem culturômica, o MALDI-TOF conseguiu identificar 11 espécies bacterianas de um total de 16.

Os resultados foram similares aos encontrados por Tandina et al. (2016), que analisaram a microbiota do intestino de algumas espécies de *Anopheles*, e identificaram 10 espécies bacterianas. Porém, neste estudo, foi utilizado o corpo inteiro do mosquito, bem como as larvas, para evitar a perda de algumas espécies induzida pelo processo de dissecação.

Outro estudo também utilizando técnicas com cultura bacteriana mostrou a presença de 14 espécies, e, como nossos resultados Yadav et al. (2016) encontraram o filo Proteobacteria como o mais representativo. No entanto, os autores não conseguiram isolar bactérias do filo Firmicutes como demonstrado nesse trabalho.

Um estudo conduzido por David e colaboradores (2016) demonstrou que o gênero de maior representatividade em mosquitos adultos foi *Pseudomonas*. No presente estudo, foi possível encontrar 4 espécies desse gênero nos adultos (*P. chlororaphis*, *P. corrugate*, *P. brassicacearum*, and *P. koreensis*). Ainda no

trabalho realizado por David et al. (2016), os mesmos demonstraram que a espécie bacteriana *Elizabethkingia* foi relacionada com fêmeas alimentadas com açúcar. Em nosso trabalho conseguiu-se relacionar esse gênero também com machos (Figura 8).

Os resultados aqui encontrados demonstram que a abordagem culturômica foi satisfatória para avaliar a microbiota associada a *Ae. aegypti*. Quando usada com outras ferramentas como a metagenômica, pode melhorar os resultados obtidos pois, uma vez que, ao se conseguir desenvolver uma bactéria em ambiente de laboratório se pode manipular as espécies, e, portanto, utilizá-las em estratégias de controle do vetor.

As larvas tratadas com os SI, mostraram uma riqueza de 11 espécies, todas pertencentes ao filo Proteobacteria e, em sua maioria, gram-negativas. Resultados similares já foram descritos em inúmeros trabalhos que buscavam identificar a microbiota cultivável em larvas de culicídeos (Dong et al., 2009; Jadin et al., 1966; Seitz et al., 1987; Gonzalez-Ceron et al., 2003; Gusamo et al., 2007; Briones et al., 2008; Cirimotch et al., 2011; Joyce et al., 2011)

Em um trabalho conduzido por Apte-Deshpande e colaboradores (2012), mostrou-se a presença de 7 gêneros bacterianos no intestino de larvas criados em laboratório (*Aeromonas*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Microbacterium*, *Pantoea*, *Pseudomonas* e *Serratia*), usando como base ágar-nutriente e meio LB. Neste trabalho, além das espécies citadas, foi possível identificar espécies dos gêneros *Stenotrophomonas*, *Delftia* e *Providencia*. Assim, o uso de uma abordagem culturômica auxiliou no achado de mais gêneros bacterianos. Outra questão é que, nesses trabalhos, os intestinos foram retirados através de dissecação. A opção de usar a larva inteira deu-se pelo fato de não perder nenhuma espécie bacteriana no processo. Contudo, não é possível afirmar que as três espécies também estariam albergadas no intestino das larvas.

O SI C₁₈MImCl foi o que mais modificou a microbiota cultivável das larvas expostas no que se refere ao não aparecimento de determinada espécie quando avaliadas diferentes concentrações. Por exemplo, o caso das bactérias *Serratia marcescens*, *Enterobacter asburiae* e *Stenotrophomonas maltophilia* – essas só foram encontradas em larvas tratadas com a CL₂₀. *Burkholdeira* sp. não foi encontrada em nenhum dos tratamentos.

A modulação da microbiota em culicídeos é relacionada à questão alimentar, habitat, fator genético, entre outros (Minard et al., 2013). Porém o papel funcional e fisiológico de muitas espécies ainda não é totalmente esclarecido, principalmente em larvas, uma vez que os estudos de microbiota geralmente são focados em mosquitos em fase adulta. Por exemplo, espécies do gênero *Serratia* e *Enterobacter* produzem enzimas hemolíticas e, portanto, em fêmeas adultas, estão relacionadas com a digestão do sangue (Gusmão et al., 2010; De Gaio et al., 2011; Meister et al., 2009). Porém, na literatura, não é encontrada nenhuma dessa função fisiológica em larvas. A bactéria *Stenotrophomonas maltophilia* foi encontrada em grande abundância no intestino de *Ae. aegypti* de campo (Yadav et al., 2015), mas nunca havia sido reportada em larvas.

O SI C₁₆MImMeS não mostrou ter grande impacto sobre a microbiota cultivável bacteriana nas larvas expostas, mesmo em diferentes concentrações. *Burkholderia* sp. não foi encontrada nas larvas expostas a CL₉₉ e CL₅₀ e *Microbacterium* sp não foi identificada em nenhum dos tratamentos.

Correlacionando a microbiota cultivável dos resultados obtidos com a análise de diversidade por RISA, o SI C₁₈MImCl demonstrou uma diversidade de Shannon (H') menor quando comparado ao grupo controle em ambas as concentrações utilizadas nos tratamentos. No caso do SI C₁₆MImMeS a CL₉₉ foi menor e a CL₅₀ apresentou um resultado semelhante ao controle.

No caso das larvas tratadas com o SI C₁₈MImCl, foi possível observar uma mudança na espécie dominante, pois, no controle, encontra-se uma banda com intensidade mais forte e, na CL₉₉, esta banda se torna mais fraca. (Figura 13). Com isso, é possível inferir que este SI diminui a abundância dessa espécie que pode ser competidora da espécie dominante quando tratada com o SI. Talvez, essa espécie torne-se patogênica ou auxilia no acesso do SI nas larvas.

As árvores filogenéticas sugerem que existam mudanças na comunidade bacteriana, já que nem sempre há a exclusão de espécies, mas a substituição e o aparecimento de outras (Unidades Taxonômicas Operacionais, nem sempre representam a mesma espécie) (Dickson et al., 2017). Pode ocorrer a mudança total da microbiota e essa pode auxiliar na morte da larva ou na melhor exposição aos sais. Para conhecermos com plena certeza as espécies

bacterianas que compõem a microbiota, é necessário utilizar uma ferramenta mais robusta de identificação, como é o caso da metagenômica.

Portanto, sem dúvida, os SI alteram as comunidades bacterianas presentes no interior da larva. Porém, alterar a microbiota, não necessariamente é um fator que determina a morte de uma larva. Por isso, buscou-se entender se as larvas com a sua respectiva microbiota retirada e expostas aos SI, apresentavam o mesmo padrão de mortalidade quando comparadas com larvas saudáveis.

Observou-se diferenças significativas para as larvas axênicas que foram expostas aos SI, após 48 horas, quando comparadas com o grupo de larvas não-axênicas/saudáveis. Assim, sugere-se que as comunidades bacterianas impactam sobre o modo de ação dos sais. Ou, ao contrário, os sais servem como um antibiótico, impedindo a proliferação de parte da microbiota e deixando espaço para bactérias patogênicas.

Isso foi ainda mais comprovado quando as larvas axênicas sobreviventes de uma exposição aos sais, ao serem recolonizadas por bactérias, se tornaram novamente suscetíveis. A partir disso, pode-se inferir que os sais interagem melhor com bactérias adquiridas do ambiente do que as que são transmitidas verticalmente. No entanto, vale lembrar que esses resultados são a partir de larvas criadas em laboratório. Portanto, essa dinâmica pode mudar quando se estuda populações de larvas oriundas do campo. Até mesmo por que descreveram que mosquitos de campo possuem uma microbiota muito mais diversificada do que aqueles de laboratório. Provavelmente, isso se deve à restrição alimentar quando criados em insetários (Osei-Poku et al., 2012).

É importante utilizar um larvicida convencional nesse tipo de experimento, uma vez que pode ser que todos os larvicidas tenham algum tipo de interação com a microbiota desencadeando assim a morte da larva. Neste estudo, foi escolhido o Temephos, que mostrou uma mortalidade alta em ambos os tratamentos. Essa molécula já possui o seu modo de ação bem descrito, atuando no sistema nervoso central da larva e inibindo a colinesterase. (Lima et al., 2003)

Na literatura, não foi possível encontrar trabalhos que relacionam inseticidas químicos na microbiota de culicídeos. Apenas em *Bti* (inseticida biológico) foi descrito que larvas, ao se intoxicarem com esta bactéria entomopatogênica, alteram sua microbiota. Isso demonstra que larvas tolerantes

ao *Bti* (com morte acima de 12 horas pós-exposição) possuem uma baixa diversidade e grande diferenças inter-individuais (Tetreau et al. 2018). Também foi descrito que bactérias do intestino de larvas auxiliam na degradação das toxinas produzidas por *Bt*, diminuindo, conseqüentemente, sua eficácia (Patil et al., 2013).

Este trabalho foi o primeiro a utilizar MALDI-TOF e culturômica para a identificação da microbiota cultivável em *Ae. aegypti* e o primeiro a relacionar um potencial inseticida à microbiota, provendo um primeiro *insight* sobre o modo de ação dessas moléculas na mortalidade de larvas.

7 CONCLUSÃO

A partir deste estudo, foi possível avaliar a ação de dois sais imidazólicos sobre a microbiota de larvas de *Ae. aegypti*.

Foi possível padronizar uma técnica baseada numa abordagem culturômica através de mosquitos adultos de *Ae. aegypti*, utilizando-a posteriormente nos testes com larvas. Esse protocolo poderá servir como subsídio para outros estudos que envolvem mosquitos adultos ou larvas, inclusive com indivíduos coletados em campo.

Os sais imidazólicos C₁₈MImC e C₁₆MImMeS tiveram ação sobre a microbiota cultivável de larvas de *Ae. aegypti* em todas as concentrações avaliadas, sendo C₁₈MImC o que mais alterou as espécies identificadas.

Ambos sais imidazólicos exerceram ação sobre as bactérias, diminuindo sua diversidade em comparação com larvas não tratadas, possivelmente mudando a comunidade bacteriana das larvas.

Larvas axênicas são parcialmente menos suscetíveis a ambos sais imidazólicos, inferindo que a microbiota tem função sobre as moléculas na mortalidade de larvas de *Ae. aegypti*

Quando larvas axênicas são re-colonizadas, se tornam suscetíveis aos sais imidazólicos, demonstrando que bactérias adquiridas do meio, participam do modo de ação dos sais imidazólicos.

Este é o primeiro estudo que utiliza uma abordagem culturômica e MALDI-TOF na identificação da microbiota de bactérias cultiváveis em *Ae. aegypti*. Além disso, este é o primeiro relato de um larvicida de origem química, com ação direta sobre a microbiota larval.

É de suma importância, a continuidade desse estudo na interação dos sais imidazólicos aqui testados com a microbiota de larvas. É importante reconhecer quais bactérias estão, de fato, interagindo com as moléculas, além de entender qual o papel fisiológico destas bactérias nas larvas. Além disso, é necessário realizar esses testes com larvas coletadas em campos, para verificar se a dinâmica aqui apresentada também ocorre com esses silvestres.

REFERÊNCIAS

- Aguirre-Obando OA, Pietrobon AJ, Bona ACD, Navarro-Silva MA. 2016. Contrasting patterns of insecticide resistance and knockdown resistance (kdr) in *Aedes aegypti* populations from Jacarezinho (Brazil) after a Dengue Outbreak. *Rev Bras Entomol* 60(1):94-100.
- Anderson EB, Long TE. 2010. Imidazole- and imidazolium- containing polymers for biology and material science applications. *Polymer*. 51(12):2447-2454.
- Apte-Deshpande A, Paingankar M, Gokhale MD, Deobagkar DN. 2012. *Serratia odorifera* a midgut inhabitant of *Aedes aegypti* mosquito enhances its susceptibility to dengue-2 virus. *PLoS One*. 7(7):e40401.
- Barth OM. 2000. **Atlas of dengue viroses morphology and morphogenesis**. Fiocruz/Rio de Janeiro. 189p.
- Baumann R. 2005. Biology bacteriocyte-associated endosymbionts of plant sap-sucking insects. *Annu Rev Microbiol*. 54:155-189.
- Biczak R, Pawlowska B, Balczewski P, Rychter P. 2014. The role of the anion in the toxicity of imidazolium ionic liquids. *J Hazard Mater*. 274:181-190.
- Bisset L. 2002. Usso correcto de insecticidas: control de la resistência. *Rev Cub Med Trop*. 54(3):202-219.
- Biteye B, Fall AG, Ciss M, Seck MT, Apolloni A, Fall M, Tran A, Gimonneau G. 2018. Ecological distribution and population dynamics of Rift Valley fever virus mosquito vectors (Diptera, Culicidae) in Senegal. *Parasit Vectors*. 11(1):27.
- Braga IA, Lima JBP, Soares SS, Valle D. 2004. *Aedes aegypti* resistance to temephos during 2001 in several municipalities in the states of Rio de Janeiro, Sergipe, and Alagoas, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 99(2):199-203.
- Braks MA, Honório NA, Lourenço-de-Oliveira R, Juliano SA, Lounibos LP. 2003. Convergent habitat segregation of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in southeastern Brazil and Florida. *J Med Entomol*. 40(6):785-94.
- Briones NA, Shililu J, Githure J, Novack R, Ras L. 2008. *Thorsellia anophelis* is the dominant bacterium in a Kenyan population of adult *Anopheles gambiae* mosquitoes. *ISME Journal*. 2:74-82.
- Christophers SR. 1960. ***Aedes aegypti*. The yellow fever mosquito. Its life history, bionomics and structure**. London: Cambridge University Press. 738 pp.

- Ciesielski S, Bulkowska K, Dabrowska D, Kaczmarczyk D, Kowal P, Mozejko J. 2013. Ribosomal Intergenic Spacer Analysis as a tool for monitoring methanogenic Archaea changes in an anaerobic digester. *Curr Microbiol.* 67(2):240-248.
- Consoli R, Oliveira R. 1994. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil.** Fiocruz/Rio de Janeiro. 228p.
- Correa MA, Brackney E, Steven B. 2018. Axenic *Aedes aegypti* develop without live bacteria, but exhibit delayed development and reduced oviposition. *Biorxiv.* Pre-Print.
- Couret J, Dotson E, Benedict MQ. 2014. Temperature, larval diet, and density effects on development rate and survival of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *PLoS One.* 9(2):e87468.
- Coon KL, Vogel KJ, Brown MR, Strand MR. 2014. Mosquitoes rely on their gut microbiota for development. *Mol Ecol.* 23(11):2727-2739.
- Cui B, Zheng BL, Zheng QY. 2003. Imidazole alkaloids from *Lepidium meyenii*. *J Nat Prod.* 66(8):1101-1103.
- da Cunha MP, Lima JB, Brogdon WG, Moya GE, Valle D. 2005. Monitoring of resistance to the pyrethroid cypermethrin in Brazilian *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations collected between 2001 and 2003. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 100(4):441-444.
- da Silva OS, Prado GR, da Silva JLR, Silva CE, da Costas M, Heermann R. 2013. Oral toxicity of *Photorhabdus luminescens* and *Xenorhabdus nematophila* (Enterobacteriaceae) against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Parasitol Res.* 112:2891-2896.
- David M., Santos MB, Vicente ACP, Maciel-de-Freitas R. 2016. Effects of environment, dietary regime and ageing on the dengue vector microbiota: evidence of a core microbiota throughout *Aedes aegypti* lifespan. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 111: 577-587.
- Dickson LB, Jiolle D, Minard G, Moltini-Conclois I, Volant S, Ghoulane A, Bouchier C, Ayala D, Paupy C, Moro CV, Lambrechts. 2017. Carryover effects of larval exposure to different environmental bacteria drive adult trait variation in mosquito vector. *Sci Adv.* 3:e1700585.
- Dillon RJ, Dillon VM. 2004. The gut bacteria of insects: nonpathogenic interactions. *Annu Rev Entomol.* 49:71-92.
- Ding F, Fu J, Jiang D, Hao M, Lin G. Mapping the spatial distribution of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Acta Trop.* 2018 Feb;178:155-162.

- Dong Y, Manfredini F, Dimopoulos G. 2009. Implication of the mosquito midgut microbiota in the defence against malaria parasites. *PLoS pathog.* 5:e10000423.
- Ducheyne E, Minh NNT, Haddad N, Bryssinckx W, Buliva E, Simard F, Malik MR, Charlier J, De Waele V, Mahmoud O, Mukhtar M, Bouattour A, Hussain A, Hendrickx G, Roiz D. 2018. Current and future distribution of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in WHO Eastern Mediterranean Region. *Int J Health Geogr.* 17(4).
- Edman JD, Strickman D, Kittayapong P, Scott TW. 1992. Female *Aedes aegypti* (Diptera Culicidae) in Thailand rarely feed on sugar. *J Med Entomol.* 29(6):1035-1038
- Engel P, Moran NA. 2013. The gut microbiota of insects - diversity in structure and function. *FEMS Microbiol Rev.* 7(5):699-735.
- Esu E, Lenhart A, Smith L, Horstick O. 2010. Effectiveness of peridomestic space spraying with insecticide on dengue transmission; systematic review. *Trop Med Int Health.* 15(5):619-631
- Forattini OP. 2002. *Aedes* (Stegomyia). In: Forattini OP. *Culicidologia Médica*. São Paulo: EDUSP, vol. 2, Cap. 14: 453-491.
- Franz AW, Kantor AM, Passarelli AL, Clem RJ. 2015. Tissue Barriers to Arbovirus Infection in Mosquitoes. *Viruses.* 7(7):3741-67.
- Garret-Jones C. 1964. The human blood index of Malaria vectors in relation to epidemiological assessment. *Bull World Health Organ.* 30:241-261.
- Garcia MT, Ribosa I, Perez L, Manresa A, Comelles F. 2013. Aggregation behavior and antimicrobial activity of ester-functionalized imidazolium- and pyridinium-based ionic liquids in aqueous solution. *Langmuir.* 29(8):2536-2545.
- Geng F, Zheng LQ, Yu L, Li GZ, Tung CH. 2010. Interaction of bovine serum albumin and long-chain imidazolium ionic liquid measured by fluorescence spectra and surface tension. *Process Biochem.* 45:306-311.
- Goellner E, Schmitt AT, Couto JL, Müller ND, Pilz-Junior HL, Schrekker HS, Silva CE, da Silva OS. 2018. Larvicidal and residual activity of imidazolium salts against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Pest Manag Sci.* 74(4):1013-1019.
- Gonzalez-Ceron L, Santillan F, Rdriguez MH, Mendez D, Hernandez-Avila JE. 2003. Bacteria in midguts of field-collected *Anopheles albimanus* block *Plasmodium vivax* sporogonic development. *J Med Entomol.* 40:371-374.
- Gubler DJ. 2011. Dengue, urbanization and globalizaion: the unholy Trinity of the 21st century. *Trop Med Health.* 39(4):3

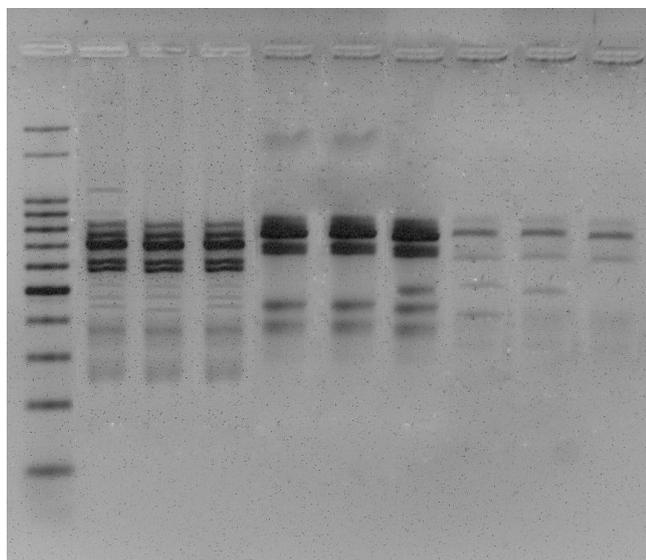
- Guedes DRD. 2012. **Análise da competência vetorial para o vírus Dengue em populações naturais de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* de Pernambuco**. Tese (Doutorado em Saúde Pública) – Centro de pesquisas Ageu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife.
- Gusmão DS, Santos AV, Marini DC, Russo ED, Peixoto MDA. 2007. First isolation of microorganisms from gut diverticulum of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): new perspectives for insect bacteria association. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 102:919-924.
- Gusmão DS, Santos AV, Marini DC, Bacci M Jr, Berbert-Molina MA, Lemos FJ. 2010. Culture-dependent and culture-independent characterization of microorganisms associated with *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) (L.) and dynamics of bacterial colonization in the midgut. *Acta Trop*. 115(3):275-81.
- Halstead SB. 2008. Dengue virus-mosquito interactions. *Annu Rev Entomol*. 53:273-291.
- Joyce JD, Nogueira JR, Bales AA, Pittman KE, Anderson JR. 2011. Interactions between la crosse virus and bacteria isolated from the digestive tract of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol*. 48(2):389-394.
- Klepzig KD, Adams AS, Handelsman J, Raffa KF. 2009. Symbioses: a key driver of insect physiological processes, ecological interactions, evolutionary diversification, and impacts on humans. *Environ Entomol*. 38(1):67-77.
- Krossing I, Slattery JM, Daguene C, Dyson PJ, Oleinikova A, Weingartner H. 2006. Why are ionic liquids liquid? A simple explanation based on lattice and solvation energies. *J Am Chem Soc*. 128(47):13427-13434.
- Luz PM, Codeço CT, Medlock J, Struchiner CJ, Valle D, Galvani AP. 2009. Impact of insecticide interventions on the abundance and resistance profile of *Aedes aegypti*. *Epidemiol Infect*. 137(8):1203-1215.
- Maciel MV, Morais SM, Bevilaqua CML, Silva RA, Barros RS, Sousa RN, Souza LC, Machado LKA, Brito ES, Souza-Neto MA. 2010. Atividade inseticida in vitro do óleo de sementes de nim sobre *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *Rev Bras Parasitol Vet*. 19(1):7-11.
- Minard G, Mavingui P, Moro CV. 2013. Diversity and function of bacterial microbiota in the mosquito holobiont. *Parasit Vectors*. 6:146
- Minard G, Tran FH, Raharimalala FN, Hellard E, Ravelonandro P, Mavingui P. 2012. Prevalence, genomic and metabolic profiles of *Acinetobacter* and *Asaia* associated with field-caught *Aedes albopictus* from Madagascar. *FEMS Microbiol Ecol*. 83(1):63-73.
- Moran NA, Baumann P. 2000. Bacterial endosymbionts in animals. *Curr Opin Microbiol*. 3(3):270-275.

- Lemaitre B, Hoffmann J. 2007. The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu Rev Immunol*. 25:697-743.
- OMS – Organização Mundial da Saúde. **Dengue vaccine research**. 2017. Disponível em: <http://www.who.int/immunization/research/development/dengue_vaccines/en/>. Acesso em: 10 mai. 2018.
- OMS – Organização Mundial da Saúde. **Dengue and severe dengue**. 2018. Disponível em: <<http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>>. Acesso em: 10 mai. 2018.
- OMS – Organização Mundial da Saúde (Eds). 2006. **Pesticides and their application for the control of vectors and pests of public health importance**. WHO/Genebra. 125p.
- OMS – Organização Mundial da Saude. **Global Alert and Response (GAR). Dengue/dengue haemorrhagic fever**. 2017. Disponível em: <<http://www.who.int/csr/disease/dengue/en/>>. Acesso em: 22 fev. 2017.
- Osei-Poku J, Mbogo CM, Palmer WJ, Jiggins FM. 2012. Deep sequencing reveals extensive variation in the gut microbiota of wild mosquitoes from Kenya. *Mol Ecol*. 21(20):5138-5150.
- Plourde AR, Bloch EM. 2016. A literature review of Zika Virus. *Emerg Infect Dis*. 22(7):1184-1192.
- Prophiro JS, Silva OS, Luna JE, Piccoli CF, Kanis LA, Silva MA. 2011. *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae): coexistence and susceptibility to temephos, in municipalities with occurrence of dengue and differentiated characteristics of urbanization. *Rev Soc Bras Med Trop*. 44(3):300-305.
- Ramirez JL, Souza-Neto J, Torres Cosme R, Rovira J, Ortiz A, Pascale JM, Dimopoulos G. 2012. Reciprocal tripartite interactions between the *Aedes aegypti* midgut microbiota, innate immune system and dengue virus influences vector competence. *PLoS Negl Trop Dis*. 6(3):e1561.
- Ranke J, Cox M, Müller A, Schmidt C, Beyersmann D. 2006. Sorption, cellular distribution, and cytotoxicity of imidazolium ionic liquids in mammalian cells – influence of lipophilicity. *Toxicol Environ Chem*. 88(2):273-285.
- Ranke J, Stolte S, Störmann R, Arning J, Jastorff B. 2007. Design of Sustainable Chemical Products – The example of Ionic Liquids. *Chem Rev*. 107(6):2183-2206.
- Ricci I, Damiani C, Capone A, DeFreece C, Rossi P, Favia G. 2012. Mosquito/microbiota interactions: from complex relationships to biotechnological perspectives. *Curr Opin Microbiol*. 15:278-284.

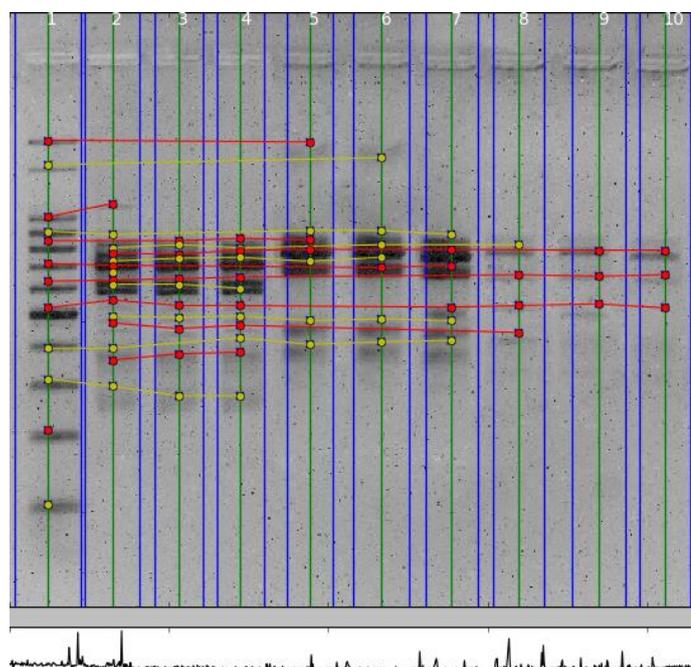
- Riduan SI, Zhang Y. 2013. Imidazolium salts and their polymeric materials for biological applications. *Chem Soc Rev.* 42(23): 9055-9070.
- Rose, RI. 2007. Pesticides and public health: integrated methods of mosquito management. *Emerg Infect Dis.* 7(1):17-23.
- Sarker N, Mahbub KR. 2012. *Bacillus thuringiensis*: An environment friendly microbial control agent. *Microbial J.* 2(2):36-51.
- Sender R, Fuchs S, Milo R. 2016. Are We Really Vastly Outnumbered? Revisiting the Ratio of Bacterial to Host Cells in Humans. *Cell.* 164(3):337-340.
- Schilte C, Staikowsky F, Couderc T, Madec Y, Carpentier F, Kassab S, Albert ML, Lecuit M, Michault A. 2013. Chikungunya virus-associated long-term arthralgia: a 36-month prospective longitudinal study. *PLoS Negl Trop Dis.* 7(3):e2137
- Silva WJ, Dória GA, Maia RT, Nunes RS, Carvalho GA, Blank AF, Alves PB, Marçal RM, Cavalcanti SC. 2008. Effects of essential oils on *Aedes aegypti* larvae: alternatives to environmentally safe insecticides. *Bioresour Technol.* 99(8):3251-3255.
- Simmons CP, Farrar JJ, Chau NVV, Wills B. 2012. Dengue. *N Engl J Med.* 366(15):1423-1432.
- Souza SS, da Silva IG, da Silva HHG. 2010. Associação entre incidência de dengue, pluviosidade e densidade larvária de *Aedes aegypti*, no estado de Goiás. *Rev Soc Bras Med Trop.* 43(2):152-155.
- Tabashnik BE, Brévault T, Carrière Y. 2013. Insect resistance to *Bt* crops: lessons from the first billion acres. *Nat Biotechnol.* 31(6):510-521.
- Tandina F, Almeras L, Koné AK, Doumbo OK, Raoult D, Parola P. 2016. Use of MALDI-TOF and culturomics to identify mosquitoes and their midgut microbiota. *Parasit Vector.* 9:945.
- Wang Y, Gilbreath TM 3rd, Kukutla P, Yan G, Xu J. 2011. Dynamic gut microbiome across life history of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* in Kenya. *PLoS One.* 6(9):e24767.
- Wasserscheid P, Keim W. 2000. Ionic liquids – new “Solutions” for transition metal catalysis. *Angew Chem Int Ed.* 39(21):3773-3789.
- Weaver SC, Reisen WK. 2010. Present and future arboviral threats. *Antiviral Res.* 85(2):328-45.
- Willing BP, Jansson JK. 2011. **The gut microbiome: Ecology and function.** In: Sadowsky M, Whitman RL. *The Fecal Bacteria.* ASM Press/Washington. 39-65

- Woodring J, Davidson EW. 1996. Biological Control of Mosquitoes. In: Beaty BJ (Eds). The biology of disease vectors. University Press of Colorado/Colorado. 816p.
- Viellgas LEM, Campolina TB, Barnabe N, Orfano AS, Chaves BA, Norris DE, Pimenta PFP, Secundino NFC. 2018. Zika virus infection modulates the bacterial diversity associated with *Aedes aegypti* as revealed by metagenomic analysis. PLoS One. 13(1):e0190352.
- Xi Z, Ramirez JL, Dimopoulos G. 2008. The *Aedes aegypti* toll pathway controls dengue virus infection. PLoS Pathog. 4(7):e1000098.
- Yadav KK, Datta S, Naglot A, Bora ., Hmuaka V, Bhagyawant S, Gogoi HK, Veer V, Raju PS. 2016. Diversity of Cultivable Midgut Microbiota at Different Stages of the Asian Tiger Mosquito, *Aedes albopictus* from Tezpur, India. Plos One. 12: e0167409.

APÊNDICE A – ANÁLISE DO PERFIL DE BANDAS PARA CONSTRUÇÃO DE ARVORES FILOGENÉTICAS



Perfil de bandas da microbiota de larvas de *Ae. aegypti* tratadas com os Sais imidazólicos



Análise do perfil de bandas analisado pelo software PyElph, utilizando o coeficiente de Dice: $D_c = 2j/(a + b)$, onde j é o número comum de bandas entre as amostras, a o número de bandas em cada amostra A, número de bandas na amostra B.