

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara

Flávia Benini da Rocha Silva

**Avaliação dos componentes de óleos essenciais 1,8-cineol, β -cariofileno e α -humuleno
como possíveis repelentes para *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera: Culicidae)**

Araraquara/SP

2014

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara

Flávia Benini da Rocha Silva

**Avaliação dos componentes de óleos essenciais 1,8-cineol, β -cariofileno e α -humuleno
como possíveis repelentes para *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera: Culicidae)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Curso de Graduação em Farmácia-
Bioquímica da Faculdade de Ciências
Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade
Estadual Paulista para obtenção do grau de
Farmacêutica-Bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra. Mara Cristina Pinto

Coorientador: Prof. Dr. André Gonzaga dos Santos

Araraquara/SP

2014

Às avós Leida e Rita, exemplos de força,
carinho e dedicação (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Maria Aparecida e Marcelo, por serem meus maiores exemplos e à minha família por todo o apoio e amor.

À Profa. Dra. Mara Cristina Pinto, orientadora e mentora, pelo tempo e pela paciência dedicados.

Ao Prof. Dr. André Gonzaga dos Santos pela credibilidade e colaboração durante a realização do projeto.

Aos voluntários pela disponibilidade em participar da realização do projeto.

Às companheiras de laboratório, Camila e Thais, pela amizade e por tornarem o trabalho sempre divertido.

Aos melhores amigos, Bianca, Carolina, Estela, Fernanda e Jhohann, por compartilharem comigo os melhores anos e pela amizade que levarei para sempre comigo.

Ao grupo PET (Programa de Educação Tutorial) por ter se tornado minha segunda família ao longo da graduação e principalmente ao tutor Prof. Dr. João Aristeu da Rosa, por todo o carinho, dedicação e ensinamentos transmitidos durante os dois anos e meio em que pude efetivamente fazer parte dessa família, embora sempre digam que “Uma vez petiano, sempre petiano!”.

SUMÁRIO

RESUMO.....	5
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	6
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	7
1. INTRODUÇÃO	8
2. OBJETIVOS	12
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
3.1. Estabelecimento e manutenção da colônia de <i>A. aegypti</i>	13
3.2. Substâncias.....	14
3.3. Avaliação de possível atividade repelente das substâncias	14
3.4. Ética	17
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
5. CONCLUSÕES	22
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23

RESUMO

Aedes aegypti, mosquito da família Culicidae responsável pela transmissão dos vírus da dengue, da febre amarela urbana e da febre *chikungunya*, apresenta grande proliferação em áreas urbanas das regiões tropicais e subtropicais, além de representar um fator de incômodo por causar alergias devido à inoculação dos componentes salivares durante o processo do repasto sanguíneo. Como forma de evitar os problemas causados por eles, o repelente mais usado e registrado comercialmente desde 1957 é o DEET (N,N-dietil-3-metilbenzamida ou N,N-dietil-*meta*-toluamida), que apesar de apresentar eficácia comprovada possui determinada toxicidade quando utilizado por crianças e por mulheres grávidas ou lactantes. Atualmente, grande parte dos estudos sobre novas substâncias repelentes envolvem óleos essenciais de plantas, principalmente por serem atóxicos, biodegradáveis, possuírem um preço mais acessível e uma ampla atividade contra diferentes espécies de mosquitos. Os terpenos 1,8-cineol, β -cariofileno e α -humuleno podem ser encontrados em óleos essenciais de uma grande variedade de plantas e apesar de dados da literatura mostrarem uma eficácia dessas substâncias como repelentes para outras espécies de insetos, até o presente momento não existem estudos que relacionam porcentagem de repelência ao longo do tempo para avaliar o potencial de repelência das mesmas para culicídeos. O presente estudo avaliou tais substâncias como possíveis repelentes para *A. aegypti*, utilizando o DEET como controle positivo. Para avaliar a eficácia do β -cariofileno foi utilizada a *BG-cage*, uma gaiola desenvolvida especificamente para testes de repelência onde o voluntário expõe um braço sob uma abertura coberta por uma tela onde os mosquitos pousam, mas não picam. Os testes foram repetidos a cada 30 minutos após a aplicação do produto por um tempo máximo de duas horas (seguindo a recomendação de reaplicação do produto comercial utilizado como controle positivo) ou foram encerrados caso a porcentagem de repelência fosse nula antes do tempo máximo. A partir dos resultados obtidos, nota-se que o controle positivo mostrou uma repelência considerável por cerca de 90 minutos (menos que o recomendado pelo fabricante), enquanto as três substâncias testadas mostraram uma queda já a partir de 30 minutos de teste, com o β -cariofileno chegando a uma porcentagem de repelência nula ao final do teste. Apesar das substâncias apresentarem uma atividade de repelência inicial, as substâncias mostraram-se fracos repelentes para *A. aegypti* quando comparadas ao DEET. Além disso, foi possível observar a diferença de respostas entre os voluntários participantes do estudo.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Distribuição global de países ou áreas de risco de transmissão da dengue, 2011 (WHO, 2013)	8
Figura 2. Fórmula estrutural do DEET	10
Figura 3. Fórmulas estruturais: (a) 1,8-cineol, (b) β -cariofileno e (c) α -humuleno	12
Figura 4. (a) Pote com ovos em água destilada, (b) potes para alimentação das larvas e (c) grânulos da ração de peixe Alcon® Gold Marin Sticks	13
Figura 5. (a) Gaiola para acondicionamento dos mosquitos adultos, (b) algodão com solução de glicose para alimentação e (c) pote para oviposição	14
Figura 6. (a) Vista geral da BG-cage e (b) vista da abertura onde os voluntários expõem o antebraço, com destaque para a tela na qual os mosquitos pousam	15
Figura 7. Médias das porcentagens de repelência para as substâncias testadas nos diferentes tempos	18
Figura 8. Porcentagens de repelência obtidas para as substâncias testadas para cada um dos voluntários nos diferentes tempos	21

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A.: *Aedes*

BG: *Biogents*

CAAE: Certificado de Apresentação para Apreciação Ética

CDC: Centers for Disease Control and Prevention

DEET: N,N-dietil-3-metilbenzamida ou N,N-dietil-*meta*-toluamida

EPA: Environmental Protection Agency

NCBI: National Center for Biotechnology Information

PAHO: Pan American Health Organization

PMD: *para*-metano-3,8-diol

SID: Substance Identification Number

TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

USA: United States of America

WHO: World Health Organization

1. INTRODUÇÃO

Dípteros hematófagos são importantes na transmissão de patógenos para seres humanos e animais, além de causarem alergias devido à inoculação dos componentes salivares durante o processo do repasto sanguíneo e de suas picadas representarem um fator de incômodo.

Dentro da família Culicidae, o *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) é amplamente distribuído pelo mundo, apresenta grande proliferação em áreas urbanas e está presente principalmente nas regiões tropicais e subtropicais. Além disso, é responsável pela transmissão dos vírus da dengue, da febre amarela urbana e da febre *chikungunya* (WHO, 2009a).

Estima-se que cerca de 50 milhões de pessoas no mundo são infectadas pelo vírus da dengue anualmente e aproximadamente 2,5 bilhões de pessoas vivem em países endêmicos, onde a doença apresenta um grande impacto econômico e social (WHO, 2009a) (Figura 1).

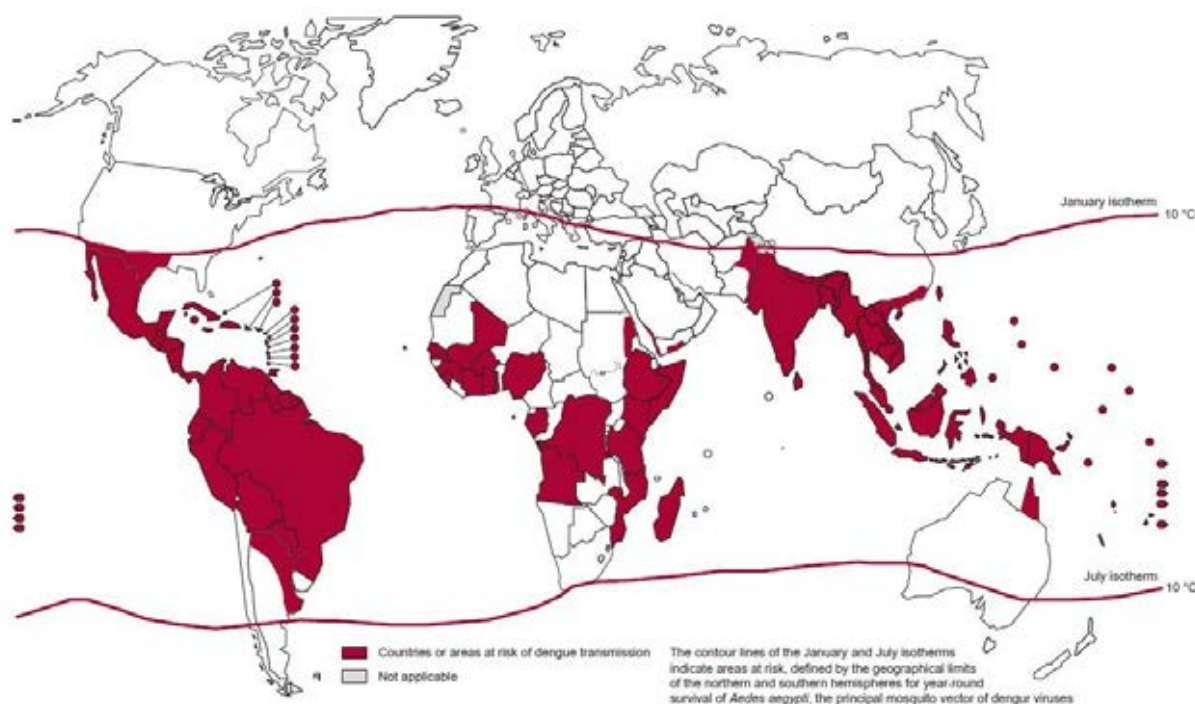


Figura 1. Distribuição global de países ou áreas de risco de transmissão da dengue, 2011 (WHO, 2013).

No continente americano, o *A. aegypti* está amplamente distribuído, ausente apenas no Canadá e no Chile, e cerca de 500 milhões de pessoas vivem em áreas com grande risco de serem infectadas pelo vírus da dengue (PAHO/WHO, 2014).

Até o dia 19 de dezembro de 2014 (semana epidemiológica 48), o Cone Sul da América, composto por Argentina, Brasil, Chile, Paraguai e Uruguai, apresentou 11.405 casos confirmados de dengue e 649 de dengue severa. Todos os casos somados resultaram em 382 mortes, sendo o Brasil (semana epidemiológica 41) responsável por 8.423 casos de dengue (73,85%), por 644 de dengue severa (99,22%) e por 377 mortes (98,69%) (PAHO, 2014).

Apesar de ser o país responsável por grande parte dos casos e das mortes por dengue, quando comparado ao ano de 2013 o Brasil apresentou em 2014 uma queda de 60% no número de casos registrados (Ministério da Saúde, 2015).

A febre amarela é uma doença endêmica nas áreas tropicais da América Latina e do continente africano. Com 90% dos casos ocorrendo na África, estima-se que cerca de 200 mil casos ocorram por ano, responsáveis por 30 mil mortes (WHO, 2014). Embora o Brasil seja considerado endêmico, a forma urbana da febre amarela encontra-se erradicada desde 1942 no país (Ministério da Saúde, 2014).

A febre *chikungunya* ocorre com maior frequência nos países da África, do sul da Europa, do sudeste da Ásia e nas ilhas dos oceanos Índico e Pacífico. No continente americano, o primeiro caso autóctone foi registrado no final do ano de 2013, na Ilha de Saint Martin, atingindo um total de 750 mil casos da doença no continente até o dia três de outubro de 2014 (CDC, 2014). De acordo com o Ministério da Saúde (2015), até o dia 22 de novembro de 2014 foram confirmados 1.425 casos autóctones e 71 casos importados de febre *chikungunya* no Brasil.

Como forma de evitar o contato do ser humano com mosquitos e diminuir a frequência das doenças transmitidas por eles, pode se utilizar mosquiteiros ou repelentes. Enquanto os

mosquiteiros consistem em meios físicos, os repelentes consistem em meios químicos de controle de doenças. Alguns mosquiteiros são associados com certos tipos de repelentes ou inseticidas. Muitas dessas substâncias têm seu tempo de eficácia aumentado quando aplicados sobre os mosquiteiros, uma vez que se aderem melhor ao tecido e possui uma redução na perda por evaporação ou absorção (ROZENDAAL, 1997). Apesar disso, os mosquitos podem vir a se tornarem resistentes a essas substâncias, como demonstrado por NORRIS & NORRIS (2011).

Para ser considerado um bom repelente para insetos, devem ser observadas certas características, tais como: possuir eficácia prolongada contra várias espécies, não ser irritante à pele, não apresentar um odor desagradável, não deixar resíduo oleoso na pele, ser resistente à água ou ao suor, ser inerte e estável quimicamente, ser viável economicamente, ser atóxico e apresentar um efeito com tempo de duração suficiente (KATZ et al., 2008).

Entre os repelentes, o mais eficaz e mais utilizado até hoje é o DEET (N,N-dietil-3-metilbenzamida ou N,N-dietil-*meta*-toluamida) (Figura 2), desenvolvido inicialmente em 1946 pelo exército norte americano para uso militar e registrado em 1957 para uso comercial. Atualmente, um total de 255 produtos contendo DEET em concentrações que variam entre quatro e 100% apresentam registro para comercialização, disponíveis em diferentes tipos de formulações (EPA, 1998).

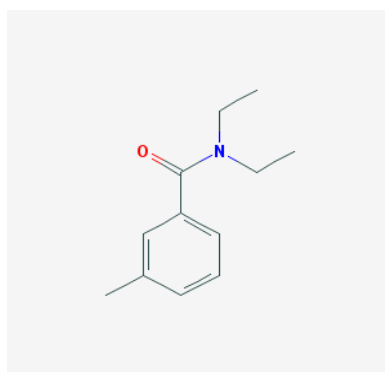


Figura 2. Fórmula estrutural do DEET. Retirada de <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> (SID: 53787871).

A eficácia de repelência do DEET está diretamente relacionada à concentração utilizada, no entanto, sua duração de ação atinge um platô a uma concentração de 50%. Mesmo com uma eficácia comprovada, o uso do DEET em crianças e em mulheres gestantes ou lactantes é limitado, uma vez que existem relatos de casos de toxicidade relacionados ao seu uso. Seus efeitos tóxicos estão relacionados à sua biodisponibilidade sistêmica, tendo em vista que em cerca de seis horas após a aplicação tópica do produto, entre 9-56% da dose aplicada aparecem na circulação (KOREN et al., 2003).

Apesar de o mecanismo de ação do DEET ser desconhecido, acredita-se que ele altera a função dos receptores presentes nas antenas dos mosquitos, embora não haja um consenso entre os pesquisadores a respeito (KAIN et al., 2013).

Além do DEET, outras substâncias apresentam registro para comercialização como repelente de insetos, tais como permetrina, picaridina (KBR 3023), óleo de citronela, IR3535 (etil butil acetil aminopropionato), MGK-326, MGK-264 e óleo de eucalipto citriodora (KATZ et al., 2008; EATON, 2009).

Apesar de alguns estudos buscarem atividade repelente de compostos químicos sintéticos, atualmente grande parte dos estudos sobre novas substâncias repelentes envolvem óleos essenciais de plantas, principalmente por sua atoxicidade, serem biodegradáveis, possuírem um preço mais acessível e uma ampla atividade contra diferentes espécies de mosquitos (KAMARAJ et al., 2011).

Os compostos escolhidos para o estudo, 1,8-cineol (Figura 3a), β -cariofileno (Figura 3b) e α -humuleno (Figura 3c), estão presentes nos óleos essenciais de uma ampla variedade de plantas.

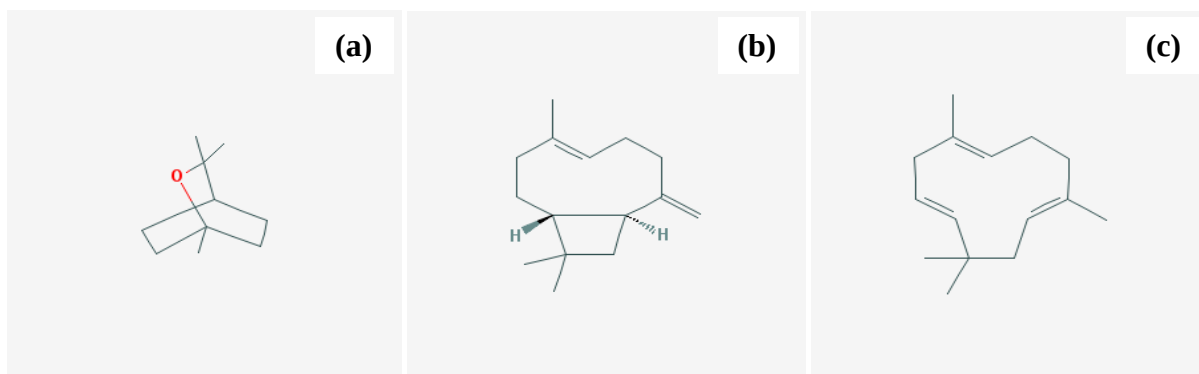


Figura 3. Fórmulas estruturais: (a) 1,8-cineol, (b) β -cariofileno e (c) α -humuleno. Retiradas de <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> (SID: 103618726, SID: 111978172 e SID: 53790475).

O 1,8-cineol, também conhecido como eucaliptol, é um éter cíclico e monoterpene, além de ser o principal componente do óleo de eucalipto (*Eucalyptus globulus* Labbil) (NCBI, 2014a). O β -cariofileno é um sesquiterpene bicíclico que pode ser encontrado em óleos essenciais de uma ampla variedade de plantas e geralmente apresenta-se como uma mistura de isômeros com isocariofileno e α -cariofileno (mais conhecido como α -humuleno) (NCBI, 2014b; NCBI, 2014c).

Dados da literatura mostram uma eficácia desses compostos como repelente para outras espécies de insetos, porém até o presente momento não existem estudos que relacionam porcentagem de repelência ao longo do tempo para avaliar o potencial de repelência das substâncias citadas para culicídeos, apenas estudos sobre atividade repelente de óleos essenciais que apresentam pequenas quantidades de um ou mais dos compostos.

2. OBJETIVOS

- Estabelecer e manter colônia de *A. aegypti* em laboratório.
- Avaliar possível atividade repelente de 1,8-cineol, α -humuleno e β -cariofileno para *A. aegypti*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Estabelecimento e manutenção da colônia de *A. aegypti*

Uma colônia de *A. aegypti* foi estabelecida a partir de ovos enviados pelo Grupo Ecolyzer (Laboratórios Ecolyzer Ltda., São Paulo, Brasil) e mantida no Laboratório de Parasitologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (FCFAR/UNESP), requerendo cuidados diários.

Os ovos recebidos foram colocados em bandejas de 7 L com água destilada (Figura 4a) e as larvas resultantes desses ovos foram colocadas em potes de polipropileno de 1 L (Figura 4b) e alimentadas com ração de peixe Alcon® Gold Marin Sticks (Alcon Ltda.) (Figura 4c) até se transformarem em pupas, de onde emergiram os novos adultos.

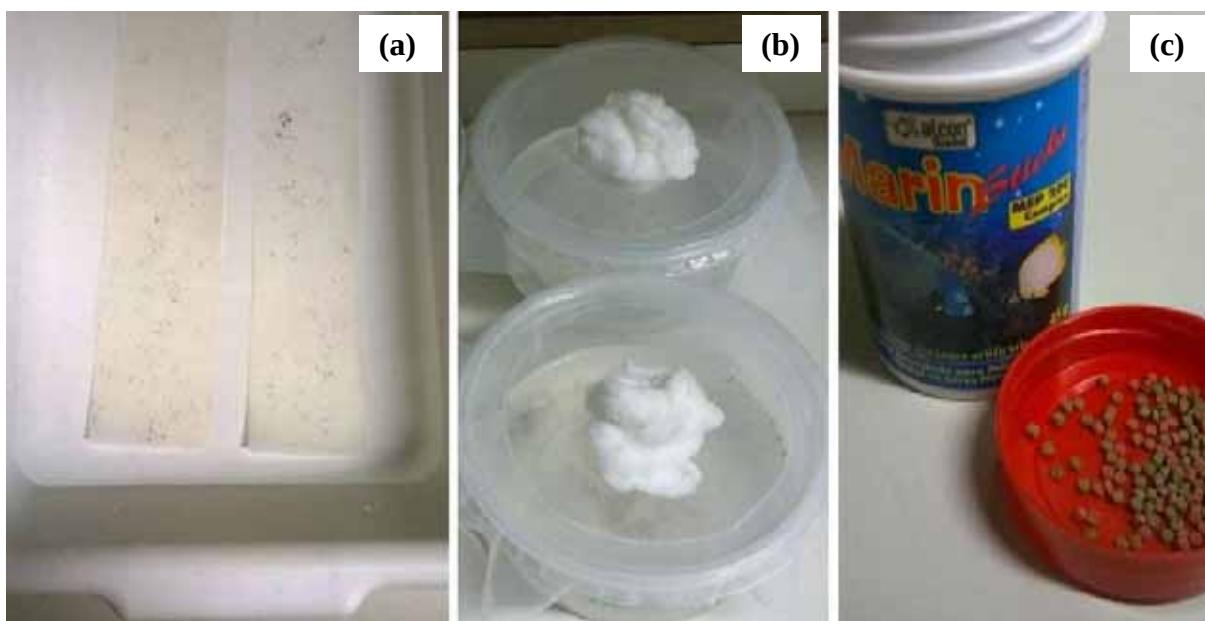


Figura 4. (a) Pote com ovos em água destilada, (b) potes para alimentação das larvas e (c) grânulos da ração de peixe Alcon® Gold Marin Sticks.

Os mosquitos adultos foram acondicionados em gaiolas (Figura 5a) e mantidos em ambiente com temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa entre 47-70%, fotoperíodo de 12/12

horas e alimentados com solução de glicose (Figura 5b), conforme estabelecido pela WHO (2009b). Para manutenção da colônia as fêmeas foram alimentadas com camundongo e um pote de polipropileno de 220 mL contendo um pedaço de papel filtro umedecido com água destilada foi colocado dentro da gaiola para oviposição (Figura 5c).



Figura 5. (a) Gaiola para acondicionamento dos mosquitos adultos, (b) algodão com solução de glicose para alimentação e (c) pote para oviposição.

3.2. Substâncias

Os terpenos 1,8-cineol (Sigma Chemical Co., USA), α -humuleno (TCI Trade Mark, Japão) e β -cariofileno (Firmeniche & Cie., Genéve) foram fornecidos pelo Laboratório de Farmacognosia da FCFAr/UNESP.

3.3. Avaliação de possível atividade repelente das substâncias

Para avaliar a eficácia das possíveis substâncias repelentes foi utilizada a metodologia descrita por OBERMAYR et al. (2010). Os autores desenvolveram uma gaiola específica para

testes de repelência denominada *BG-cage* (Figura 6a) que mostrou resultados mais próximos dos obtidos em testes realizados em campo. A *BG-cage* consiste em uma caixa de 27000 cm³ (41x41x16) composta por paredes de acrílico e chão metálico. O chão metálico possui uma abertura de 56 cm² (14,8x3,8) que é coberta por uma tela (Figura 6b) e contém um aparato que mantém uma distância de 150 mm entre a tela e o antebraço do voluntário durante os testes de repelência. Dessa forma, os mosquitos não entraram em contato direto com os voluntários.



Figura 6. (a) Vista geral da BG-cage e (b) vista da abertura onde os voluntários expõem o antebraço, com destaque para a tela na qual os mosquitos pousam.

Cada teste realizado utilizou 30 fêmeas de idade entre sete e 14 dias, que nunca se alimentaram de sangue, foram privadas de alimentação por no mínimo 12 horas e ocorreram entre 9:00 e 18:00h, horário correspondente à atividade hematófaga da espécie (WHO, 2009b). Durante a realização dos testes a temperatura média foi de aproximadamente 25,55±0,98°C e a umidade relativa média de 54,69±8,10%.

Antes de cada teste, a *BG-cage* foi limpa com hexano P.A. – A.C.S. (98,5% puro, LABSYNTH Ltda., Brasil) e as fêmeas foram colocadas na gaiola com no mínimo 30 minutos de antecedência.

Utilizou-se como controle positivo uma formulação comercial em loção contendo 7,125% de DEET em sua composição e foram selecionados quatro voluntários (dois homens e duas mulheres). No dia do teste os voluntários tiveram seus antebraços lavados com uma solução de Extran® MA 02 neutro (MERCK S.A., Brasil) a 5% e logo após com uma solução de álcool isopropílico P.A. – A.C.S. (99,5% puro, LABSYNTH Ltda., Brasil) a 50% para retirar possíveis odores que pudessem interferir nos testes.

Para a realização dos testes foi feita uma padronização da quantidade que seria utilizada de cada composto, de maneira que fosse utilizada uma dose de $0,33\text{mg cm}^{-2}$ na área do antebraço tratada, de acordo com o que foi estabelecido no estudo inicial da *BG-cage*, sendo necessário 18,5 mg de cada composto na área de 56 cm^2 . Os cálculos foram feitos por meio de regras de três simples, a partir da porcentagem de DEET presente na formulação para o controle positivo (7,125%) e a partir das densidades dos compostos 1,8-cineol, α -humuleno e β -cariofileno ($0,9225\text{ g mL}^{-1}$, $0,8860\text{ g mL}^{-1}$ e $0,9052\text{ g mL}^{-1}$, respectivamente). Com 100 mg da formulação do controle positivo contendo 7,125% de DEET, calculou-se a quantidade da formulação necessária para se ter as 18,5 mg para a realização do teste. Já para os compostos, com o valor das massas contidas em cada mL dos mesmos, calculou-se o volume necessário de cada um para obtenção das 18,5 mg. Dessa forma, ficou estabelecida a utilização de 0,260 g para o controle positivo e de 20 μL para os compostos isolados.

Antes de se testar as substâncias com possível atividade repelente, foi realizado o teste de controle negativo. Para tal teste o antebraço sem nenhum tratamento prévio deve ser colocado e mantido por dois minutos na região da abertura coberta por uma tela para que os mosquitos possam detectar os atrativos naturais presentes na pele do ser humano. Após esse teste e entre os testes seguintes a *BG-cage* foi fechada e conectada a um sistema de ventilação por um tempo mínimo de dois minutos para eliminar possíveis odores que pudessem ter permanecido na gaiola. Para os testes com as possíveis substâncias repelentes, o antebraço foi

colocado na abertura com a tela logo após a aplicação da substância a ser testada e mantido nessa abertura por dois minutos. O número de tentativas de picadas durante o tempo dos testes foi anotado para que fosse feito o cálculo da porcentagem de repelência, de acordo com a seguinte fórmula:

$$\%R = \frac{(Nc - Nt)}{Nc} \times 100 ,$$

onde Nc é o número de tentativas de picadas no braço do controle negativo e Nt o número de tentativas de picadas no braço tratado com o controle positivo ou com as substâncias testadas.

Os testes de controle negativo e para verificação da eficácia das substâncias com possível atividade repelente foram repetidos a cada 30 minutos, por um tempo máximo de 120 minutos (seguindo a recomendação de reaplicação do produto comercial utilizado como controle positivo) ou foram encerrados caso a porcentagem de repelência fosse nula antes do tempo máximo.

Após a obtenção de todos os resultados foi realizado o cálculo das médias das porcentagens de repelência para cada substância nos respectivos tempos.

3.4. Ética

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da FCFAr/UNESP sob CAAE nº 16045813.9.0000.5426 e todos os voluntários assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir das médias das porcentagens de repelência obtidas (Figura 7) nota-se que o controle positivo mostrou uma repelência considerável por cerca de até 90 minutos (menos

que o recomendado pelo fabricante), enquanto as três substâncias testadas mostraram uma queda já a partir de 30 minutos de teste.

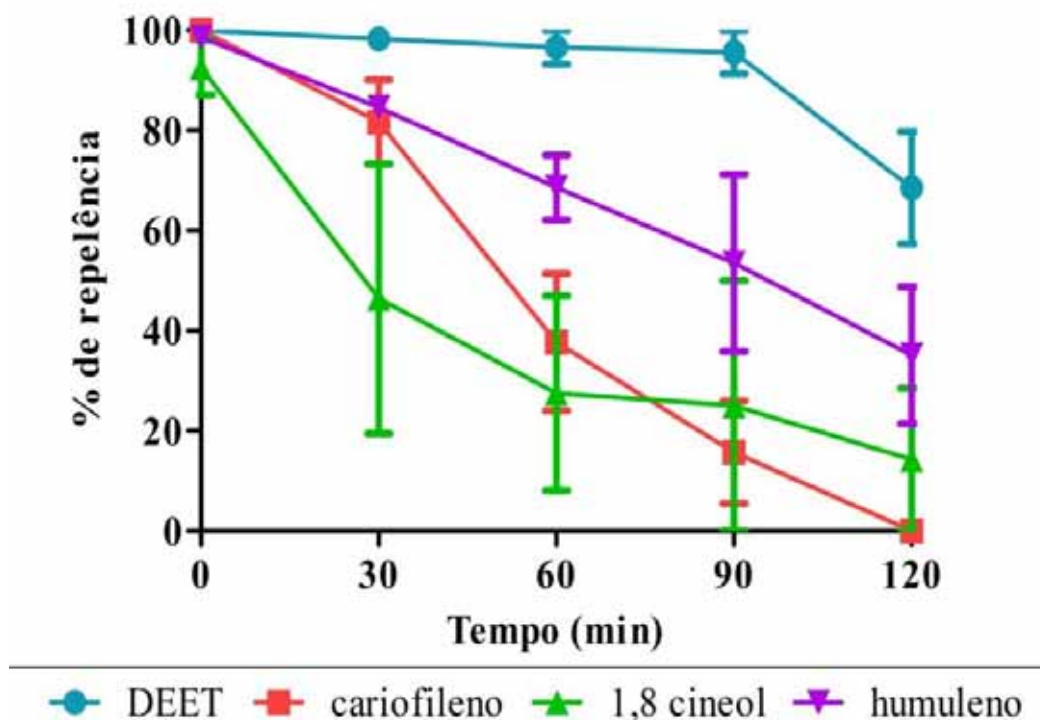


Figura 7. Médias das porcentagens de repelência para as substâncias testadas nos diferentes tempos.

O α -humuleno mostrou valores de porcentagem de repelência com uma queda gradativa e linear, partindo de 98,60% no tempo inicial e atingindo um valor de 35,15% no tempo máximo do teste.

Enquanto isso, o β -cariofileno foi a única substância testada que partiu de um valor inicial de porcentagem de repelência de 100%, porém apresentou uma queda acentuada e gradativa, principalmente a partir de 60 minutos de teste, chegando a uma porcentagem de repelência nula ao final do teste.

Já o 1,8-cineol também mostrou uma repelência com queda acentuada e gradativa, a partir dos 30 minutos, porém com valores intermediários, partindo de 92,57% no tempo inicial e

chegando a um valor mínimo de 14,28% após os 120 minutos de teste. A queda mais acentuada pode ser explicada pela alta volatilidade do composto (PÅLSSON et al., 2008).

A atividade repelente do óleo essencial de *Piper aduncum* Linnaeus contra *Tetranychus urticae* Koch (Tetranychidae), considerado uma praga mundial de plantas, principalmente hortaliças e frutíferas, foi associada principalmente devido à presença do α -humuleno ($1,58 \times 10^{-2}$ g mL⁻¹) e do β -cariofileno ($2,10 \times 10^{-3}$ g mL⁻¹) no mesmo, com uma eficácia de repelência de 73,3% ($\pm 0,83$) e de 70,7% ($\pm 0,88$), respectivamente, após duas horas de teste (ARAÚJO et al., 2012).

O β -cariofileno, presente em uma concentração de $1,69 \times 10^{-2}$ μ L cm⁻² no óleo essencial de *Thymus magnus*, apresentou uma porcentagem de repelência de $18,0 \pm 11,3\%$ contra *Aedes albopictus* Skuse após os cinco minutos de teste (PARK et al., 2012).

Em estudo sobre a atividade repelente do 1,8-cineol em diferentes concentrações (4, 8, 12, 16 e 20 μ L mL⁻¹ em acetona) contra *Tribolium castaneum* Herbst (Tenebrionidae), um besouro conhecido por atacar produtos como grãos armazenados, a porcentagem de repelência variou entre cerca de 60% e 98% entre as respectivas concentrações após três horas de teste (WANG et al., 2009).

Em outro estudo envolvendo o 1,8-cineol, sua atividade repelente contra *Ixodes ricinus* Linnaeus, carrapato hematófago parasita de mamíferos, obteve uma eficácia de repelência de 70,4% após 5 minutos de teste (PÅLSSON et al., 2008).

O 1,8-cineol obteve um índice de repelência de apenas $23,40 \pm 8\%$ contra *Pediculus humanus capitis* Linnaeus (Pediculidae), espécie de piolho causadora da pediculose, durante uma hora (TOLOZA et al., 2006).

A volatilização dos compostos químicos está relacionada à pressão de vapor, uma vez que quanto maior a pressão de vapor de uma substância, maior será sua volatilidade (PALUCH et al., 2009). A partir dos valores de pressão de vapor do DEET, α -humuleno, β -cariofileno e

1,8-cineol a 25°C (0,0010 mmHg, 0,0080 mmHg, 0,0128 mmHg e 1,900 mmHg, respectivamente), nota-se que a queda de atividade repelente das substâncias testadas pode ser explicada pela volatilidade dos mesmos, principalmente do 1,8-cineol, que apresentou queda mais acentuada.

Como forma de diminuir essa volatilização e buscar um aumento da atividade repelente ao longo do tempo, o uso de microemulsões com associação de tensoativos pode ser considerado como uma possível solução, conforme demonstrado por DRAPEAU et al. (2009) ao avaliar o tempo de proteção do composto natural *para*-metano-3,8-diol (PMD) contra *A. aegypti*.

Entre os estímulos responsáveis por atrair os mosquitos estão principalmente o CO₂, o 1-octen-3-ol, acetona e amônia. Além disso, sugere-se que 277 dos 346 compostos químicos responsáveis pelos odores dos seres humanos sejam candidatos como atrativos para o *A. aegypti*, dentre os quais se destacam o ácido láctico e os compostos citados anteriormente, que quando em falta ou encontrados em menores quantidades contribuem para uma menor atratividade. Outros oito compostos (benzaldeído, 6-metil-5-hepten-2-ona, octanal, nonanal, naftaleno, decanal, geranilacetona e um composto não identificado) são encontrados em maiores quantidades em pessoas menos atrativas para *A. aegypti*, porém não se sabe ao certo se eles atuam como repelentes naturais do ser humano ou se apenas mascaram os principais estímulos atrativos (LOGAN et al., 2008).

Quando comparados os valores das porcentagens de repelência obtidos para cada voluntário (Figura 8), pode-se observar uma diferença de resposta entre eles, tanto para o controle positivo quanto para as substâncias testadas.

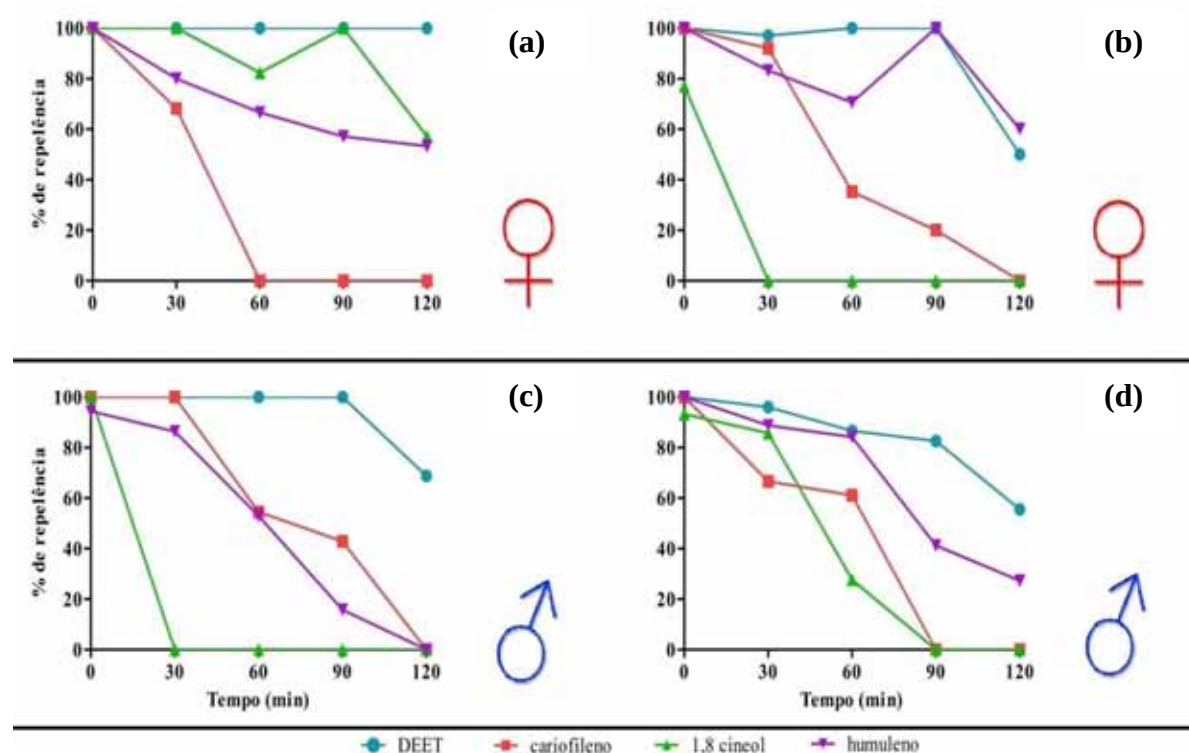


Figura 8. Porcentagens de repelência obtidas para as substâncias testadas para cada um dos voluntários nos diferentes tempos (a e b, voluntárias; c e d, voluntários).

No geral, a diferença entre os resultados obtidos para cada voluntário podem ser explicadas por fatores intrínsecos do ser humano e por características fisiológicas e genéticas dos mosquitos que podem influenciar nessa diferença de atratividade que existe entre as pessoas. Entre os principais fatores que influenciam na diferença de atratividade destacam-se a produção de compostos voláteis pela microbiota da pele, temperatura e massa corpórea, umidade relativa, sistema de defesa e gênero (TAKKEN & VERHULST, 2013).

Diversos estudos apontam a diferença de composição da microbiota da pele do ser humano como principal fator responsável pela variação interindividual da atratividade para os mosquitos, uma vez que a maioria dos odores gerados pelo organismo do ser humano é produzida a partir do metabolismo dessas bactérias. Sem a presença desses microrganismos, os seres humanos não possuíam nenhum odor em suas secreções. Cada ser humano apresenta

uma microbiota diferente na pele e cada espécie de bactéria é responsável pela produção de um determinado odor característico, tendo em vista que seus metabolismos são diferentes. Dessa maneira, pode-se afirmar que determinadas pessoas que são menos atrativas para os mosquitos possuem bactérias produtoras de compostos que podem ser considerados como repelentes naturais (VERHULST et al., 2010).

5. CONCLUSÕES

No presente estudo, a partir da avaliação de 1,8-cineol, α -humuleno e β -cariofileno como possíveis repelentes para *A. aegypti* nota-se que as substâncias, apesar de apresentarem uma porcentagem de repelência inicial alta, não conseguiram manter a atividade repelente ao longo dos testes. Com isso, pode-se concluir que o β -cariofileno, α -humuleno e o 1,8-cineol mostraram uma atividade de repelência para *A. aegypti* abaixo da apresentada pelo DEET.

Além disso, foi possível observar a diferença de respostas entre os voluntários, que pode ser explicada pela diferença de fatores intrínsecos entre eles, principalmente entre suas microbiotas da pele, considerado um dos fatores mais importantes para essa variação. Provavelmente a interação dos compostos produzidos pelos microrganismos presentes na pele com substâncias repelentes, mesmo com o DEET, explique a grande variação observada entre os quatro voluntários.

Uma possibilidade para estudos futuros seria a avaliação de atividade repelente de misturas dos compostos em diferentes proporções para observar um possível sinergismo dos mesmos, principalmente dos compostos β -cariofileno e α -humuleno por se tratarem de isômeros.

Outra possibilidade seria o uso de microemulsões com associação de tensoativos, conforme apresentado anteriormente, visando melhorar o desempenho dos compostos como possíveis repelentes para o *A. aegypti*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, M.J.C.; CÂMARA, C.A.G.; BORN, F.S.; MORAES, M.M.; BADJI, C.A. (2012). Acaricidal activity and repellency of essential oil from *Piper aduncum* and its components against *Tetranychus urticae*. **Exp. Appl. Acarol.** 57(2):139–155.

CDC (2014). *Chikungunya*: information for the general public. [atualizado em 17 de setembro de 2014; citado em 16 de outubro de 2014]. Disponível em: <[http://www.cdc.gov/chikungunya/pdfs/CHIKV_FACTSHEET_CDC_Generalpublic\(09-17-2014\).pdf](http://www.cdc.gov/chikungunya/pdfs/CHIKV_FACTSHEET_CDC_Generalpublic(09-17-2014).pdf)>. Acesso em 14 de outubro de 2014.

DRAPEAU, J.; VERDIER, M.; TOURAUD, D.; KRÖCKEL, U.; GEIER, M.; ROSE, A; KUNZ, W. (2009). Effective insect repellent formulation in both surfactantless and classical microemulsions with a long-lasting protection for human beings. **Chem. Biodivers.** 6(6):934-947.

EATON, A.T. (2009). Insect repellents fact sheet. University of New Hampshire (UNH) Cooperative Extension. [atualizado em fevereiro de 2009; citado em agosto de 2014]. Disponível em: <http://extension.unh.edu/resources/files/resource000963_rep1073.pdf>. Acesso em julho de 2014.

EPA (1998). DEET Reregistration Eligibility Decision (RED) Facts. EPA-738-F-95-010. Environmental Protection Agency, Washington, DC. Disponível em: <<http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDs/factsheets/0002fact.pdf>>. Acesso em junho de 2014.

KAIN, P.; BOYLE, S.M.; THARADRA, S.K.; GUDA, T.; PHAM, C.; DAHANUKAR, A.; Ray, A. (2013). Odour receptors and neurons for DEET and new insect repellents. **Nature**. 502(7472):507-512.

KAMARAJ, C.; RAHUMAN, A.A.; BAGAVAN, A.; ELANGO, G.; ZAHIR, A.A.; SANTHOSHKUMAR, T. (2011). Larvicidal and repellent activity of medicinal plant extracts from Eastern Ghats of South India against malaria and filariasis vectors. **Asian Pac. J. Trop. Med.** 4(9):698-705.

KATZ, T.M.; MILLER, J.H.; HEBERT, A.A. (2008). Insect repellents: historical perspectives and new developments. **J. Am. Acad. Dermatol.** 58(5): 865-871.

KOREN, G.; MATSUI, D.; BAILEY, B. (2003). DEET-based insect repellents: safety implications for children and pregnant and lactating women. **CMAJ** 169(3):209-212.

LOGAN, J.G.; BIRKETT, M.A.; CLARK, S.J.; POWERS, S.; SEAL, N.J.; WADHAMS, L.J.; MORDUE LUNTZ, A.J.; PICKETT, J.A. (2008). Identification of human-derived volatile chemicals that interfere with attraction of *Aedes aegypti* mosquitoes. **J. Chem. Ecol.** 34(3):308-322.

Ministério da Saúde (2014). Febre amarela: histórico. Biblioteca Virtual em Saúde. Disponível em: <<http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/febreamarela/historico.php>>. Acesso em 14 de outubro de 2014.

Ministério da Saúde (2015). Secretaria de Vigilância em Saúde: Boletim Epidemiológico - Volume 45 - nº 31 - 2014 - Monitoramento dos casos de dengue e febre de *chikungunya* até a Semana Epidemiológica 47 de 2014. [atualizado em 02 de janeiro de 2015; citado em 03 de janeiro de 2015]. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/janeiro/02/2014-039---Dengue-SE-47.pdf>>. Acesso em 03 de janeiro de 2015.

NCBI (2014a). Substance summary for eucalyptol (SID 103618726). PubChem substance. Disponível em: <<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?sid=103618726>>. Acesso em junho de 2014.

NCBI (2014b). Substance summary for beta-caryophyllene (SID 111978172). PubChem substance. Disponível em: <<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?sid=111978172>>. Acesso em junho de 2014.

NCBI (2014c). Substance summary for humulene (SID 14717841). PubChem substance. Disponível em: <<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?sid=14717841>>. Acesso em junho de 2014

NORRIS, L.C.; NORRIS, D.E. (2011). Insecticide resistance in *Culex quinquefasciatus* mosquitoes after the introduction of insecticide-treated bed nets in Macha, Zambia. **J. Vector Ecol.** 36(2):411-420.

OBERMAYR, U.; ROSE, A.; GEIER, M. (2010). A novel test cage with an air ventilation system as an alternative to conventional cages for the efficacy testing of mosquito repellents. **J. Med. Entomol.** 47(6):1116-1122.

PAHO (2014). Number of reported cases of dengue and severe dengue (SD) in the Americas, by country: figures for 2014 (to week noted by each country). [atualizado em 19 de dezembro de 2014; citado em 03 de janeiro de 2015]. Disponível em: <http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_download&Itemid=&gid=28678&lang=en>. Acesso em 03 de janeiro de 2015.

PAHO/WHO (2014). Key facts on vector borne diseases: Dengue. [atualizado em março de 2014; citado em setembro de 2014]. Disponível em: <http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=24719&Itemid=>. Acesso em setembro de 2014.

PÅLSSON, K.; JAENSON, T.G.T.; BÆCKSTRÖM, P.; BORG-KARLSON, A.K. (2008). Tick repellent substances in the essential oil of *Tanacetum vulgare*. **J. Med. Entomol.** 45(1):88-93.

PALUCH G.; GRODNITZKY J.; BARTHOLOMAY L.; COATS J. (2009). Quantitative structure-activity relationship of botanical sesquiterpenes: spatial and contact repellency to the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. **J. Agric. Food Chem.** 57(16):7618-7625.

PARK, Y.U.; KOO, H.N.; KIM, G.H. (2012). Chemical composition, larvicidal action, and adult repellency of *Thymus magnus* against *Aedes albopictus*. **J. Am. Mosq. Control Assoc.** 28(3):192-198.

ROZENDAAL, J.A. (1997). Vector Control: Methods for use by individuals and communities. Disponível em: <apps.who.int/iris/bitstream/10665/41968/1/9241544945_eng.pdf>. Acesso em março de 2013.

TAKKEN, W.; VERHULST, N.O. (2013). Host Preferences of Blood-Feeding Mosquitoes. **Annu. Rev. Entomol.** 58:433–453.

TOLOZA, A.C.; ZYGADLO, J.; CUETO, G.M.; BIURRUN, F.; ZERBA, E.; PICOLLO, M.I. (2006). Fumigant and repellent properties of essential oils and component compounds against permethrin-resistant *Pediculus humanus capitis* (Anoplura: Pediculidae) from Argentina. **J. Med. Entomol.** 43(5):889-895.

VERHULST, N.O.; TAKKEN, W.; DICKE, M.; SCHRAA, G.; SMALLEGANGE, R.C. (2010). Chemical ecology of interactions between human skin microbiota and mosquitoes. **FEMS Microbiol. Ecol.** 74(1):1-9.

WANG, J.L.; LI, Y.; LEI, C.L. (2009). Evaluation of monoterpenes for the control of *Tribolium castaneum* (Herbst) and *Sitophilus zeamais* Motschulsky. **Nat. Prod. Res.** 23(12):1080–1088.

WHO (2009a). Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. WHO/HTM/NTD/DEN/2009.1 – New edition. Disponível em: <<http://www.who.int/tdr/publications/documents/dengue-diagnosis.pdf>>. Acesso em março de 2013.

WHO (2009b). Guidelines for efficacy testing of mosquito repellents for human skin. WHO/HTM/NTD/WHOPEs – 4th edition. Disponível em: http://whqlibdoc.who.int/hq/2009/WHO_HTM_NTD_WHOPEs_2009.4_eng.pdf>. Acesso em março de 2013.

WHO (2013). Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases: second WHO report on neglected tropical diseases. WHO/HTM/NTD/2013.1. Disponível em: < http://www.who.int/neglected_diseases/9789241564540/en/>. Acesso em junho de 2014.

WHO (2014). Yellow fever fact sheet nº 100. [atualizado em março de 2014; citado em outubro de 2014]. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs100/en/>>. Acessado em 14 de outubro de 2014.