

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRO REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

COMPARAÇÃO DA ANÁLISE ELETROFORÉTICA DE PROTEÍNAS
EM *Pediculus capitis* ANTES E APÓS A APLICAÇÃO DA TINTURA
COMPOSTA POR GRAVIOLA (*Annoma muricata*), FRUTA DO
CONDE (*Annoma sp.*) E ARRUDA (*Ruta graveolens*).

Bolsista: Fhabianne Corrêa Bezerra, CNPq.

MANAUS – AM

2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRO REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

RELATÓRIO FINAL

PIB-B/0002/2009 (renovação)

COMPARAÇÃO DA ANÁLISE ELETROFORÉTICA DE PROTEÍNAS
EM *Pediculus capitis* ANTES E APÓS A APLICAÇÃO DA TINTURA
COMPOSTA POR GRAVIOLA (*Annoma muricata*), FRUTA DO
CONDE (*Annoma sp.*) E ARRUDA (*Ruta graveolens*).

Bolsista: Fhabianne Corrêa Bezerra, CNPq.

Orientadora: Prof^a Dr^a Raquel Borges Moroni

MANAUS – AM

2010

Todos os direitos deste relatório são reservados à Universidade Federal do Amazonas, ao Núcleo de Estudo e Pesquisa em Ciência da Informação e aos seus autores. Parte deste relatório só poderá ser reproduzida para fins acadêmicos ou científicos.

Esta pesquisa, financiada pelo Conselho Nacional de Pesquisa – CNPq, através do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica da Universidade Federal do Amazonas, foi desenvolvida pelo Núcleo de Estudo e Pesquisa em Ciência da Informação e se caracteriza como sub projeto do projeto de pesquisa Bibliotecas Digitais.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	05
2. JUSTIFICATIVA	07
3. OBJETIVO	07
3.1 Objetivo geral	07
3.1 Objetivos específicos	08
4. MATERIAL E MÉTODOS	08
4.1 População de estudo	08
4.2 Colheita do Material	08
4.3 Análises enzimáticas	09
4.3.1 Preparação das amostras	09
4.4 Testes com a tintura composta	12
4.4.1 Origem da tintura composta e controles	12
4.4.2 Procedimentos dos testes com o extrato	13
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
5.1 Padrões Eletroforéticos	15
5.1.1 Fosfoglico isomerase	15
5.1.2 Isocitrato desidrogenase	17
5.1.3 Fosfoglicomutase	19
5.1.4 Enzima málica	21
5.2 Testes Repelente e Fumigante	26
5.2.1 Teste repelente	26
5.2.2 Teste Fumigante	30
6. Conclusão	33
7. RERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34

RESUMO

A pediculose é uma infestação na cabeça causada pelo piolho *Pediculus capitis* que apresenta distribuição mundial. Os métodos de controle utilizados atualmente não tem sido eficientes, com raras exceções, devido à resistência apresentada por *Pediculus capitis* (piolho da cabeça) a diversos ingredientes ativos químicos, o que influencia de forma significativa no aumento dos casos de pediculose. O objetivo do presente trabalho foi estimar o perfil isoenzimático de indivíduos adultos de *P. capitis* antes e após a aplicação dos extratos vegetais compostos por fruta-do-conde, graviola e arruda, bem como a atividade repelente e fumigante destes extratos contra *P. capitis*. Foram analisados oito *loci* isoenzimáticos (*PGI*, *PGM*, *IDH*, *ME*, *EST1*, *EST2*, *HK*, *MDH*) de adultos de *P. capitis*, em eletroforese horizontal, utilizando géis de amido (12,5%) e amido-agarose (2% e 1%, respectivamente), com tampões e colorações específicas. O perfil eletroforético detectado para a maioria dos sistemas isoenzimáticos foi constituído de uma única região de atividade, eletronegativa e de coloração moderada, sendo a região controlada geneticamente por um loco, com exceção do sistema esterase, apresentando variação no número de alelos por loco. Após a comparação dos perfis isoenzimáticos (*PGM*, *IDH*, *ME*, *PGI*) antes e após a aplicação dos extratos vegetais em adultos de *P. capitis*, é possível inferir que os extratos podem ter interferido na atividade das enzimas analisadas, devido em alguns sistemas terem sido observados a diminuição da intensidade de coloração das bandas e a ausência de bandas. Os extratos vegetais constituídos de arruda, graviola e fruta do conde apresentaram atividade repelente. No entanto, não apresentaram atividade fumigante contra *P. capitis*. Os dados obtidos neste trabalho fornecem informações importantes para pesquisas posteriores, com a finalidade de verificar a estrutura genética das populações de *P. capitis* na região Amazônica, como também para ensaios experimentais em cobaias e humanos dos extratos vegetais referenciados acima, podendo ser uma alternativa de baixo custo para o tratamento da pediculose da cabeça.

Palavras chave: Isoenzimas; *Pediculus capitis*; Repelente, Manaus.

FINANCIAMENTO: MCT-AMAZÔNIA/CNPq/2006 e 2008.

1. INTRODUÇÃO

A infestação com *Pediculus capitis* é um problema de saúde mundial afetando a maioria das crianças de escolaridade primária em países desenvolvidos ou em desenvolvimento (BURGESS, 2004; BORGES *et al.*, 2007). Porém, qualquer pessoa independente da classe social, sexo, raça, credo ou cor pode ser infestada por piolhos (BARBOSA *et al.*, 1998).

Há uma série de fatores que podem interferir na prevalência da pediculose. De acordo com LINARDI *et al.*, (1988 b), a faixa etária mais susceptível ao *P. capitis*, em quase todo o mundo, é a de 6 a 13 anos, podendo sofrer variações. No entanto, sabe-se que não há limite mínimo ou máximo de idade para ocorrência de infestações, atingindo desde crianças de três meses de idade até idosos (SINNIAH *et al.*, 1981).

Tem-se observado uma maior prevalência no sexo feminino, tendo como possíveis causas a frequência de penteação e tamanho dos cabelos (COATES, 1971; FAN *et al.*, 1991). Aspectos culturais também podem interferir na prevalência da pediculose como, por exemplo, na Nigéria, onde alguns grupos de mulheres têm por hábito manter seus cabelos enrolados em tranças dificultando uma higiene pessoal adequada e, dessa forma, uma maior prevalência nesse grupo (OGUNRINADE & OYEJIDE, 1984).

Variações na forma dos cabelos, apresentadas por negros e não negros, espessura dos fios e densidade de cabelos no couro cabeludo podem interferir na prevalência e nível de infestação por piolhos (SINNIAH *et al.*, 1981; CHUNGE, 1986). Sabe-se que a população brasileira apresenta alta miscigenação racial e não se sabe se tais variações fenotípicas dos cabelos são importantes o suficiente para interferir na prevalência e nos níveis de infestação por pediculose.

A recrudescência da pediculose e os fatores a ela associados tem sido objeto de

estudo em várias partes do mundo (JALAYER, 1967; LÓLIO *et al.*, 1975; PETRELLI *et al.*, 1980; CHUNGE, 1986; COURTIADÉ *et al.*, 1993; CHOUÉLA *et al.*, 1997; SPEARE & BUETTNER, 1999; CARZOLA, 2007; CUNHA *et al.*, 2008; HODJATI, 2008; TOLOZA *et al.*, 2009). No Brasil, ainda há poucos estudos associando as taxas de prevalência de pediculose às características dos cabelos (MADUREIRA, 1991, BORGES & MENDES, 2002; BORGES *et al.*, 2007).

Vários medicamentos são disponíveis no mercado para a pediculose, dentre eles destacam-se o uso dos produtos a base de organofosforados e piretróides (deltametrina e permetrina). Nenhuma dessas drogas são eficazmente seguras, pois podem apresentar efeitos colaterais em pacientes portadores de asma ou problemas respiratórios (CHOSIDOW, 2000).

Por esta razão o uso alternativo de produtos derivados de plantas tem crescido por todo o mundo pela tendência de consumidores preferirem produtos “naturais”. Essências de óleos de plantas, o vapor destilado de plantas aromáticas, constituem uma rica fonte de bioativos químicos com componentes geralmente consistindo de monoterpenos e fenóis de baixo peso molecular (GUENTHER, 1972). Alguns destes componentes são efetivos contra uma ampla variedade de parasitas (RICE & COATS, 1994), incluindo o piolho humano (BURGESS, 2004; PRIESTLEY *et al.*, 2006; TOLOZA *et al.*, 2006). Produtos derivados de plantas como xampus, sprays e loções têm previamente sido reportados como efetivos em pediculicidas.

Várias técnicas científicas moleculares tem permitido a identificação e estudo da atividade isoenzimática de insetos como *P. capitis*. (SANTOS *et al.* 2004). Dentre os marcadores moleculares utilizados, as isoenzimas ainda são utilizadas também para estimar a variabilidade e diferenciação genética e também auxiliar na elucidação de problemas que ocorrem na identificação morfológica das espécies (NARANG *et al.*

1993; CARVALHO-PINTO & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 2003, SANTOS *et al.* 2004). A eletroforese de isoenzimas representa uma eficiente ferramenta de investigação em várias áreas como a Parasitologia, Genética, Etologia, Ecologia e a Sistemática. No gênero *Pediculus*, há trabalhos realizados com eletroforese de isoenzimas (BROGDON 1989; AMEVIGBE *et al.*, 2000).

2. JUSTIFICATIVA

A prevalência e os níveis de infestação da pediculose da cabeça estão relacionados com fatores culturais, sociais e genéticos, principalmente, a resistência do piolho da cabeça a inseticidas químicos. O grau de influência de cada um destes fatores pode variar dependendo do perfil da população em estudo. Tais fatos reafirmam a necessidade de estudos detalhados sobre a influência destes fatores local e regionalmente. Além do mais, essa ectoparasitose tem se mantido como um importante problema de saúde pública, principalmente, entre crianças e/ou escolares. Havendo assim, a necessidade de estudos de novos inseticidas naturais, com baixo poder residual. Portanto, a avaliação da atividade repelente e fumigante de uma tintura composta de plantas regionais como: graviola, fruta do conde e arruda contra adultos de *Pediculus capitis* mediante a análise de possíveis alterações na atividade enzimática antes e após aplicação dos extratos vegetais torna-se relevante no sentido de contribuir com estudos futuros para controle deste ectoparasito.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar possíveis alterações na atividade enzimática antes e após a aplicação da tintura composta por graviola (*Annoma muricata*), fruta do conde (*Annoma* sp) e arruda (*Ruta graveolens*).

3.2 Objetivos específicos

Estimar o perfil isoenzimático de *P. capitis* antes e após a aplicação de extratos vegetais utilizando os sistemas enzimáticos: Fosfoglicose isomerase, Isocitrato desidrogenase, fosfoglicomutase e enzima málica.

Avaliar a atividade repelente e fumigante da tintura composta de graviola, fruta do conde e arruda contra espécimes de *P. capitis*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 População do estudo

O presente trabalho foi realizado a partir de colheitas de indivíduos adultos de *P. capitis* de crianças infestadas de duas creches públicas de Manaus-AM. Vale ressaltar, que a direção destas instituições, juntamente com os pais ou responsáveis já autorizaram sua contribuição em participar da pesquisa, através da assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido. A faixa etária das crianças infestadas, onde foram realizadas as colheitas foi de 9 meses a 13 anos.

4.2 Colheita do material

O método que foi utilizado para a colheita dos indivíduos adultos de *P. capitis*

foi a inspeção visual da cabeça das crianças (SLONKA, 1976, BORGES & MENDES, 2002), com coleta manual do piolho. Foram utilizados escova e pente fino para a retirada dos indivíduos adultos, a inspeção do couro cabeludo consistirá na escovação da cabeça de cada criança, por 2 minutos. Todas as áreas das cabeças foram escovadas, dando particular atenção às regiões da nuca, atrás e próximo às orelhas e na região central da cabeça.

Os espécimes foram capturados e transferidos para frascos de boca larga de acrílico com fundo de argila e cobertos com filó preso por um elástico, acondicionados em uma caixa térmica e transportados até o laboratório de Vetores da Malária e Dengue (CPCS/INPA). Os mesmos foram mantidos em frascos com fundo de argila em estufa com temperatura de 37°C por 48 horas para eliminar as enzimas relacionadas ao metabolismo sanguíneo do hospedeiro. Os espécimes foram identificados utilizando a chave de BORROR & DeLONG (1969), com o auxílio microscópio e lupa no laboratório de vetores de Malária e Dengue (INPA).

Em seguida, foram feitas as primeiras análises do perfil enzimático. Posteriormente foram realizadas as aplicações da tintura composta e subseqüentemente as análises para caracterização do perfil enzimático.

4.3 Análises enzimáticas.

4.3.1 Preparação das amostras

Foram utilizados indivíduos adultos para todos os sistemas enzimáticos. Os espécimes antes e após a aplicação dos extratos vegetais foram homogeneizados individualmente em placas escavadas de porcelana, utilizando-se 15µl de 2-µ-mercaptoetanol a 0,5% (v:v), a fim de impedir a oxidação do material. Após a homogeneização, foram colocados sobre a placa escavada contendo as amostras, pedaços de papel fino ("yes"), medindo 1,5 cm x 1,5 cm e, sobre esses, papel de filtro Whatman nº3 (5 mm x 6 mm, os quais foram embebidos e, inseridos verticalmente no gel. O papel fino tem função de impedir a passagem de resíduos do extrato para o papel de filtro, possibilitando melhor separação das bandas eletroforéticas. Nas análises

eletroforéticas, foi utilizado o sistema horizontal e o tipo de suporte de fracionamento foi amido parcialmente hidrolisado (14 %) em tampão de 0.005M histidina-HCl, pH 9.5, contendo 0.0025M de NaCl (SECOND & TROUSLOT, 1980) e para preparar o tampão da cuba foi utilizado citrato de sódio 0.41M, pH 8.0. A preparação do gel, foi feita em microondas com agitação a cada 20 segundos até a fervura, quando então foi desaerado em bomba a vácuo e colocado sobre placa de vidro (13 cm x 20 cm) até o seu resfriamento em temperatura ambiente. Em seguida, o gel foi transferido para o refrigerador por cerca de uma hora, para depois serem aplicadas as amostras.

Para a migração eletroforética, as pontes entre os eletrodos e o gel, foram feitas com pano fino (perfex), dobrado em quatro partes iguais. O tempo de migração eletroforética foi de 4 horas a uma temperatura de 4°C, com 220V e 25mA. Após a migração eletroforética, os géis foram fatiados horizontalmente em duas partes homólogas de 3 mm de espessura cada, e sobre suas superfícies internas expostas foram realizadas as colorações específicas. Depois de corados, os géis foram incubados em estufa à 37°C até a revelação das zonas de atividade. Depois foram lavados em solução de ácido acético glacial, etanol e água destilada na proporção de 1:5:5 (v:v) para realização das leituras e fotografias.

Para o estudo das esterases (EST) foi utilizado o protocolo de PASTEUR *et. al.* (1987). Após a migração, foi realizada a coloração aplicando sobre o gel uma mistura de Fast blue RR, α e β -naftil-acetato dissolvido em tampão Tris-HCl, pH 7.1 (SELANDER *et al.*, 1986; GILOT & ANDRE, 1995). Cada parte do gel foi incubada em câmara escura com uma solução de 0.0016M 1-naftil-acetato, 0.0016M de 2-naftil-acetato, 2% de acetona em água destilada e Fast blue RR (0.1%) em temperatura de 37°C por 3 horas para a revelação das zonas de atividade.

Para a coloração da hexoquinase (HK), utilizou-se gel de amido Tris-citrato (tris 0,009 e ácido cítrico 0,003M) pH 7,1 e nas cubas Tris-citrato (tris 0,135M e ácido cítrico 0,040) pH6,9. Para a observação das zonas de atividade, a coloração foi composta de 50mg de α -D-glicose, 35mL de tampão Tris-HCl 0,1M pH7,5 1mL de $MgCl_2$ 0,1M, 5mg de NADP, 40mg de ATP, 5 μ l de glicose-6-fosfato desidrogenase (170 unidades/MG de proteína), 5mg de MTT, 5mg de PMS e 10mL de Agar a 2%. Em seguida, o gel foi incubado em estufa à 37 °C, até a visualização das bandas (STEINER & JOSLYN, 1979).

Nas análises de malato desidrogenase (MDH), foi empregada a parte homóloga do gel para a hexoquinase. Para a revelação das regiões de atividade desta enzima foi utilizada a seguinte mistura de reação: 35 mL de tampão Tris-HCl 0,1M pH7,5 1mL de solução de ácido DL-málico 2,0M pH 7,0; 10mg de NAD; 5mg de MTT; 0,5 mg de PMS e 10ml de ágar a 2%. A seguir, o gel foi incubado em estufa a 37°C, até a visualização das bandas (STEINER & JOSLYN, 1979).

Para a observação da atividade da fosfoglicose isomerase foi empregada uma mistura composta de 35 ml de tampão Tris-HCl 0,1 M pH 7,5; 30 mg de substrato frutose-6-fosfato; 5 μ l de glicose-6-fosfato desidrogenase (170 unidades/MG de proteína); 5 mg de NADP; 4ml de $MgCl_2$ 0,1M, 5 mg de MTT, 5mg de PMS e 10 ml de Agar a 2%. Tal solução foi espalhada sobre o gel e incubado em estufa a 37°C, até a visualização das bandas (STEINER & JOSLYN, 1979).

Para a coloração da isocitrato desidrogenase (IDH), foi colocada na superfície do gel uma mistura da reação composta de 50 mg de ácido isocítrico, 35 ml de tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,5; 1,0 ml de $MgCl_2$ 0,1 M, 5 mg de NADP, 5 mg de MTT, 5 mg de PMS e 10 ml de ágar a 2%. Em seguida, o gel foi incubado em estufa à 37 °C, até a visualização das zonas de atividade (STEINER & JOSLYN, 1979).

Para a observação da atividade da fosfoglicomutase (PGM), foi colocada sobre o gel, uma mistura de reação composta de NAD 0.0004 M dissolvido em 0.1M de tampão Tris-HCL, pH 8,5 com PMS (6.5×10^{-6}) e NBT (250×10^{-6}) dissolvido em tampão glutamato de sódio, pH 7.0 e 10 ml de ágar a 2%. A seguir, o gel foi incubado à 37°C, até a visualização das bandas (SUTHERLAND, 1949; RATHAUR *et al.*, 1982).

Na análise da enzima málica (ME) foi empregado gel de amido Tris-citrato (tris 0,009 e ácido cítrico 0,003M) pH 7,1 e nas cubas Tris-citrato (tris 0,135M e ácido cítrico 0,040) pH6,9. Na revelação das regiões de atividade a coloração utilizada foi composta de 35 mL de tampão Tris-HCl 0,1M pH7,5, 0,5mL de solução de ácido DL-málico 2,0M pH 7,0; 5mg de NADP; 5mg de MTT; 5 mg de PMS e 10ml de ágar a 2%. Esta coloração foi colocada sobre o gel e este incubado a 37°C (BORGES, 2005).

4.4 Testes com a Tintura Composta.

4.4.1 Origem da tintura composta e controles.

As folhas das plantas utilizadas para a produção dos extratos de graviola e fruta do conde foram coletadas de árvores situadas nas proximidades do mini-campus da UFAM. As folhas de arruda foram coletadas de 50 indivíduos procedentes do Horto do Centro Universitário Nilton Lins.

A tintura composta foi preparada conforme procedimentos descritos na Farmacopéia Brasileira (1988). Foram testadas três concentrações conhecidas 100 mg/ml, 300 mg/ml e 500 mg/ml . Foram utilizadas para a produção da tintura composta as folhas de arruda, graviola e fruta-do-conde. Vale ressaltar, que será feita a

caracterização dos extratos por análises em HPLC.

4.4.2 Procedimentos dos testes com o extrato.

Após a colheita, identificação dos espécimes de *P. capitatus* e as primeiras análises do perfil isoenzimático foram iniciadas os testes com o extrato. Os testes fumigante e repelentes utilizados neste projeto seguem o protocolo de TOLOZA *et al.*, 2006.

Os testes de fumigamento foram realizados em triplicata. O tratamento de fumigamento consiste de aplicar 20 µl das soluções a serem testadas (500mg/ml) do extrato sobre uma lamínula de 24 x 24 mm posicionada dentro de placa de Petri com 9cm de diâmetro, a qual foi dividida em duas partes: de um lado foi colocada a lamínula e do outro lado foi inserido uma outra placa de Petri, com diâmetro de 5.5 cm, preenchida com papel Whatman nº1, e contendo quinze espécimes adultas de *P. capitatus*. Após isso a placa de Petri maior foi tampada. Nesse teste foi utilizado como controle positivo e negativo, respectivamente, um inseticida de comprovada ação piolhícida, a deltametrina (solução 25g de deltametrina/1000 mL do veículo q.s.p-etanol), sendo o veículo extrator do princípio ativo das plantas, o etanol. Como controle negativo também foi usado piolho tratado apenas com água destilada. O referido teste foi monitorado a cada dez minutos, indicados por T0 até T12 a fim de verificar a mortalidade de indivíduos.

O teste repelente foi avaliado em triplicata. Nesse experimento foi usado de papel de filtro (Whatman nº1, com 10 cm de diâmetro), dividido em uma zona interna (a) e uma zona externa (b), ambas com área igual.

Para o teste foi utilizado 0,5 ml de cada concentração da tintura composta a ser testada, que foi aplicada na zona b. O controle negativo e positivo respectivamente

consistira de ambas as zonas tratadas com etanol e a deltametrina. Também foi mantido um grupo apenas com os piolhos tratados somente com água destilada. Todos os papéis de filtro foram colocados para secar 10 minutos antes do uso. Grupos de 9 piolhos adultos foram colocados na zona (a) e o número de piolhos encontrados em ambas as zonas foram registrados a cada cinco minutos durante 1 hora. Todos os piolhos foram mantidos em $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$; $60 \pm 5\%$ umidade relativa. Após os testes com os extratos, os piolhos foram mantidos em freezer a -70°C para as posteriores análises dos perfis enzimáticos. A matriz de planejamento a ser seguido está representada na Tabela 1.

Tabela 1 - Planejamento experimental da pesquisa de atividade repelente e fumigante da tintura composta por graviola, fruta do conde e arruda contra *Pediculus capitis* (Anoplura:Pediculidae). O fator A representa a concentração da tintura composta: 500 mg/ml; B – controle positivo (piperonal 99%); C- controle negativo (etanol) e D- controle negativo (água) . Os testes foram realizados em triplicata e foram utilizados 15 piolhos em cada teste. Os sinais “+” e “--” respectivamente representam a presença e a ausência do fator no ensaio.

Ensaio	Fatores					
	A	A	A	D	E	F
1	+	--	--	--	--	--
2	--	+	--	--	--	--
3	--	--	+	--	--	--
4	--	--	--	+	--	--
5	--	--	--	--	+	--
6	--	--	--	--	--	+

ANÁLISE ESTATÍSTICA.

Os dados sobre o número de indivíduos mortos para o teste repelente da tintura composta serão submetidos a análise de probit, com a finalidade de estimar o tempo

knockdown 50% (KT 50) pelo programa POLO PC. O índice do repelente (RI) será calculado, sendo o $RI = [(Nc - Nt) / Nc] * 100$, onde NC e o percentual na zona (b) para o controle, e Nt e o percentual na zona (b) para o tratamento. A significância de RI será analisada por ANOVA e pelo teste Duncan

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Padrões Eletroforéticos

5.1.1) FOSFOGLICO ISOMERASE

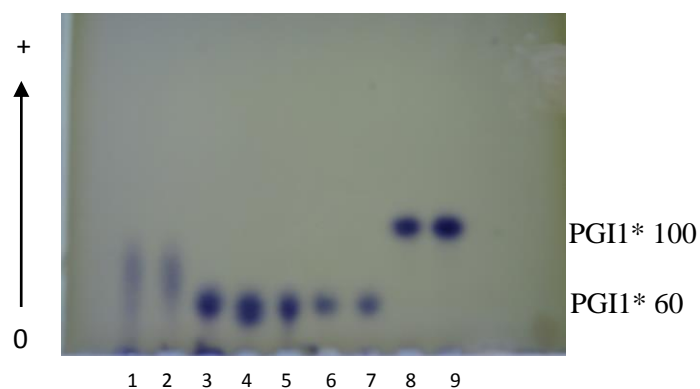


Figura 01 – Padrão eletroforético da fosfoglicose isomerase de indivíduos adultos de *Pediculus capitis* (1 a 7)) antes da aplicação de extratos vegetais, e para controle larvas do quarto estágio de *Anopheles darlingi* (8 e 9) Eletroforese em gel de amido. Sistema tampão Tris-citrato, pH 6,9 da cuba e pH 7,1 do gel. Migração nos sentidos indicados. Obs: foram analisadas para *P. capitis* as amostras de 3 a 7

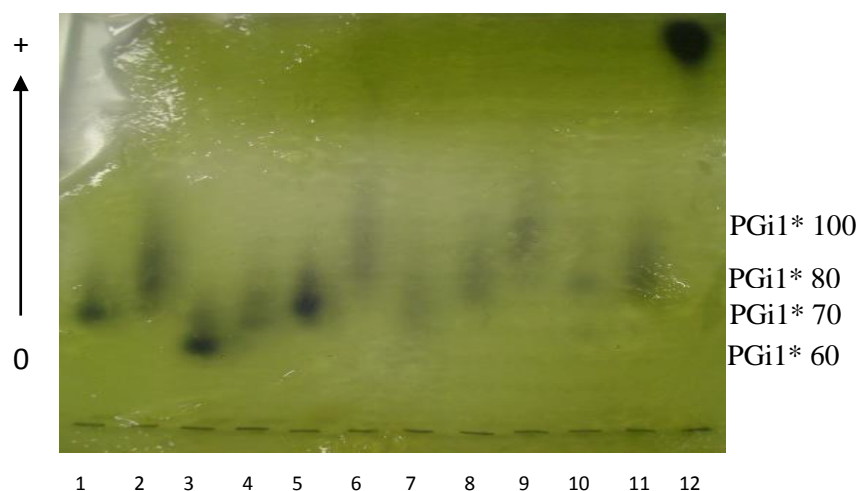


Figura 02 – Padrão eletroforético para fosfoglicose isomerase em indivíduos adultos de *Pediculus capitis* após aplicação de extratos vegetais (1 a 10) submetidos no teste repelente (6 a 10) e fumigante (1 a 5). Sistema tampão Tris-citrato, pH 6,9 da cuba e pH 7,1 do gel. Migração nos sentidos indicados.

Para fosfoglicose isomerase foram detectados antes e após a aplicação dos extratos vegetais uma única zona de atividade, eletronegativa, denominada de PGI1. O perfil antes da aplicação dos extratos vegetais foi monomórfico em todas as espécies analisadas apresentando o alelo PGI₁* 60 para *P. capitis*.

O perfil depois da aplicação apresentou fenótipos de heterozigotos em algumas espécies analisadas. Há uma diferença de intensidade de coloração entre as bandas do teste fumigante e repelente sendo este último compreendido de bandas mais claras.

Vale ressaltar, que os sistemas PGI e IDH estão sendo estudados pela primeira vez em *P. capitis*, sendo que os resultados acima corroboram parcialmente aos observados por BORGES, 2005 estudando sete espécies pertencentes ao gênero *Anopheles*.

5.1.2) ISOCITRATO DESIDROGENASE

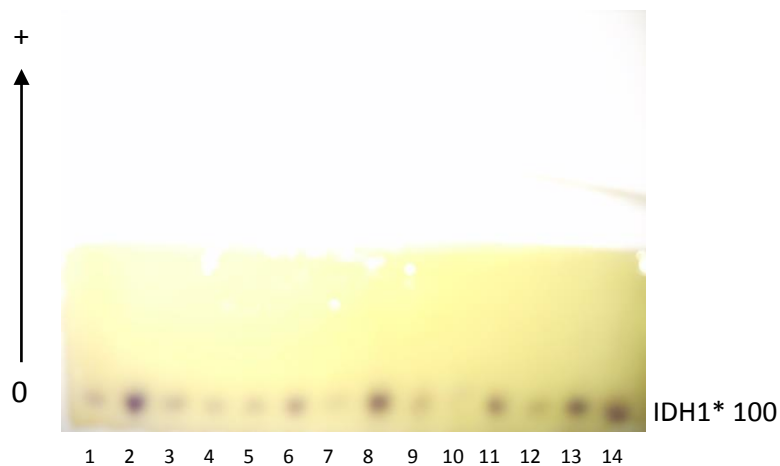


Figura 03 – Padrão eletroforético para isocitrato desidrogenase em indivíduos adultos de *Pediculus capitis* (1 a 12) antes da aplicação de extratos vegetais e para controle larvas do quarto estágio de *Anopheles darlingi* (13 e 14) Eletroforese em gel de amido. Sistema tampão Tris-citrato-borato, pH 8,0. Migração nos sentidos indicados.

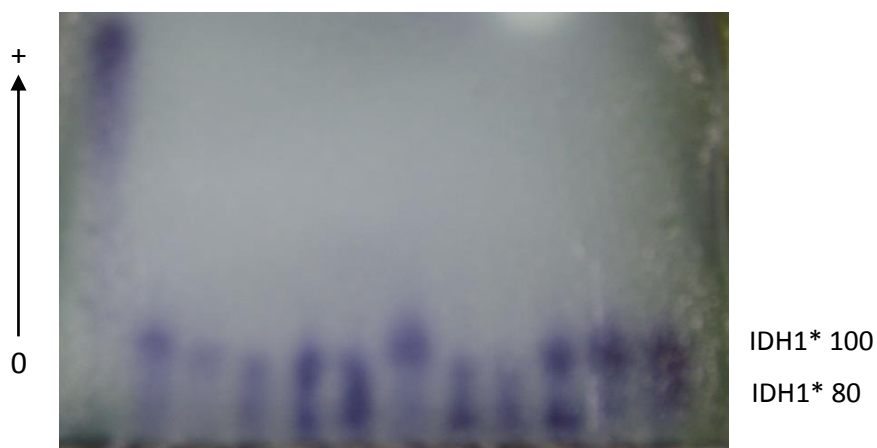


Figura 04 – Padrão eletroforético para isocitrato desidrogenase em indivíduos adultos de *Pediculus capitis* após aplicação de extratos vegetais submetidos ao teste repelente (3 a 7) e ao teste fumigante (8 a 12) e para controle larvas de quarto estágio de *Anopheles darlingi* (1 e 2). Eletroforese em gel de amido. Sistema tampão Tris-citrato-borato, pH 8,0. Migração nos sentidos indicados.

A estimativa dos perfis eletroforéticos detectados para o sistema IDH tanto antes quanto depois da aplicação de extratos vegetais foram constituídos de uma zona de atividade, eletronegativa, denominada de IDH1. Para o perfil antes da aplicação dos extratos vegetais a região foi monomórfica e codificada pelo alelo *IDH1*.

Para o perfil após a aplicação dos extratos vegetais foi observado uma região de atividade, com variação observada sugerindo que esta região é controlada por um loco com 3 alelos dominantes IDH1* A, IDH1* B e IDH1* C. Foram observados indivíduos heterozigotos IDH1 BC, com exceção das amostras 3 e 7. Não foi observada diferença na intensidade de coloração das bandas.

Dados para outros insetos estudando o sistema IDH concordam parcialmente com os resultados apresentados acima, segundo SANTOS 1992, foi observado em larvas de 4º estágio de *A. darlingi* um padrão eletroforético constituído de duas regiões de atividade enzimática denominadas IDH 1 e IDH2. A variação observada pela autora sugere que esta região é controlada por um loco com 3 alelos dominantes IDH1* A, IDH1* B e IDH1* C. Os indivíduos heterozigotos IDH1 AB, IDH1 AC e IDH1 BC, apresentam seus fenótipos constituídos por 3 bandas, sugerindo que a enzima possa ser dimérica.

5.1.3) FOSFOGLICOMUTASE

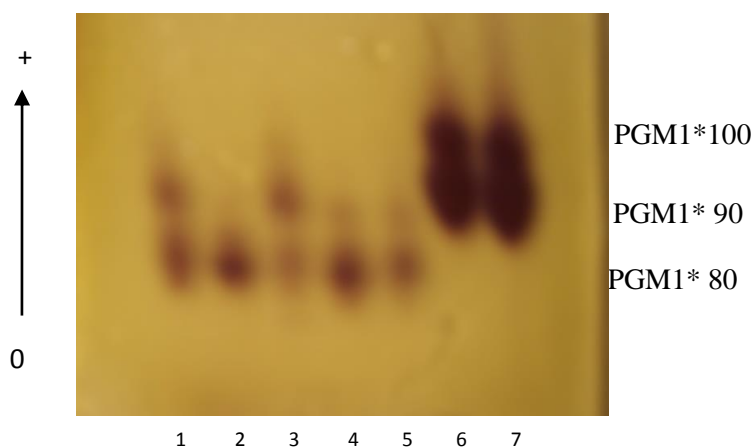


Figura 05 – Padrão eletroforético da fosfoglicomutase de indivíduos adultos de *Pediculus capitis* (1 a 5)) antes da aplicação de extratos vegetais e para controle larvas do quarto estágio de *Anopheles darlingi* (6 e 7). Eletroforese em gel de amido-agarose. Sistema tampão TEMM pH 7,4. Migração nos sentidos indicados.

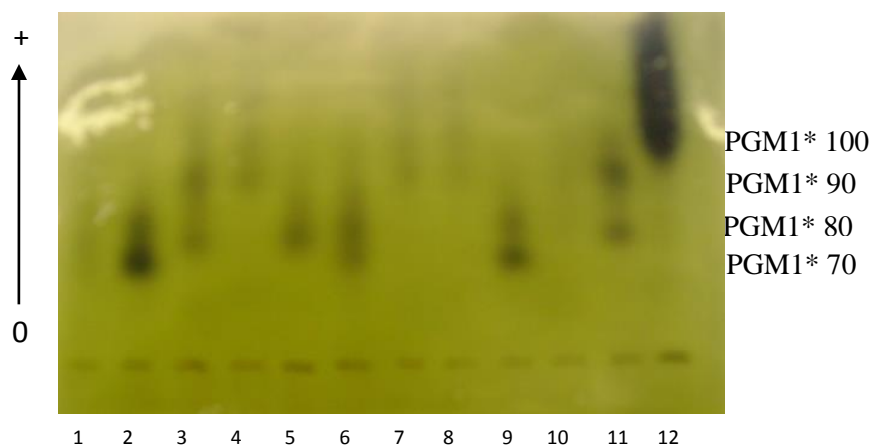


Figura 06 – Padrão eletroforético para fosfoglicomutase em indivíduos adultos de *Pediculus capitis* após aplicação de extratos vegetais (1 a 10) submetidos no teste repelente (6 a 10) e fumigante (1 a 5). Eletroforese em gel de amido-agarose. Sistema tampão TEMM pH 7,4. Migração nos sentidos indicados.

Os padrões eletroforéticos detectados para fosfoglicomutase antes e após a aplicação dos extratos vegetais foram de única zona de atividade, eletronegativa, denominada de PGM1. Os indivíduos heterozigotos para o loco antes da aplicação dos extratos vegetais mostraram um fenótipo constituído por duas bandas com igual intensidade de coloração, sugerindo estrutura monomérica a cada proteína. A variação observada sugere que esta região é controlada geneticamente pelos alelos: PGM1 * 100, PGM* 90 e PGM1 * 80.

Em relação ao loco após a aplicação das amostras os indivíduos apresentaram fenótipos de heterozigotos com intensidades diferentes de coloração, sendo que para alguns indivíduos as bandas foram muito claras ou ausente (uma banda do teste repelente). A variação observada sugere que esta região é controlada geneticamente pelo loco PGM1 com dois alelos dominantes: PGM1 * 100 e PGM1 * 80.

Os dados obtidos por AMEVIGBE *et al.*, 2000 corroboram com o presente trabalho para o sistema PGM.

5.1.4) ENZIMA MÁLICA

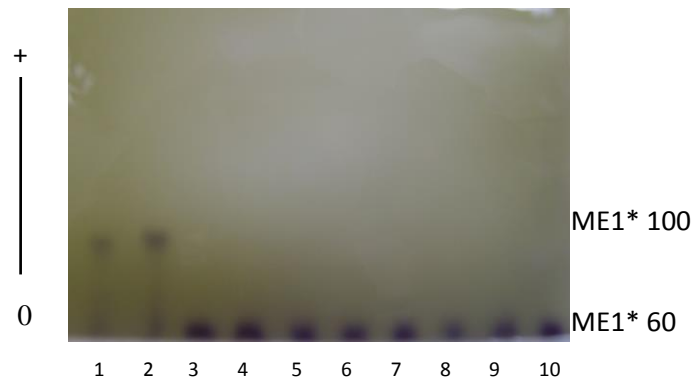


Figura 07 – Padrão eletroforético da enzima málica de indivíduos adultos de *Pediculus capitis* (3 a 10)) antes da aplicação de extratos vegetais e para controle larvas do quarto estágio de *Anopheles darlingi* (1 e 2). Eletroforese em gel de amido Sistema tampão Tris-citrato, pH 6,9 da cuba e pH 7,1 do gel. Migração nos sentidos indicados.

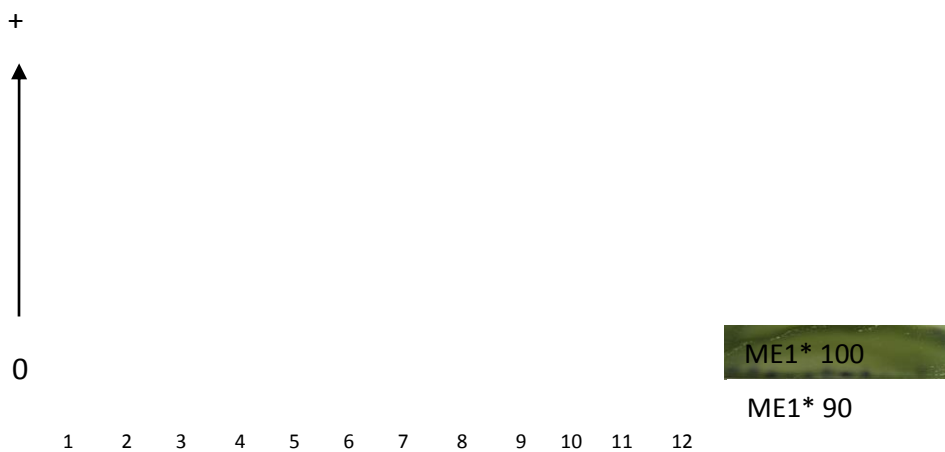


Figura 08 – Padrão eletroforético para enzima málica em indivíduos adultos de *Pediculus capitis* após aplicação de extratos vegetais (3 a 12) submetidos no teste repelente (3 a 7) e fumigante (8 a 12). Eletroforese em gel de amido. Sistema tampão Tris-citrato, pH 6,9 da cuba e pH 7,1 do gel. Migração nos sentidos indicados.

Os perfis eletroforéticos detectados para a enzima málica antes e após a aplicação dos extratos vegetais constituíram de uma única região de atividade, eletronegativa, denominada ME1, ambos de coloração moderada a clara. A ME antes da aplicação dos extratos foi monomórfica em todas as espécies analisadas, apresentando o alelo ME_1^*60 para *Pediculus capitis*. Quanto à intensidade de coloração das bandas, foi observada uma intensa coloração.

A ME depois da aplicação dos extratos também foi monomórfica, porém para as amostras 9 e 10 foi detectado ausência de banda. A respeito da intensidade de coloração das bandas, foram verificadas bandas mais claras.

O resultado acima para ME, concorda parcialmente aos observados por BORGES, 2005 onde o perfil eletroforético de ME foi constituído de uma única região de atividade enzimática, eletronegativa, denominada ME1. Tal região é controlada geneticamente pelo loco ME1, que também foi monomórfico para o alelo em questão $ME1^*100$.

Após a análise de todas as estimativas do perfil isoenzimático para *P. capitis*, notou-se que a aplicação dos extratos vegetais em indivíduos de *P. capitis* pode ter interferido na atividade das enzimas analisadas, devido em alguns sistemas ter sido observada a diminuição da intensidade de coloração das bandas e a ausência de bandas.

Vale ressaltar, que a maior parte dos sistemas isoenzimáticos abordados neste trabalho, foram estudados pela primeira vez em adultos de *P. capitis*. Portanto, foram utilizados em torno 7 meses para sua padronização e por isso não foi possível finalizar as análises de todos sistemas isoenzimáticos após a aplicação dos extratos como proposto no primeiro projeto submetido ao PIBIC. Apesar do término do período da bolsa, a aluna se comprometeu a continuar fazendo as análises isoenzimáticas. Abaixo o resultado e a discussão dos sistemas feitos antes da aplicação dos extratos vegetais.

Esterase

Os perfis eletroforéticos da esterase (Figura 9) apresentaram a ocorrência de duas zonas de atividade eletronegativa denominadas EST1 e EST2. A primeira, denominada Esterase 1 não apresentou variação, foi monomórfica sendo codificada pelo alelo EST 1. A segunda também não apresentou variação sendo codificada pelo alelo EST2.

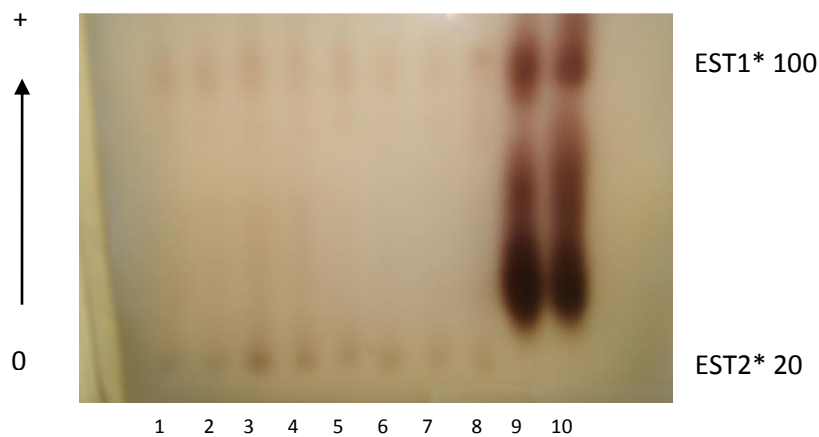


Figura 09 – Padrão eletroforético da esterase de indivíduos adultos de *Pediculus capitis* (1 a 8) antes da aplicação dos extratos vegetais e larvas no quarto estágio de *Anopheles darlingi* (9 e 10) antes da aplicação da tintura composta. Eletroforese em gel de amido. Sistema tampão Tris-citrato-borato, pH 8,0. Migração nos sentidos indicados.

Segundo dados de Amevigbe *et al* 2000 os perfis de atividades para EST revelaram 4 zonas de atividade (EST1, EST2, EST3 e EST4), EST3 apresentou um loco codificado pelos alelos: *a, b, c e d*. Os resultados referidos acima corroboram parcialmente com estudos realizados para outros insetos, Maia & Santos, 1999 ao estudarem perfis isoenzimáticos para EST em *Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis*, verificaram a existência de 4 regiões de atividades muito complexas, todas eletronegativas. Dessas, apenas EST1 não apresentou variação. O controle genético para locos EST2 e EST3 foi determinado por 2 alelos *EST2* A e EST2 *B; EST3*A e EST3* B*, respectivamente. Enquanto para o loco EST4 foram identificados 4 alelos *EST4* A, EST4* B, EST4* C e EST4* D*.

Hexoquinase.

O padrão eletroforético para a hexoquinase constituiu de uma única região de atividade, eletronegativa, denominada HK1 (Figura 10). A HK foi monomórfica, apresentando o alelo *HK1* 30* para *P. capitis*. A HK1 apresentou uma única banda de atividade de coloração moderada, codificada por um loco e controlada pelo alelo *HK1* 30*. Os dados referidos acima corroboram parcialmente para o loco HKI aos observados por BORGES, 2005 ao estudar espécies de anofelinos utilizando o mesmo sistema enzimático.

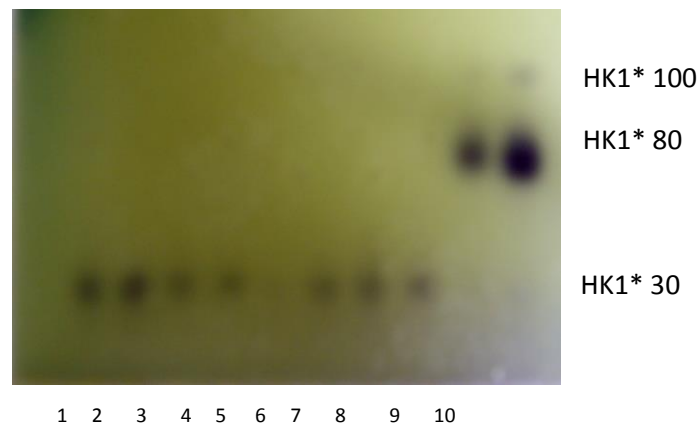


Figura 10 – Padrão eletroforético da hexoquinase de indivíduos adultos de *Pediculus capitis* (1 a 8) e para controle larvas de quarto estágio de *Anopheles darlingi* (9 e 10) . Eletroforese em gel de amido. Sistema tampão Tris-citrato, pH 6,9 da cuba e pH 7,1 do gel. Migração nos sentidos indicados.

Malato desidrogenase

O perfil eletroforético detectado para a malato desidrogenase foi constituída de uma única região de atividade, eletronegativa, denominada MDH1 (Figura 11). A MDH foi monomórfica em todas as espécies analisadas, apresentando o alelo *MDH₁*30* para *P. capitis*. O resultado referido acima, corrobora parcialmente aos observados por BORGES, 2005 onde o perfil eletroforético da malato desidrogenase foi constituído de uma única região de atividade enzimática, eletronegativa, denominada MDH1. A MDH1 foi codificada por um loco e controlada pelo alelo *MDH*100* nas populações de *A. triannulatus*, *A. albitarsis* de Macapá, *A. darlingi* de Timbozinho e de *A. intermedius*

de Pacoval, sendo o alelo *MDH1*112* na população de *A. albirtasis* de Boa Vista, *A. darlingi* de Coari e Macapá, *A. nuneztovari* e *A. benarrochi* da Bolívia e de Ji-Paraná. O alelo *MDH1*95* foi observado nas populações de *A. albitarsis* de Maruanum, *A. rangeli*, *A. oswaldi*, *A. nuneztovari* e *A. mattogrossensis*.

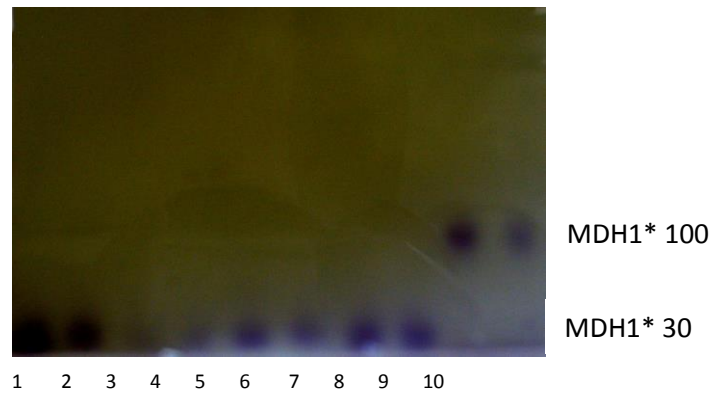


Figura 11 – Padrão eletroforético da malato desidrogenase de indivíduos adultos de *Pediculus capitis* (1 a 8) e para controle larvas do quarto estágio de *Anopheles darlingi* (9 e 10). Eletroforese em gel de amido. Sistema tampão Tris-citrato, pH 6,9 da cuba e pH 7,1 do gel. Migração nos sentidos indicados.

5.2 TESTES REPELENTE E FUMIGANTE

5.2 Testes Repelente e Fumigante

5.2.1 Teste repelente

Tabela 02- Teste repelente utilizando extratos vegetais contra *Pediculus capitis*. (primeiro experimento).

Placa	B	A	G	Ál	Ág	CP
T0	0,0,0 (0%)	0,0,0 (0%)	0,0,0 (0%)	0,0,0 (0%)	0,0,0 (0%)	3,3,3(100%)
T1	2,0,0(22,2%)	3,3,3(100%)	0,0,0 (0%)	0,0,1(11,1%)	0,0,2(22,2%)	3,3,3(100%)
T2	3,0,0(33,3%)	3,3,3(100%)	0,0,0 (0%)	2,1,3(66,6%)	0,1,3(44,4%)	3,3,3(100%)
T3	2,1,1(44,4%)	3,3,3(100%)	0,0,0 (0%)	2,2,3(77,7%)	0,2,3(55,5%)	3,3,3(100%)
T4	2,2,1(55,5%)	3,3,3(100%)	0,0,0 (0%)	3,2,3(88,8%)	0,3,3(66,6%)	3,3,3(100%)
T5	2,2,1(44,4%)	3,3,3(100%)	0,0,1(11,1%)	3,2,2(88,8%)	0,3,3(66,6%)	3,3,3(100%)
T6	2,2,1(44,4%)	3,3,3(100%)	0,0,1 (11,1%)	3,2,3(88,8%)	0,3,2(55,5%)	3,3,3(100%)
T7	2,2,1(44,4%)	3,3,3(100%)	0,0,1 (11,1%)	3,2,3 (88,8%)	0,3,2 (55,5%)	3,3,3(100%)
T8	2,2,1(44,4%)	3,3,3(100%)	0,0,1 (11,1%)	3,2,3 (88,8%)	0,3,2 (55,5%)	3,3,3(100%)
T9	2,2,1(44,4%)	2,3,3(88,8%)	1,1,1(33,3%)	2,2,3(77,7%)	0,3,3(66,6%)	3,3,3(100%)
T10	2,2,1(44,4%)	3,3,2(88,8%)	1,1,1 (33,3%)	3,2,3 (88,8%)	0,3,3 (66,6%)	3,3,3(100%)
T11	2,2,1(44,4%)	2,3,3(88,8%)	1,1,1 (33,3%)	3,2,3 (88,8%)	0,3,3 (66,6%)	3,3,3(100%)
T12	3,2,1(55,5%)	3,3,3(100%)	1,1,1 (33,3%)	3,2,3 (88,8%)	0,3,3 (66,6%)	3,3,3(100%)

B- fruta-do-conde, A- arruda, G- graviola, Ál- álcool, Ag- água, CP- Controle Positivo (Permetrina 99%). Teste realizado em triplicata (3 piolhos adultos/ placa/ extrato vegetal). Controles negativos (Al e Ag). 0 = 0 de mortalidade.

Tabela 03- Teste repelente utilizando extratos vegetais contra *Pediculus capitis* (segundo experimento).

Placa	B	A	G	Ál	Ág	CP
T0	0,0,0 (0%)	3,1,1(55,5%)	2,1,1(44,4%)	1,1,0(22,2%)	1,1,0(22,2%)	3,3,3(100%)
T1	0,0,0 (0%)	3,1,1(55,5%)	2,1,1(44,4%)	2,3,1(66,6%)	1,1,2(55,5%)	3,3,3(100%)
T2	0,0,0 (0%)	3,1,1(55,5%)	2,1,2(55,5%)	3,3,1(77,7%)	3,2,2(77,7%)	3,3,3(100%)
T3	0,0,1(11,1%)	3,1,1(55,5%)	2,1,2(55,5%)	3,3,1(77,7%)	3,2,2(77,7%)	3,3,3(100%)
T4	0,0,1(11,1%)	3,1,1(55,5%)	2,1,2(55,5%)	3,3,1(77,7%)	3,2,2(77,7%)	3,3,3(100%)
T5	0,0,1(11,1%)	3,1,1(55,5%)	2,1,2(55,5%)	3,3,1(77,7%)	3,2,3(88,8%)	3,3,3(100%)
T6	0,0,1(11,1%)	3,1,1(55,5%)	2,1,2(55,5%)	3,3,1(77,7%)	3,2,3(88,8%)	3,3,3(100%)
T7	0,0,1(11,1%)	3,1,1(55,5%)	2,1,2(55,5%)	3,3,1(77,7%)	3,2,3(88,8%)	3,3,3(100%)
T8	0,0,1(11,1%)	3,1,1(55,5%)	2,1,2(55,5%)	3,3,1(77,7%)	3,2,3(88,8%)	3,3,3(100%)
T9	0,0,1(11,1%)	3,1,1(55,5%)	2,1,2(55,5%)	3,3,1(77,7%)	3,2,3(88,8%)	3,3,3(100%)
T10	0,0,1(11,1%)	3,1,1(55,5%)	2,2,2(66,6%)	3,3,1(77,7%)	3,2,3(88,8%)	3,3,3(100%)
T11	0,0,1(11,1%)	3,1,1(55,5%)	2,2,2(66,6%)	3,3,2(88,8%)	3,2,3(88,8%)	3,3,3(100%)
T12	0,0,1(11,1%)	3,1,1(55,5%)	2,2,2(66,6%)	3,3,1(77,7%)	3,2,3(88,8%)	3,3,3(100%)

B- fruta-do-conde, A- arruda, G- graviola, Ál- álcool, Ag- água, CP- Controle Positivo (Permetrina 99%). Teste realizado em triplicata (3 piolhos adultos/ placa/ extrato vegetal). Controles negativos (Al e Ag). 0 = 0 de mortalidade.

Tabela 04- Teste repelente utilizando extratos vegetais contra *Pediculus capitis*. (quarto experimento).

Placa	B	A	G	Ál	Ág	P
T0	2,2,1(55,5%)	0,1,0(11,1%)	1,1,0(22,2%)	0,0,0 (0%)	0,0,0 (0%)	3,3,3(100%)
T1	2,3,1(66,6%)	0,2,0(22,2%)	2,2,1(55,5%)	1,1,0(22,2%)	2,0,0(22,2%)	3,3,3(100%)
T2	2,3,1(66,6%)	0,2,0(22,2%)	2,2,1(55,5%)	1,3,0(44,4%)	2,0,0(22,2%)	3,3,3(100%)
T3	2,3,1(66,6%)	0,2,1(33,3%)	3,1,1(55,5%)	1,3,2(66,6%)	2,0,0(22,2%)	3,3,3(100%)
T4	2,3,1(66,6%)	0,2,1(33,3%)	3,1,1(55,5%)	1,3,2(66,6%)	2,1,0(33,3%)	3,3,3(100%)
T5	3,3,2(88,8%)	0,2,1(33,3%)	3,1,1(55,5%)	1,3,2(66,6%)	2,1,0(33,3%)	3,3,3(100%)
T6	3,3,3(100%)	0,2,1(33,3%)	3,1,1(55,5%)	1,3,2(66,6%)	2,2,0(44,4%)	3,3,3(100%)
T7	3,3,3(100%)	0,2,1(33,3%)	3,1,1(55,5%)	1,3,2(66,6%)	2,2,0(44,4%)	3,3,3(100%)
T8	3,3,3(100%)	0,2,1(33,3%)	3,1,1(55,5%)	1,3,3(77,7%)	2,2,0(44,4%)	3,3,3(100%)
T9	3,3,3(100%)	1,2,1(44,4%)	3,1,1(55,5%)	1,3,3(77,7%)	2,2,1(55,5%)	3,3,3(100%)
T10	3,3,3(100%)	1,2,1(44,4%)	3,1,1(55,5%)	1,3,3(77,7%)	2,2,1(55,5%)	3,3,3(100%)
T11	3,3,3(100%)	1,2,1(44,4%)	3,1,1(55,5%)	1,3,3(77,7%)	2,2,1(55,5%)	3,3,3(100%)
T12	3,3,3(100%)	1,2,1(44,4%)	3,1,1(55,5%)	1,3,3(77,7%)	2,2,0(44,4%)	3,3,3(100%)

B- fruta-do-conde, A- arruda, G- graviola, Ál- álcool, Ag- água, CP- Controle Positivo (Permetrina 99%). Teste realizado em triplicata (3 piolhos adultos/ placa/ extrato vegetal). Controles negativos (Al e Ag). 0 = 0 de mortalidade.

Tabela 05- Teste repelente utilizando extratos vegetais contra *Pediculus capitis*. (quarto experimento).

Placa	B	A	G	CP
T0	1,1,1(33,3%)	1,2,0(33,3%)	0,0,0 (0%)	3,3,3(100%)
T1	1,2,1(44,4%)	1,2,3(66,6%)	0,0,2(22,2%)	3,3,3(100%)
T2	2,2,1(55,5%)	1,2,3(66,6%)	0,0,2(22,2%)	3,3,3(100%)
T3	2,2,1(55,5%)	1,2,3(66,6%)	1,0,2 (33,3%)	3,3,3(100%)
T4	2,2,1(55,5%)	2,2,3(77,7%)	1,0,2 (33,3%)	3,3,3(100%)
T5	2,2,1(55,5%)	2,2,3(77,7%)	1,0,3(44,4%)	3,3,3(100%)
T6	2,2,1(55,5%)	2,2,3(77,7%)	1,0,3(44,4%)	3,3,3(100%)
T7	2,2,1(55,5%)	2,2,3(77,7%)	2,0,3 (55,5%)	3,3,3(100%)
T8	2,2,1(55,5%)	2,2,3(77,7%)	2,0,3 (55,5%)	3,3,3(100%)
T9	2,2,1(55,5%)	2,2,3(77,7%)	1,0,3(44,4%)	3,3,3(100%)
T10	2,2,1(55,5%)	2,2,3(77,7%)	1,1,3 (55,5%)	3,3,3(100%)
T11	2,2,1(55,5%)	2,2,3(77,7%)	1,1,3 (55,5%)	3,3,3(100%)
T12	2,2,1(55,5%)	2,2,3(77,7%)	1,2,3 (66,6%)	3,3,3(100%)

B- fruta-do-conde, A- arruda, G- graviola, Al- álcool, Ag- água, CP- Controle Positivo (Permetrina 99%). Teste realizado em triplicata (3 piolhos adultos/ placa/ extrato vegetal). Controles negativos (Al e Ag). 0 = 0 de mortalidade.

Os extratos vegetais constituídos de arruda, graviola e fruta do conde apresentaram ação repelente. No entanto, não apresentaram ação fumigante contra *P. capitis*. Não há registros na literatura de testes repelentes com utilização dos mesmos extratos testados no presente estudo. No entanto, Toloza *et al* 2006, observando a atividade repelente contra *P. capitis* verificaram uma alta atividade para a lavanda e o

dodecalactone, em relação aos outros óleos essenciais como o de eucalipto utilizados no trabalho.

5.2.2 Teste Fumigante.

Tabela 06- Teste fumigante utilizando extratos vegetais contra *Pediculus capitis*. (segundo experimento).

Placa	GA	GB	GC	CP	CN
T0	0,0,0 (0%)	0,0,0 (0%)	0,0,0 (0%)	3,3,3(100%)	0,0,0 (0%)
T1	0,0,0 (0%)	0,0,0 (0%)	0,0,0 (0%)	3,3,3(100%)	0,0,0 (0%)
T2	0,0,0 (0%)	0,0,0 (0%)	0,0,0 (0%)	3,3,3(100%)	0,0,0 (0%)
T3	0,0,0 (0%)	0,0,0 (0%)	0,0,0 (0%)	3,3,3(100%)	0,0,0 (0%)
T4	0,0,0 (0%)	0,0,0 (0%)	0,0,0 (0%)	3,3,3(100%)	0,0,0 (0%)
T5	0,0,0 (0%)	0,0,0 (0%)	0,0,0 (0%)	3,3,3(100%)	0,0,0 (0%)
T6	0,0,0 (0%)	0,0,0 (0%)	0,0,0 (0%)	3,3,3(100%)	0,0,0 (0%)
T7	0,0,0 (0%)	0,0,0 (0%)	0,0,0 (0%)	3,3,3(100%)	0,0,0 (0%)
T8	0,0,0 (0%)	0,0,0 (0%)	0,0,0 (0%)	3,3,3(100%)	0,0,0 (0%)
T9	0,0,0 (0%)	0,0,0 (0%)	0,0,0 (0%)	3,3,3(100%)	0,0,0 (0%)
T10	0,0,0 (0%)	0,0,0 (0%)	0,0,0 (0%)	3,3,3(100%)	0,0,0 (0%)
T11	0,0,0 (0%)	0,0,0 (0%)	0,0,0 (0%)	3,3,3(100%)	0,0,0 (0%)
T12	0,0,0 (0%)	0,0,0 (0%)	0,0,0 (0%)	3,3,3(100%)	0,0,0 (0%)

GA- extrato arruda (20 µl), GB- extrato fruta-do-conde(20 µl), GC- extrato graviola(20 µl). CP = controle positivo 20 µl (solução 25g de deltametrina/(100%)0 mL do veiculo q.s.p). CN = controle negativo (água). Teste em triplicata (3 piolhos adultos/ placa/ extrato vegetal). 0 = 0 de mortalidade.

Tabela 07- Teste fumigante utilizando extratos vegetais contra *Pediculus capitis*. (segundo experimento).

Placa	A - 20 µl	G - 20 µl	B - 20 µl	CP	CN
T0	0,0,0 (0%)	0,0,0 (0%)	0,0,0 (0%)	3,3,3(100%)	0,0,0 (0%)
T1	0,0,0 (0%)	0,0,0 (0%)	0,0,0 (0%)	3,3,3(100%)	0,0,0 (0%)
T2	0,0,0 (0%)	0,0,0 (0%)	0,0,0 (0%)	3,3,3(100%)	0,0,0 (0%)
T3	0,0,0 (0%)	0,0,0 (0%)	0,0,0 (0%)	3,3,3(100%)	0,0,0 (0%)
T4	0,0,0 (0%)	0,0,0 (0%)	0,0,0 (0%)	3,3,3(100%)	0,0,0 (0%)
T5	0,0,0 (0%)	0,0,0 (0%)	0,0,0 (0%)	3,3,3(100%)	0,0,0 (0%)
T6	0,0,0 (0%)	0,0,0 (0%)	0,0,0 (0%)	3,3,3(100%)	0,0,0 (0%)
T7	0,0,0 (0%)	0,0,0 (0%)	0,0,0 (0%)	3,3,3(100%)	0,0,0 (0%)
T8	0,0,0 (0%)	0,0,0 (0%)	0,0,0 (0%)	3,3,3(100%)	0,0,0 (0%)
T9	0,0,0 (0%)	0,0,0 (0%)	0,0,0 (0%)	3,3,3(100%)	0,0,0 (0%)
T10	0,0,0 (0%)	0,0,0 (0%)	0,0,0 (0%)	3,3,3(100%)	0,0,0 (0%)
T11	0,0,0 (0%)	0,0,0 (0%)	0,0,0 (0%)	3,3,3(100%)	0,0,0 (0%)
T12	0,0,0 (0%)	0,0,0 (0%)	0,0,0 (0%)	3,3,3(100%)	0,0,0 (0%)

GA- extrato arruda (20 µl), GB- extrato fruta-do-conde(20 µl), GC- extrato graviola(20 µl). CP = controle positivo 20 µl (solução 25g de deltametrina/(100%)0 mL do veiculo q.s.p). CN = controle negativo (água). Teste em triplicata (3 piolhos adultos/ placa/ extrato vegetal). 0 = 0 de mortalidade.

Tabela 08- Teste repelente utilizando extratos vegetais contra *Pediculus capitis*. (terceiro experimento).

Placa	A - 20 µl	G - 20 µl	B - 20 µl	CP	CN
T0	0,0,0 (0%)	0,0,0 (0%)	0,0,0 (0%)	3,3,3(100%)	0,0,0 (0%)
T1	0,0,0 (0%)	0,0,0 (0%)	0,0,0 (0%)	3,3,3(100%)	0,0,0 (0%)
T2	0,0,0 (0%)	0,0,0 (0%)	0,0,0 (0%)	3,3,3(100%)	0,0,0 (0%)
T3	0,0,0 (0%)	0,0,0 (0%)	0,0,0 (0%)	3,3,3(100%)	0,0,0 (0%)
T4	0,0,0 (0%)	0,0,0 (0%)	0,0,0 (0%)	3,3,3(100%)	0,0,0 (0%)
T5	0,0,0 (0%)	0,0,0 (0%)	0,0,0 (0%)	3,3,3(100%)	0,0,0 (0%)
T6	0,0,0 (0%)	0,0,0 (0%)	0,0,0 (0%)	3,3,3(100%)	0,0,0 (0%)
T7	0,0,0 (0%)	0,0,0 (0%)	0,0,0 (0%)	3,3,3(100%)	0,0,0 (0%)
T8	0,0,0 (0%)	0,0,0 (0%)	0,0,0 (0%)	3,3,3(100%)	0,0,0 (0%)
T9	0,0,0 (0%)	0,0,0 (0%)	0,0,0 (0%)	3,3,3(100%)	0,0,0 (0%)
T10	0,0,0 (0%)	0,0,0 (0%)	0,0,0 (0%)	3,3,3(100%)	0,0,0 (0%)
T11	0,0,0 (0%)	0,0,0 (0%)	0,0,0 (0%)	3,3,3(100%)	0,0,0 (0%)
T12	0,0,0 (0%)	0,0,0 (0%)	0,0,0 (0%)	3,3,3(100%)	0,0,0 (0%)

GA- extrato arruda (20 µl), GB- extrato fruta-do-conde(20 µl), GC- extrato graviola(20 µl). CP = controle positivo 20 µl (solução 25g de deltametrina/(100%)0 mL do veiculo q.s.p). CN = controle negativo (água). Teste em triplicata (3 piolhos adultos/ placa/ extrato vegetal). 0 = 0 de mortalidade.

A respeito dos testes fumigantes, os dados das tabelas 6 a 8 indicaram que não foi observada atividade fumigante contra *P. capitis* utilizando extratos vegetais de graviola, fruta-do-conde e arruda. Há estudos como o de *Tolozza et al.*, 2006 onde foi verificado que os alifáticos “láticos” não mostraram atividade fumigante, comparado com eucalipto que foi mais efetivo do que lavanda e DDVP, tais resultados corroboram parcialmente com os apresentados no presente trabalho. No entanto, *Cestari et al* 2004,

ao observarem os cortes seccionados de adultos de *P. capitis* tratados com *Tagetes minuta* verificaram desarranjos dos filamentos de actina e miosina e conseqüente dissociação destas fibras quando comparadas com adultos não tratados. Outro trabalho realizado por Nascimento *et al* 2007, utilizando vários extratos vegetais em associação, foi observado uma maior ação letal contra adultos *P. capitis* às associações de Carqueija-Fumo (*Baccharis trimera* e *Nicotiana tabacum* respectivamente) e contra ninfas de *P. capitis*, a associação de Carqueija-Arruda (*Baccharis trimera* e *Ruta graveolens*). Estudo realizado por KOVALICZN *et al.*, 2009 demonstrou a ação piolhicida do extrato hidroglicólico de *Ruta graveolens* L contra *P. humanus capitis*.

Vale ressaltar, que os dados referidos nas tabelas ainda não foram submetidos às análises estatísticas, devido ao atraso na entrega por parte da empresa dos programas estatísticos adquiridos para tal finalidade.

6 – CONCLUSÃO

- a) O perfil eletroforético detectado para a maioria dos sistemas isoenzimáticos foi constituído de uma única região de atividade, eletronegativa e de coloração moderada. Sendo a região controlada geneticamente por um loco, com exceção do sistema esterase, apresentado variação no número de alelos por loco.
- b) Os resultados revelaram também embasamento para pesquisas futuras, com a finalidade de verificar a estrutura genética das populações de *Pediculus capitis* na região Amazônica.
- c) Os extratos vegetais constituídos de arruda, graviola e fruta do conde apresentaram ação repelente. No entanto, não apresentaram ação fumigante contra *P. capitis*.
- d) Após a comparação dos perfis isoenzimáticos antes e após a aplicação dos extratos vegetais em adultos de *P. capitis*, os extratos podem ter interferido na atividade das enzimas analisadas, devido em alguns sistemas ter sido observada a diminuição da intensidade de coloração das bandas e a ausência de bandas.

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMEVIBGE et al. Isoenzymes of human lice: *Pediculus humanus* and *P. capitis*. *Medical and Veterinary Entomology*. v. 14. p. 419-425, 2000.
- BARBOSA, J.V. et al. Estudo da Pediculose no Estado do Rio de Janeiro. I Bienal de Pesquisa da Fundação Oswaldo Cruz, p. 200, 1988.
- BORGES, R. et al. Prevalence and monthly distribution of head lice using two diagnostic procedures in several age groups in Uberlândia, State of Minas Gerais, Southeastern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.40, p.1 – 3, 2007
- BORGES, R. Diferenciação genética em espécies de *Anopheles* do subgênero *Nyssorhynchus* e *Anopheles* da Amazônia brasileira, com base em dados isoenzimáticos e DNA mitocondrial. 2005. 145p. Doutorado. INPA/UFAM, Manaus-Amazonas.
- BORGES, R; MENDES, J. Epidemiological aspects of head lice in children attending day care centres, urban and rural schools in Uberlândia, Central Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 97 (2), p.189-192, 2002.
- BORROR, J. D & DeLONG, D.M.. Introdução ao estudo dos insetos. USAID, Programa de Publicações Didáticas, 653p, 1969.
- BROGDON, R. Biochemical resistance detection. An alternative bioassay. *Parasitology Today*, v.5, p.56-60, 1989.
- BURGESS. I.F. Human Lice and their control. *Annu. Rev. Entomol.* v. 49, p.457-458, 2004.
- CARVALHO-PINTO, CJ, LOURENÇO-DE-OLIVEIRA R. Isoenzimatic analysis of four *Anopheles* (*Kertessia*) *bellator* Dyar & Knab (*Diptera: Culicidae*) populations. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.98 (8), p.1045-1048, 2003.
- CAZORLA D, RUIZ A, ACOSTA. M. Estudio clínico-epidemiológico sobre pediculosis capitis em escolares de Coro, estado Falcón, Venezuela. *Invest Clin* 2007;48:445-457.
- CESTARI, I. M. et al. Evaluation of the Potential Insecticide Activity of *Tagetes minuta* (*Asteraceae*) Essential Oil Against the Head Lice *Pediculus humanus capitis* (*Phthiraptera: Pediculidae*). *Scientific Note*, p. 805-807, 2004.
- CHOSIDOW, O., 2000. Scabies and Pediculose. *Lancet* 355 (9206): 819-826.

CUNHA PVS, PINTO ZT, LIBERAL EF, BARBOSA JV. The teachers' discourse on pediculosis transmission before an educational activity. *Rev Bras Crescimento Desenvolvimento Hum* 2008; 18: 298-307.

FARMACOPEIA Brasileira. 4 ed. São Paulo: Atheneu, 1988. Pt.1.

GILLOT, P; ANDRE, P. Characterization of fine esterases from *Listeria monocytogenes* and use of their electrophoretic polymorphism for strain typing. **Applied and Environmental Microbiology**. v.61, p. 1661-1665. 1995.

GUENTHER, E. The Essential Oils. Krieger Publishing Company, FL,1972.

HODJATI MH, MOUSAVI N, MOUSAVI M. Head lice infestation in school children of a low sócio-economy área of Tabriz city, Iran. *African J Biotech*. 2008;7:2292-2294.

KOVALICZN, R. A.; RISDEN, F. S.; DABUF, A. N. G. Avaliação inseticida contra *Pediculus humanus capitis* De Geer e de irritação cutânea aguda de soluções hidroglicólicas contendo *Ruta graveolens* L. **Rer. Bras. Farm.** v. 90(3). P. 201-203. 2009.

LINARDI, P.M. et al. Crendices e falsos conceitos que dificultam ações profiláticas contra o piolho e a pediculose "capitis". *Jornal de Pediatria*. v.64, p.248-255, 1988 b.

MAIA, J.F.; SANTOS, J.M.M. Padrões ontogenéticos das Esterases, Leucina Aminopeptidase e α - Glicerofosfato Desidrogenase em *Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis* Lynch-Arribáizaga, 1878 (Diptera: Culicidae). *Acta Amazônica*, v. 29(1): 135-144, 1999.

NARANG, S.K.; KLEIN, T.A.; PERERA, O.P.; LIMA, J.B.; TANG, A.T. Genetic evidence for the existence of cryptic species in the *Anopheles albitarsis* complex in Brazil: Allozymes and mitochondrial DNA restriction fragment length polymorphisms. *Biochem Gen*, 31: 97-112, 1993.

NASCIMENTO, R.A. et al. Determinação da eficácia de extratos vegetais de *Ruta graveolens*, *Bacharis trimera* e *Nicotiana tabacum* sobre *Pediculus capitis* (= *Pediculus humanus capitis*) De Geer, Pediculidae, Anoplura, Insecta. *Revista Eletrônica da Ulbra de São Jerônimo*. v. 01, 2007.

PASTEUR, N. et al. Manuel Technique de Génétique par Électrophorèse des Protéines. Lavoisier Paris, p.53-77, 1987.

PRIESTLEY, C.M.; BURGESS, I.; WILLIAMSON, E.M. Lethality of essential oil constituents towards the human louse, *Pediculus humanus*, and its eggs. *Fitoterapia*, 77, 303–306, 2006.

- RATHAUR, S. et al. *Setaria cervi*. Enzymes in microfilariae and in vitro action of antifilarials. *Zeitschrift fur Parasitenkunde*. v.68, p. 331-338, 1982.
- RICE, P.J. & COATS, J. Insecticidal properties of several monoterpenoids to the house fly (Diptera: Muscidae), red flour beetle (Coleoptera: Tenebrionidae), and Southern corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae). *Journal of Economic Entomology*, 87, 1172–1179, 1994.
- SANTOS, J.M.M. 1992. Variabilidade Genética em Populações Naturais de *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *darlingi* Root, 1926 (Diptera: Culicidae). 1992. 150p. Tese de Doutorado, INPA. FUA.
- SANTOS, J.M.M.; MAIA, J.F.; TADEI, W.P. Differentiation and genetic variability in natural populations of *Anopheles* (*N.*) *triannulatus* (Neiva& Pinto, 1922) of Brazilian Amazonia. *Braz. J. Biol.* 64:2. 327-336, 2004.
- SECOND, G; TROUSLOT, P. Electrophorèse d'enzymes de riz: technique d'électrophorèse en gel d'amidon appliquée à l'étude du polymorphisme de 14 enzymes du riz (*Oriza* sp). **Editions de L' ORSTOM. Collection Travaux et Documents**, Paris, France. v.120, p.1-88. 1980.
- SELANDER, R. K. et al. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Applied and Environmental Microbiology*. v.51, p.873-884, 1986.
- SINNIAH, B. et al. Epidemiology of *Pediculus humanus capitis* infestation in Malaysian school children. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.30, p.734-738, 1981.
- SLONKA, G. Epidemiology of outbreak of head lice in Georgia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. v.25, p. 739-743, 1976.
- STEINER, W.W.W.; JOSLYN, D. J. Eletroforetic techniques for the genetic study of mosquitoes, *Mosq. News*, 39(1): 35-54, 1979.
- SUTHERLAND, E. W. Activation of PGM by metal binding agents. *Journal of Biological Chemistry*. v.180, p.1279-1284. 1949.
- TOLOZA, A. C. et al. The fumigant and repellent activity of aliphatic lactones against *Pediculus humanus capitis* (Anophura: Pediculidae). *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. v.101(1), p.55-56, 2006.
- TOLOZA, A.; VASSENA, C.; GALLARDO, A.; GONZÁLEZ-AUDINO, P.; PICOLLO, M.I. Epidemiology of *Pediculosis capitis* in elementary schools of Buenos Aires, Argentina. *Parasitol Res*, v.104, p.1295-1298.2009.

