

SANDRA LUIZA DE OLIVEIRA

MÉTODOS DE ANÁLISE DE REPELÊNCIA EM *Aedes aegypti*  
(CULICIDAE, DIPTERA) UTILIZANDO PRODUTOS  
NATURAIS.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
CURITIBA, PR  
2008

SANDRA LUIZA DE OLIVEIRA

MÉTODOS DE ANÁLISE DE REPELÊNCIA EM *Aedes aegypti*  
(CULICIDAE, DIPTERA) UTILIZANDO PRODUTOS  
NATURAIS.

Orientador: Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Mário A. N. Silva.

Trabalho de conclusão de curso, apresentado ao  
estágio EM do curso de Ciências Biológicas da  
Universidade Federal do Paraná.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
CURITIBA, PR  
2008

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador Mário Antônio Navarro Silva;

Ao professor Francisco e ao técnico Emanuel do departamento de química que nos auxiliou em todo processo de extração;

A minha mãe Anelita e ao meu noivo Paulo que sempre estiveram ao meu lado;

Agradeço a Ana que foi minha companheira em todos os testes e coletas, sem ela esse trabalho não teria sido realizado nem concluído.

## DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho à minha mãe Anelita, uma mulher vencedora, que sempre soube superar os obstáculos, mesmo nos momentos mais difíceis e que nunca desistiu nem me deixou desistir, sempre me deu força para continuar, estando sempre ao meu lado. Mãe, não é simplesmente alguém que mostra o caminho certo, é aquela que pega na mão e conduz até ele, amparando nas quedas, dando força nas horas difíceis, exaltando nas horas de vitória. Você é meu exemplo de coragem, de virtude, de resignação, faz tudo por amor e com amor. Sei que em todos os momentos da minha vida posso contar com sua força. Te amo mãe.

Dedico também esse trabalho ao meu noivo Paulo, uma pessoa que entrou em minha só para me trazer alegrias, companheiro, amigo, sempre pronto para me dar uma palavra de consolo, sempre me animando e me incentivando a não desistir. Sem você eu não teria conseguido chegar aonde cheguei você é minha luz é o meu guia. Muito obrigada por existir e por estar sempre ao meu lado. Te amo.

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS .....	3
DEDICATÓRIA.....	4
SUMÁRIO.....	5
LISTA DE FIGURAS .....	6
LISTA DE TABELAS .....	7
LISTA DE GRÁFICOS.....	8
RESUMO.....	9
1 Introdução.....	10
1.1 Óleos Essenciais .....	11
1.2 Características Gerais dos Mosquitos .....	14
1.3 Ácido Láctico .....	18
1.4 Dióxido de Carbono .....	19
1.5 Associação do Ácido Láctico ou CO <sub>2</sub> a Diferentes Compostos.....	20
2 Objetivos .....	22
2.1 Geral .....	22
2.2 Específico .....	22
3 Materiais e Métodos .....	23
3.1 Obtenção do Material.....	23
3.2 Preparação e Extração .....	23
3.3 Teste de Permanência.....	24
4 Resultados e Discussão .....	26
4.1 Compostos Químicos do Óleo Essencial de <i>Trichilia pallida</i> .....	26
4.2 Variação da Temperatura, Umidade e Quantidade de Pousos.....	27
5 Conclusão .....	35
6 Referências Bibliográficas .....	36
Anexo 1 – Tabela com Descrição do Trabalho em Laboratório.....	40

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - <i>Trichilia pallida</i> , A - Folhas; B - Folhas e Frutos.....	12
Figura 2 - Fêmea <i>Aedes aegypti</i> .....	16
Figura 3 - Macho <i>Aedes aegypti</i> .....	16
Figura 4 - Clevenger, Método de Arrasto à Vapor. ....	24
Figuras 5 - Gaiola Teste, Vista Superior; Vista Lateral. ....	25
Figura 6 - Moléculas dos Compostos do Óleo de <i>Trichilia Pallida</i> , Identificados por Cromatografia Gasosa.....	27

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição Química e Concentração relativa (%) dos Óleos Essenciais de <i>Trichilia pallida</i> Obtidos por Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectroscopia de Massa. ....	26
Tabela 2 - Dados de Temperatura e Umidade Relativa do ar na Sala de Criação Durante a Realização dos Experimentos com Indicação por Teste do Tempo do Primeiro Pousos e da Primeira Picada e o Total de Pousos Durante a Exposição do Hospedeiro Humano em Superfície Tratada com Etanol e ao Controle. ....	28
Tabela 3 - Dados de Temperatura e Umidade Relativa do ar na Sala de Criação Durante a Realização dos Experimentos com Indicação por Teste do Tempo do Primeiro Pousos e da Primeira Picada e o Total de Pousos Durante a Exposição do Hospedeiro Humano em Superfície Tratada com Óleo de <i>Trichilia pallida</i> na Concentração de 0,2% e ao Controle. ....	28
Tabela 4 - Dados de Temperatura e Umidade Relativa do ar na Sala de Criação Durante a Realização dos Experimentos com Indicação por Teste do Tempo do Primeiro Pousos e da Primeira Picada e o Total de Pousos Durante a Exposição do Hospedeiro Humano em Superfície Tratada com Óleo de <i>Trichilia pallida</i> na Concentração de 1% e ao Controle.....	29
Tabela 5 - Dados de Temperatura e Umidade Relativa do ar na Sala de Criação Durante a Realização dos Experimentos com Indicação por Teste do Tempo do Primeiro Pousos e da Primeira Picada e o Total de Pousos Durante a Exposição do Hospedeiro Humano em Superfície Tratada com Óleo de <i>Trichilia pallida</i> na Concentração de 2% e ao Controle.....	30
Tabela 6 - Dados de Temperatura e Umidade Relativa do ar na Sala de Criação Durante a Realização dos Experimentos com Indicação por Teste do Tempo do Primeiro Pousos e da Primeira Picada e o Total de Pousos Durante a Exposição do Hospedeiro Humano em Superfície Tratada com Óleo de <i>Trichilia pallida</i> na Concentração de 3% e ao Controle.....	31
Tabela 7 - Dados de Temperatura e Umidade Relativa do ar na Sala de Criação Durante a Realização dos Experimentos com Indicação por Teste do Tempo do Primeiro Pousos e da Primeira Picada e o Total de Pousos Durante a Exposição do Hospedeiro Humano em Superfície Tratada com Óleo de <i>Trichilia pallida</i> na Concentração de 4% e ao Controle.....	31

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Média do Tempo, em Segundos, para Atração e Pouso da Primeira Fêmea na Mão com Óleo e na Mão Controle no Teste Realizado em Condições Monitoradas de Temperatura e Umidade Relativa do ar.....	32
Gráfico 2 - Média do Tempo, em Segundos, da Primeira Picada de uma das Fêmeas na Mão com Óleo e na Mão Controle.....	33
Gráfico 3 - Média do Total de Pousos em Parte do Hospedeiro Humano (mão) Tratada com Óleo e Controle no Teste Realizado Através do Método Convencional na Sala de Criação em Condições Monitoradas de Temperatura e Umidade Relativa do ar. ....	34



## RESUMO

Considerando que as doenças envolvendo insetos vetores no Brasil vêm aumentando, utilizou-se óleo de plantas para atuar no controle biológico de *Aedes aegypti*, através de métodos de repelência. Muitos produtos naturais vêm sendo utilizados como fármacos e inseticidas no combate aos insetos. O gênero *Aedes aegypti* da ordem Diptera apresenta grande interesse médico, por ser vetor de doenças endêmicas em alguns estados, como malária e dengue. Óleo extraído das plantas da família Meliaceae, vem sendo utilizado como inseticidas no controle de insetos. Os gêneros pertencentes a essa família caracterizam-se por apresentar uma variedade de propriedades biológicas, incluindo analgésico, inseticida e atividade inibidora de crescimento em insetos. Sua atividade contra insetos também tem sido atribuída ao grupo dos tetranortriterpenóides que inclui o hirtin e o trichilin. O óleo de *T.pallida* foi utilizado nas concentrações de 0,2%;1%;2%;3% e 4 %, utilizando o método convencional de repelência, onde o inseto fica em contato direto com hospedeiro humano. Foi usado como controle o etanol, que não mostrou influência na atividade de hematofagia de fêmea. Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente, aonde se chegou a uma conclusão sobre os efeitos repelentes do óleo.

Palavras Chave: *T.pallida*, *Aedes aegypti*, óleo e repelência.

## 1 Introdução

Os repelentes conhecidos não compartilham um modo de ação único e, surpreendentemente, muito pouco se sabe a respeito da ação dos repelentes sobre os seus alvos, os mosquitos (FRADIN, 1998). Aparentemente, os repelentes conhecidos não camuflam os fatores atrativos que emanam da pele, mas fazem com que os mosquitos retornem quando se aproximam a uma distância inferior a quatro centímetros da pele (BROWN & HERBERT, 1997).

Produtos repelentes, comercializados para uso tópico apresentam-se de diversas formas, tais como, gel, loção, aerossol, mousse, pomada ou roll-on, que geralmente possuem na sua formulação o DEET (N, N-dietil-meta-toluamida). DOGAN *et al.* (1999) mostraram que o DEET não atua exatamente como um repelente, mas como um inibidor da atração causada pelo ácido láctico. McCABE *et al.* (1954), consideraram como o mais importante evento na evolução de repelentes.

Muitos estudos têm sido feitos para identificar novas substâncias que possam ser utilizadas como agentes repelentes, já que existem controvérsias no que diz respeito à segurança do uso do DEET. Embora muitos autores defendam a utilização do DEET, outros o consideram alvo de críticas em virtude da ocorrência de casos de encefalite associados ao seu uso.

Considera-se que o repelente ideal deve apresentar características como, tempo de ação prolongado, grau de volatilidade ótimo, i.e. volatilidade suficiente para manter a concentração alta no ar próximo à pele sem, contudo permitir que a substância repelente se dissipe rapidamente, efetividade contra uma ampla variedade de mosquitos, não ser tóxico ou irritante à pele após aplicação tópica ou aplicação nas roupas, odor agradável ou ser inodoro e não promover alterações nas roupas (BROWN & HERBERT, 1997).

As plantas têm sido fonte de muitos fármacos e, em menor escala, de inseticidas. Os princípios ativos responsáveis por essas atividades são, via de regra, moléculas originárias do metabolismo secundário que desempenham funções importantes na interação do vegetal com o ambiente, tais como protegê-lo de doenças causadas por microrganismos como fungos e bactérias, repelir insetos e outros predadores, e atrair espécies úteis como os insetos polinizadores (VERPOORT, 1998).

Partindo do conhecimento de que as plantas repelem naturalmente os mosquitos, uma grande variedade de vegetais tem sido testada com relação ao seu potencial repelente (FRADIN, 1998). A triagem de produtos repelentes de origem botânica tem sido feita a partir de extratos da planta inteira ou de partes específicas desta, como folhas, frutos, flores, raiz e casca (SUKUMAR, *et al.*1991). Como muitas doenças transmitidas por insetos, como malária; dengue; febre amarela; leishmaniose; doenças de Chagas são endêmicas em países do terceiro mundo, a busca de inseticidas e repelentes de origem botânica tem sido impulsionados pela necessidade de descobrir novos produtos que sejam eficazes, seguros e mais baratos que os atuais. Por conterem substâncias que repelem insetos, as plantas podem ser vistas como fontes promissoras de repelentes a serem usados na prevenção de doenças transmitidas por mosquitos.

O desenvolvimento da resistência dos insetos a substâncias compostas da associação de vários princípios ativos é um processo lento, devido aos inúmeros ativos que podem ser encontrados em uma mesma planta.

O número de pesquisas com extratos vegetais realizadas no Brasil, vem aumentando consideravelmente, visando atingir principalmente os insetos transmissores de doenças. Os derivados botânicos podem causar diversos efeitos sobre os insetos tais como, repelência, inibição da oviposição e da alimentação, a extensão dos efeitos e o tempo de ação dependem da dosagem utilizada, de maneira que a morte ocorre nas dosagens maiores e os efeitos menos intensos e mais duradouros nas dosagens menores. Plantas que possuem certas substâncias com propriedades atraentes a insetos podem, também, auxiliar nesse controle quando agem como armadilhas.

## **1.1 Óleos Essenciais**

Os óleos essenciais das plantas são misturas complexas de constituintes voláteis que conferem aromas e sabores característicos. À temperatura ambiente, os óleos essenciais, apresentam-se como líquidos oleosos de alta volatilidade. De uma maneira geral os óleos essenciais são instáveis, especialmente na presença de luz,

calor, umidade, ar e metais (SIMÕES *et al.*, 1999). Os óleos essenciais são, na maioria dos casos, incolores ou ligeiramente amarelados.

Os óleos essenciais são freqüentemente obtidos por arraste de vapor produzido pelo processo de ebulição da água contendo o material botânico intacto ou grosseiramente pulverizado. O material volátil é arrastado pelo vapor de água e posteriormente separado por decantação (BRUNETO, 1991).

São usadas substâncias obtidas do chá das folhas e o extrato dos frutos de *Melia azedarach* L. (família Meliaceae), de origem asiática, conhecida como cinamomo, e há muito tempo tem-se pesquisado a habilidade da espécie indiana *Azadirachta indica* (família Meliaceae) mais conhecida como NIM, que tem demonstrado ser eficaz em vários aspectos, causando efeito em mais de 500 espécies de insetos. Os extratos de *Trichilia* L. (família Meliaceae) são relatados por possuírem uma variedade de propriedades biológicas, incluindo analgésico, inseticida e atividade inibidora de crescimento em insetos. Sua atividade contra insetos também tem sido atribuída ao grupo dos tetranortriterpenóides que inclui o hirtin e o trichilin (SIMMONDS, 2001).

A espécie nativa *Trichilia pallida* Swartz (Sapindales, Meliaceae) (Fig.1 A e B), conhecida popularmente como baga-de-morcego ou catiguá é uma espécie nativa, ocorrendo em todo Brasil, com exceção do nordeste, possui efeitos em relação ao comportamento de hematofagia. Estudos recentes destacaram como a espécie com maior bioatividade contra insetos (TORRECILLAS, 1997; ROEL, 1998).

**Figura 1 - *Trichilia pallida*, A - Folhas; B - Folhas e Frutos.**



A



B

Espécies vegetais pertencentes à família *Meliaceae*, destacam-se por conterem compostos limonóides com ação contra várias espécies de insetos (TAYLOR, 1984 *Apud* MARTINEZ, 2002). Vários monoterpenos foram isolados e avaliados quanto à toxicidade frente a diferentes insetos, entre eles destacam-se  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno, 3-careno, limoneno, mirceno,  $\alpha$ -terpineno e canfeno (VIEGAS JUNIOR, 2003). Monoterpenos de estrutura relativamente simples, como o limoneno, o mirceno e a 1,2-epóxi-pulegona exercem funções de proteção às plantas que o produzem (VIEGAS JUNIOR, 2003).

Os sesquiterpenos, assim como os monoterpenos, costumam aparecer nos óleos essenciais e muitos atuam como fitoalexinas, antibióticos produzidos pelas plantas em resposta ao ataque de microorganismos, e como agentes repelentes de herbívoros. A atividade supressora de apetite foi relacionada ao grupo dos sesquiterpenos, como a lactona e a angulatina A.

Terpenos como a germacrona e o sesquiterpeno eudesmano estão associados à proteção de árvores e arbustos existentes no Alasca e zonas temperadas da América do Norte (VIEGAS JUNIOR, 2003).

SIMMONDS *et.al.* (2001) isolaram, da raiz de *T. pallida*, cinco tetranortriterpenóides, entre eles o hirtin (metil 6-hidroxi-11 $\beta$ -acetoxi-12 $\alpha$ -propanoiloxi-3,7-dioxo-14 $\beta$ ,15 $\beta$ -epoxi-1,5-meliacadien-29-oate) e o deacetilhirtin (metil 6,11 $\beta$ -dihidroxi-12 $\alpha$ -propanoiloxi-3,7-dioxo-14 $\beta$ ,15 $\beta$ -epoxi-1,5-meliacadien-29-oate), os demais compostos isolados foram (metil 6-hidroxi-11 $\beta$ -acetoxi-12 meliacadien-29-oate-(2-metilpropanoiloxi)-3,7-dioxo-14 $\beta$ ,15 $\beta$ -epoxi-1,5-meliacadien-29-oate); (metil 6,11 $\beta$ -dihidroxi-12 $\alpha$ -(2-metilpropanoiloxi)-3,7-dioxo-14 $\beta$ ,15 $\beta$ -epoxi-1,5-meliacadien-29-oate) e (metil 6-hidroxi-11 $\beta$ -acetoxi-12 $\alpha$ -(2-metilbutanoil-oxi)-3,7-dioxo-14 $\beta$ ,15 $\beta$ -epoxi-1,5-meliacadien-29-oate). Todos foram testados no estágio final de larva das lepidópteras, *Spodoptera littoralis* (Boisduval, 1833), *Spodoptera exigua* (Hübner, 1808), *Heliothis virescens* (Fabricius, 1777) e *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1808), obtendo um resultado positivo como inibidor para a alimentação.

ROCHA (2004) isolou e identificou pela primeira vez isolado de *T. pallida*, a substância lupeol. Também identificou a substância gedunina, que apresenta atividade atimalarial e inseticida, e confirmou a estrutura das substâncias 7-desacetoxigedunina e limonina, todas pertencentes ao grupo dos limonóides.

Quanto aos flavonóides, confirmou a estrutura molecular da quercetina, que afeta o desenvolvimento de alguns insetos e 3-O- $\beta$ -ramnosil quercetina, que apresenta atividade antimicrobiana.

As pesquisas realizadas com intuito de avaliar o efeito de óleos essenciais, extraídos de diversas espécies vegetais, mostram que as substâncias identificadas, quando analisadas individualmente podem apresentar resultados significativos contra os insetos, porém nem todas agem da mesma maneira, pois os efeitos podem ser diferenciados para determinadas espécies ou mesmo ineficientes. As substâncias identificadas no óleo de *T. pallida*, como alfa-copaeno, beta elemeno, alfa humuleno, gamma muuroleno, viridifloreno, delta cadineno, germacreno B e 1 epi cubenol, também foram identificadas em outras espécies de plantas e apresentaram eficiência para o controle de insetos. Não foram encontrados registros na literatura sobre a ação do cariofileno, naftaleno, alfa cubebeno, alfa selineno e 10 epi gamma eudesmol.

As investigações sobre os extratos e óleo essencial das plantas sobre os insetos, são avaliadas com maior intensidade quanto ao seu efeito inseticida em espécies de importância na agricultura, porém os elevados números de espécies de plantas existentes que vêm sendo analisadas podem revelar efeitos ainda desconhecidos, para insetos de interesse médico.

A volatilidade dos óleos essenciais envolve sinais de comunicação química entre os vegetais e atuam como armas de defesa química contra os animais predadores. Como funções ecológicas, dos óleos essenciais, consideram-se especialmente inibição da germinação, proteção contra predadores, atração de polinizadores, proteção contra a perda de água e aumento de temperatura. Como por exemplo, as plantas com polinização noturna ou crepuscular, possuem aromas muito intenso nesses horários, devido à impossibilidade de existir o estímulo visual. A composição e concentração dos óleos essenciais podem apresentar diferenças de espécie para espécie, dentro da mesma espécie, ou na mesma população em diferentes períodos do ano (BERNARDO-GIL *et. al.*, 2002).

## **1.2 Características Gerais dos Mosquitos**

Os mosquitos são insetos pertencentes à ordem diptera que possuem na forma adulta, um par de asas funcionais e um par de asas vestigiais. A ordem diptera é uma das maiores entre os insetos, com mais de 2.500 espécies encontradas em quase todas as regiões do mundo (FLOORE, 2000), exceto na Antártica (FRADIN, 1998). As zonas tropicais são as que apresentam a maior quantidade e variedade de mosquitos incluindo espécies com diferentes hábitos alimentares, i.e. de nectarígenos a hematófagos. Os mosquitos pertencem a vários gêneros, quatro dos quais, *Anopheles*, *Culex*, *Aedes* e *Lutzomyia*, se destacam por apresentar grande importância médica. Os mosquitos são os insetos mais importantes na transmissão de doenças, como dengue e malária, com a ocupação humana descontrolada, desmatamento e redução de seus predadores adaptaram-se às cidades.

Todos os mosquitos passam por quatro estágios de desenvolvimento, ovo, larva, pupa e adulto, sendo que os estágios larvais e pupal sempre ocorrem na água. A postura dos ovos pode ser dividida em três categorias em função das características do processo de oviposição.

As fêmeas pertencentes ao gênero *Aedes* depositam os ovos fora do meio líquido, mas de forma a permitir que a larva alcance facilmente a água. Possui dispositivos que conferem resistência à dessecação, permitindo que os ovos permaneçam viáveis por longo período de tempo, antes de alcançarem o meio líquido. No meio líquido, os ovos transformam-se em larvas. As larvas formadas se alimentam de material orgânico ou de microrganismos presentes na água. Esse estágio dura, em condições normais, de oito a dez dias. Após esse estágio, as larvas se transformam em pupas e, dentro de dois a três dias, sofrem uma metamorfose para mosquito adulto (FORATTINI, 2002).

Normalmente durante o verão, o calor faz com que as larvas rapidamente se transformem em pupas, que emergem como adultos uma semana mais tarde. Os mosquitos adultos acasalam posteriormente as fêmeas hematófagas (Fig. 2) procuram um hospedeiro para realizar o repasto sanguíneo e obter as proteínas necessárias para o desenvolvimento dos ovos (SUTHERLAND & CRANS, 2001). O período de incubação dos ovos é variável entre as espécies e depende da

temperatura e, em menor escala, de outros fatores externos, no caso do *Aedes* a incubação dura cinco dias.

**Figura 2 - Fêmea *Aedes aegypti*.**



Fonte: <http://www.infoescola.com/doencas/dengue/>

No inverno, a maioria das espécies de mosquito sobrevive no estágio de ovo, esperando a primavera, quando as águas aquecem e os ovos eclodem. Apenas algumas espécies importantes passam o inverno na fase adulta (SUTHERLAND & CRANS, 2001).

Os machos diferem das fêmeas por possuírem antenas plumosas (Fig. 3) e por não apresentarem a capacidade de picar a pele (FLOORE, 2000). O macho vive por muito pouco tempo após o acasalamento (SUTHERLAND & CRANS, 2001).

**Figura 3 - Macho *Aedes aegypti*.**



Fonte: <http://www.parasitologia.org.br/default.asp?MENU=22&EDITORIA=624>



Machos e fêmeas alimentam-se de substâncias açucaradas, seiva de plantas e néctar das flores, porque necessita de carboidratos, o macho, portanto não se alimenta de sangue. Nas populações de mosquitos Culicidae (Diptera, Nematocera) a realização da alimentação sanguínea envolve uma complexa interação de fatores físicos, químicos e biológicos ligados aos ciclos vitais das espécies. Após a cópula a fêmea necessita realizar o repasto sanguíneo, pois o amadurecimento dos ovos só ocorre na presença da hemoglobina presente no sangue. As fêmeas conseguem ingerir, em um único repasto, uma quantidade de sangue equivalente a uma vez e meia a duas vezes o seu próprio peso (FORATTINI, 1962).

A antropofilia de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (LINNAEUS, 1762) é bem conhecida, mas o padrão de distribuição espacial da hematofagia não é uniforme para as diferentes localidades infestadas, uma vez que é modulado pelas características dos diversos fatores ambientais naturais como temperatura, umidade e artificiais.

Os mosquitos e outros insetos transmissores de doenças localizam o hospedeiro, as plantas e os locais de oviposição detectando sinais químicos e físicos por meio de receptores sensoriais presentes em suas antenas. A escolha do sítio de oviposição parece ser até certo ponto, espécie-específica. Existem indicações de que produtos do metabolismo de bactérias e fungos sejam os agentes responsáveis pela atração dos mosquitos pelos sítios de oviposição. Também é de vital importância a localização da planta e do alimento, pois tanto a nutrição da larva, quanto a alimentação do macho adulto com o néctar são necessárias para estabelecer e manter a reserva nutricional adequada.

*Ae.aegypti* caracteriza-se por ter hábitos diurnos, os mosquitos usam a estratégia que corresponde ao rastreamento ativo combinado com a espera em locais freqüentados pelo hospedeiro. O que os atrai até o hospedeiro são estímulos químicos, que podem ser o CO<sub>2</sub> (EDMAN, 1979) proveniente da respiração e o ácido láctico liberado através do suor. A detecção do ácido láctico é claramente importante para o mosquito fêmea que o utiliza para localizar o alimento sanguíneo. Merece destaque o fato de que ambos os sexos da espécie *Ae.aegypti* detectam e são atraídos pelo ácido láctico, porque essa espécie realiza a cópula sempre nas proximidades do hospedeiro (DAVIS & BOWEN, 1994).

O ácido láctico é um produto metabólico comum a todos os animais, incluindo o homem. Os mosquitos detectam estes estímulos através de receptores químicos que se encontram nas extremidades das partes bucais e nas antenas e detectam odores a vários metros de distância. Todos esses estímulos contribuem para assinalar ao mosquito a presença do hospedeiro que lhe será a fonte sanguínea (FORATTINI, 2002).

O dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) atua como um guia do mosquito em direção ao hospedeiro tem um efeito importante quando combinado a outros fatores presentes no indivíduo a ser picado, aumentando a resposta às correntes de convecção, aos fatores visuais próximos ao alvo e à resposta ao odor à distância (GILLIES, 1980).

Sabe-se também que a temperatura e a umidade estão fortemente relacionadas à atração dos mosquitos, pois o ar quente e úmido atrai mosquitos de forma mais eficiente do que o ar quente e seco. Outro fator de orientação dos mosquitos no ambiente é a luz, sendo que a reação varia conforme a espécie, podendo guiá-lo para o seu abrigo ou estimular suas atividades, como a hematofagia. Assim, de um modo geral, os mosquitos com hábito diurno tendem a picar em ambientes iluminados e aqueles que apresentam hábito noturno picam mais facilmente em ambientes escuros (FORATTINI, 2002).

Os mosquitos têm, portanto muitas ferramentas que permitem selecionar os locais para oviposição, os alimentos e o indivíduo a ser picado, garantindo a sua sobrevivência e tornando-o um eficiente transmissor de doenças para o homem e outras espécies (DAVIS & BOWEN, 1994).

### **1.3 Ácido Láctico**

O suor humano é reconhecido como atrativo para várias espécies de insetos, e entre os seus componentes o ácido láctico é encontrado em maior concentração e é considerado principal para a atração. Na pele humana é o produto final da glicólise durante o metabolismo anaeróbico das células mioepiteliais das glândulas sudoríparas ecrinas, que estão presentes em todo o corpo e desempenham um papel importante na termorregulação. A quantidade de ácido láctico produzida por humanos é maior do que em outros mamíferos e as diferenças

na atração que os humanos exercem sobre as fêmeas de mosquitos está associada com a quantidade dessa substância que é liberada, sendo relacionada com a densidade de glândulas sudoríparas ecrinas presentes, sua atividade e diferenças de pH (TORRES-ESTRADA & RODRIGUEZ, 2003). Sendo assim, o efeito atrativo do ácido láctico, tem sido avaliado isoladamente e também em combinação com outros compostos.

Comparando a atratividade de *Ae.aegypti*, aos compostos liberados por humanos e outros animais, constatou-se que devido às altas concentrações de ácido láctico exaladas da pele humana, essas são mais atrativas para os mosquitos do que a pele dos outros animais (STEIB *et al.*, 2001). De forma semelhante ocorreu com *An. gambiae*, onde os odores da pele de humanos foram mais atrativos do que os odores da pele do gado, que causaram certa repelência para essa espécie (PATES *et al.*, 2001). Mostrando que ao ser adicionado ácido láctico aos compostos de animais, esses se tornam atrativos para as duas espécies de culicídeos citadas, devido à capacidade que esses mosquitos têm de identificar o odor humano independente dos odores que a ele sejam misturados (STEIB *et al.*, 2001; PATES *et al.*, 2001).

Assim como a atratividade é diferenciada entre os humanos e animais, o ácido láctico, nas emanações dos odores, para ter seu efeito atrativo precisa ser liberado em concentrações adequadas, pois se liberado em baixas e principalmente em altas concentrações, pode tornar-se repelente (SANTOS NETO, 2002). Esse fato foi observado em alguns estudos, onde o ácido láctico repeliu espécies de *Aedes (Ochlerotatus) sollicitans* Walker, 1956; *Aedes (Ochlerotatus) cantator* (Coquillett, 1903) e *Ae.aegypti*, e não atraiu espécies de *Culex (Culex) pipiens* Linnaeus, 1758 e *Anopheles (Anopheles) maculipennis* Meigen, 1818 (SMITH *et al.*, 1970).

#### **1.4 Dióxido de Carbono**

Dentre os estímulos olfativos, o CO<sub>2</sub> é o caïromônio que tem sido mais investigado em diferentes famílias de Dípteros. Porém, a princípio não se conhecia a função exata desse composto, alguns o consideravam apenas como ativador, enquanto outros como ativador e atrativo. Contudo, análises de dados em campo e

laboratório, mostraram que o CO<sub>2</sub> na presença de corrente de ar pode desempenhar as duas funções, mas na sua ausência funciona apenas como ativador (GILLIES, 1980).

Uma forte atração de *An.gambiae* pelos odores humanos foi constatada (ZWIEBEL & TAKKEN, 2004; QIU *et. al.*, 2004) e tem sido mostrado que essa espécie é atraída a até 4,5% de CO<sub>2</sub>, uma dose equivalente a que é expirada durante a respiração humana (DEJONG & KNOLS, 1995). Contudo, para *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 essa concentração de CO<sub>2</sub> é fracamente atrativa (MBOERA *et. al.*, 1998), o CO<sub>2</sub> torna-se atrativo quando exalado por um humano em concentrações acima do normal, (CONSTANTINI *et. al.*, 1996). *Cx. quinquefasciatus* responde de forma diferente aos voláteis liberados pelos humanos, variações nas respostas eletrofisiológicas e de comportamento foram atribuídas ao estado fisiológico da fêmea, período de atividade e a origem das emanações (KNOLS *et. al.*, 1995).

O CO<sub>2</sub> é o composto mais abundante em humanos, em comparação com outros compostos, como ácidos carboxílicos, ácidos graxos, octenol, ácido láctico, provenientes dos odores, porém, apesar dessa abundância, um relato sobre propriedades repelentes da respiração humana, que inibem a atração das fêmeas, pode explicar a variação na atratividade através das diferenças na quantidade de CO<sub>2</sub> que é expirado (MUKABANA *et. al.*, 2004). Uma maior ou menor taxa de CO<sub>2</sub> liberado pode ser responsável pela diferença na resposta de atração entre as espécies de mosquitos pelo hospedeiro e, além disso, para algumas espécies esse composto isolado pode ser menos atrativo do que quando combinado com outros compostos presentes nas emanações do hospedeiro.

A associação de outras substâncias com CO<sub>2</sub> tem sido constatada como importantes na função do mosquito de localizar seus hospedeiros, porém poucos compostos foram identificados como atrativos (TAKKEN & KNOLS, 1999).

### **1.5 Associação do Ácido Láctico ou CO<sub>2</sub> a Diferentes Compostos**

As combinações dos diversos compostos presentes na pele e na respiração podem causar efeito atrativo para um grande número de espécies de mosquitos,

porém, alguns desses compostos quando sozinhos podem não atrair ou até mesmo causar a repelência. O ácido láctico e o CO<sub>2</sub>, são considerados os compostos mais importantes encontrados nas emanações dos odores humanos, e agem por sinergismo com compostos que aparecem discretamente nos odores e que isolados não causam atração nos mosquitos, porém quando combinados ao ácido láctico ou ao CO<sub>2</sub> podem se tornar muito mais atrativos ou então não causarem efeito sobre os mosquitos.

Em estudo de campo utilizando armadilha luminosa CDC, observou-se que poucas espécies foram atraídas ao octenol sozinho, porém, quando combinado com CO<sub>2</sub> na presença ou ausência de luz na armadilha, pelo menos duas vezes mais espécimes de *Aedes*, *Anopheles*, *Culex* e *Psorophora* foram coletados (RUEDA *et. al.*, 2001). Investigando a resposta de atração, de determinadas espécies de mosquitos, aos odores da pele humana transferidos para uma placa de Petri de vidro, SCHRECK *et. al.* (1990) observaram uma resposta mais significativa para *Ae. aegypti*, enquanto SCHRECK *et. al.* (1981) e BERNIER *et. al.* (2002) notaram uma variação na atratividade dessa espécie aos resíduos dos odores da pele, à partir da diminuição na concentração dos compostos quando esses foram transferidos para o vidro, sugerindo que eles têm um tempo de vida finito. *Ae. aegypti* responde muito bem a combinação de ácido láctico e CO<sub>2</sub>, mas pode responder também a combinação do ácido láctico com outros compostos (BERNIER *et. al.*, 2003).

Ácido láctico desempenha um papel muito importante na busca do hospedeiro pelos mosquitos e o efeito atrativo dos ácidos graxos encontrados na pele, para *Ae. aegypti* só pôde ser notado quando o ácido láctico estava presente (BOSCH *et. al.*, 2000). Tal efeito ocorre também com outros compostos, para alguns de forma mais significativa, devido às concentrações e o seu potencial atrativo quando combinado, para outros essa atração pode não ser muito forte ou nem existir, talvez por não apresentar propriedades atrativas para os mosquitos ou também por serem mais voláteis, acarretando em uma diminuição de concentração com o passar do tempo. EIRAS & JEPSON (1991) registraram que o ácido láctico e o suor da mão sozinho, não atraíram as fêmeas, mas quando combinados com elevada quantidade de CO<sub>2</sub>, passaram a ser atrativos.

De um modo geral, a grande variação observada na atratividade dos mosquitos ao hospedeiro em relação às diferentes substâncias que são liberadas, mostra que não existe um padrão específico de substância atrativa para todas as espécies, mas que cada espécie responde de maneira diferente a determinados compostos, dependendo também das concentrações, das preferências e das condições ambientais favoráveis para a busca do hospedeiro.

## **2 Objetivos**

### **2.1 Geral**

Analisar o tempo de permanência e a eficácia do óleo de *Trichilia pallida* como repelente, através de métodos convencionais de avaliação da repelência em Culicidae (Diptera).

### **2.2 Específico**

1. Analisar o comportamento de *Ae. aegypti* através do método de análise de repelência convencional;
2. Verificar a eficiência do óleo de *T. pallida* como repelente;
3. Constatar se houve ou não eficiência do extrato de *T. pallida*.

## 3 Materiais e Métodos

### 3.1 Obtenção do Material

As folhas de *T.pallida* foram obtidas na fazenda Doralice localizada a 8 km do município de Ibiporã, distante 12 km da cidade de Londrina, Paraná. A propriedade possui 260 alqueires no total, sendo que mais da metade dessa área é de mata preservada.

A coleta foi realizada nos meses de dezembro de 2006, abril e outubro de 2007 as plantas foram coletadas e selecionadas visualmente. Foram excluídas partes contendo contaminantes ou atacadas por insetos ou fungos.

As colônias das espécies de mosquitos *Ae.aegypti* já encontravam-se estabelecidas na sala de criação do Departamento de Zoologia da Universidade Federal do Paraná, à uma temperatura de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  e umidade relativa  $70 \pm 10\%$  acondicionadas em gaiolas de 50 cm x 50 cm. Os mosquitos foram alimentados diariamente com uma solução de mel a 10% e uma vez por semana foi oferecido as fêmeas, sangue de cobaia (*BalbiC*), cedida pelo Biotério da Universidade Federal do Paraná. Para que a colônia de *Ae.aegypti* fosse mantida de forma adequada, permaneceu durante todo o experimento na sala de criação do Departamento de Zoologia.

Todo procedimento foi realizado nas mesmas condições de criação da colônia, com temperatura e umidade controladas.

### 3.2 Preparação e Extração

As folhas de *T.pallida* foram dessecadas em estufa a uma temperatura de  $40^\circ\text{C}$  e posteriormente fragmentadas com o auxílio de um triturador em hélice.

A extração do óleo essencial foi realizada através de hidrodestilação (arraste a vapor), durante um período de quatro horas, utilizando o aparelho de Clevenger (Fig. 4) para essências menos densas do que a água, no Laboratório de Produtos Naturais e Ecologia Química (LAPNEQ), do Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná. Foi utilizado como solvente o etanol, que através

de testes preliminares mostraram não ter influência na qualidade do produto, nem no comportamento de hematofagia das fêmeas.

**Figura 4 - Clevenger, Método de Arrasto à Vapor.**



Fonte: Os Autores.

### **3.3 Teste de Permanência**

Para o experimento foram utilizadas 20 fêmeas com idade entre 5 e 7 dias que já tenham copulado e necessitam de sangue para o desenvolvimento dos ovos. Utilizando 1 ml de solução a ser testada, o produto foi aplicado na mão até o pulso. Logo após a aplicação a mão foi introduzida na gaiola (Figura 5) e verificado o tempo do primeiro pouso e da primeira picada, bem como a quantidade de fêmeas que pousaram na mão. A mão sem produto foi posteriormente introduzida na gaiola, sendo usada como controle onde também foi observado o tempo do primeiro pouso, da primeira picada e a quantidade de fêmeas atraídas.



Ao término de cada experimento as fêmeas eram descartadas, em gaiolas de criação de 50 x 50 cm onde seriam alimentadas para uma posterior oviposição, e novos indivíduos eram selecionados para um novo teste.

Todos os resultados foram anotados em tabelas (Anexo 1), contendo todos os parâmetros necessários para os cálculos estatísticos.

**Figuras 5 - Gaiola Teste, Vista Superior; Vista Lateral.**



Fonte: Os Autores.

## 4 Resultados e Discussão

### 4.1 Compostos Químicos do Óleo Essencial de *Trichilia pallida*

A composição química do óleo essencial da *T. pallida* foi analisada e os seus compostos foram revelados através da cromatografia gasosa acoplados a espectroscopia de massa. Através da análise foi possível constatar a presença de 13 compostos diferentes e a porcentagem em que foram encontrados no óleo, no entanto, cinco compostos não foram identificados, sendo apresentadas apenas as suas porcentagens, necessitando de um maior período de investigação (Tabela 1). Por se tratar de um gênero pertencente à subfamília Melioideae, a mesma dos gêneros *Melia* e *Azadirachta*, é possível que algumas substâncias, isoladas da espécie, apresentem semelhança com as isoladas dos respectivos gêneros citados.

As moléculas dos compostos identificados no óleo pertencem principalmente ao grupo dos monoterpenos e sesquiterpenos, e mostraram-se com volatilidade reduzida (Fig. 7).

Os terpenos abrangem uma grande variedade de substâncias de origem vegetal, sendo o termo empregado para designar todas as substâncias cuja origem biossintética deriva de unidades do isopreno. Os compostos terpênicos mais freqüentes nos óleos voláteis são os monoterpenos, sendo encontrados em 90 % nos óleos, e os sesquiterpenos.

**Tabela 1 - Composição Química e Concentração relativa (%) dos Óleos Essenciais de *Trichilia pallida* Obtidos por Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectroscopia de Massa.**

Tempo de Retenção	Kovatz	Composto	Porcentagem
17,391	1190	Naftaleno	1,3739
24,432	1349	Alfa-cubebeno	0,8548
25,675	1379	<b>Alfa-copaeno</b>	<b>13,1729</b>
26,271	1392	Beta-elemeno	2,0128
27,526	1424	<b>Cariofileno</b>	<b>6,9564</b>
28,985	1460	Alfa-humuleno	1,2514
29,715	1477	?	1,0795
29,81	1479	Gama-muuroleno	0,9898
30,057	1485	?	1,5226
30,192	1488	?	2,934
30,391	1494	<b>Viridifloreno</b>	<b>14,2923</b>
30,692	1401	<b>Alfa-selineno</b>	<b>29,6548</b>
31,574	1422	<b>Delta-cadineno</b>	<b>8,5572</b>
31,743	1425	?	4,7259

33,154	1565	<b>Germacreno B</b>	<b>5,8989</b>
35,445	1624	10-epi-gama-eudesmol	0,7308
35,813	1634	1-epi-cubenol	1,4579
36,976	1666	?	0,7156

(?) = Não identificado

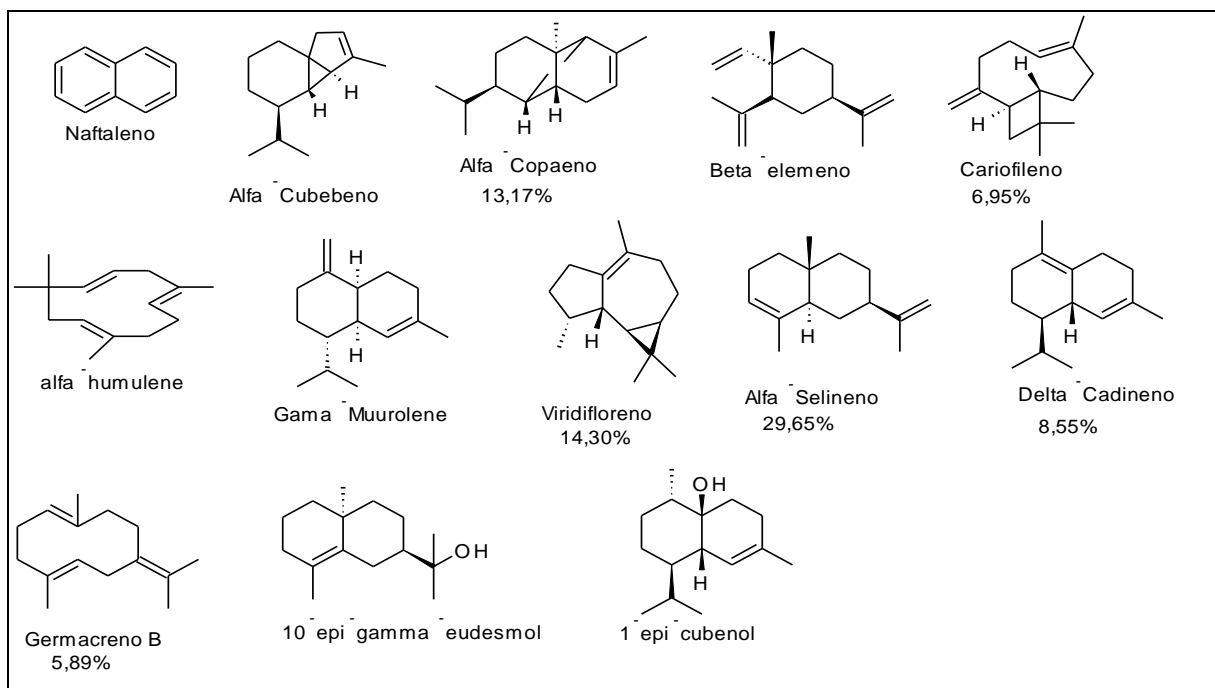
**Tempo de retenção:** tempo que a substância demora a sair da coluna (espectrômetro de massa).

**Índice de Kovatz:** índice padrão ao qual o tempo de retenção é transformado para chegar mais próximo do valor que corresponde à substância.

**Fonte: Os Autores.**

Os terpenóides são compostos formados por repetições de uma molécula de cinco átomos de carbono, que são chamados de isopreno e classificam-se pelo número de unidades de isopreno que os compõe. Isopreno são hemiterpenos, monoterpenos são formados por 2 moléculas de isopreno, ou seja, 10 carbonos; sesquiterpenos são formados por 3 moléculas de isopreno, 15 carbonos; diterpenos por 4 moléculas de isopreno, 20 carbonos; triterpenos por 6 moléculas de isopreno, 30 carbonos; tetraterpenos por 8 moléculas de isopreno, 40 carbonos e os politerpenos por mais de 8 moléculas de isopreno, mais de 40 carbonos.

**Figura 6 - Moléculas dos Compostos do Óleo de *Trichilia Pallida*, Identificados por Cromatografia Gasosa.**



**Fonte: Os Autores**

## 4.2 Variação da Temperatura, Umidade e Quantidade de Pousos

A média da temperatura e umidade da sala de criação, durante os testes com etanol, foi respectivamente, 26,1°C e 62,6%. A média do tempo de pouso da primeira fêmea foi sete segundos e da primeira picada foi vinte e quatro segundos, um intervalo de dezessete segundos entre pouso e picada. O total geral dos pousos, para os 15 testes realizados, foi de 120 fêmeas (Tabela 2).

**Tabela 2 - Dados de Temperatura e Umidade Relativa do ar na Sala de Criação Durante a Realização dos Experimentos com Indicação por Teste do Tempo do Primeiro Pouso e da Primeira Picada e o Total de Pousos Durante a Exposição do Hospedeiro Humano em Superfície Tratada com Etanol e ao Controle.**

Teste	Médias		Etanol		
	Temperatura externa (°C)	Umidade Relativa (%)	1º Pouso	1º Picada	Totais pousos
1	26,1	64	00:00:01	00:00:14	10
2	24,6	68	00:00:07	00:00:23	11
3	26,7	69	00:00:03	00:00:24	9
4	26,5	53	00:00:15	00:00:43	11
5	23,8	50	00:00:07	00:00:27	8
6	26,4	53	00:00:06	00:00:28	8
7	25,3	59	00:00:12	00:00:16	6
8	27,3	61	00:00:23	00:00:49	8
9	25,7	57	00:00:08	00:00:38	3
10	27,0	70	00:00:06	00:00:36	6
11	26,6	68	00:00:01	00:00:15	4
12	26,6	67	00:00:10	00:00:18	7
13	26,6	67	00:00:05	00:00:09	9
14	26,7	67	00:00:04	00:00:16	11
15	26,7	67	00:00:06	00:00:13	9
<b>Média</b>	<b>26,17</b>	<b>62,66</b>	<b>00:00:07</b>	<b>00:00:24</b>	<b>8</b>
<b>Desvio Padrão</b>	<b>0,948</b>	<b>Total de pousos nos 15 testes</b>			<b>120</b>

Fonte: Os Autores.

A média da temperatura e umidade da sala de criação, durante os testes com óleo nas concentrações a 0,2%; 1% e 2% ficaram em 26°C e entre 62% e 65%, respectivamente. A diferença da média do tempo de pouso da primeira fêmea, entre a mão com óleo e a mão controle, para a concentração 0,2% foi um segundo, a 1% o tempo foi o mesmo e a 2% a diferença ficou em 2 segundos. A primeira picada, para 0,2% de óleo, demorou cinco segundos a mais em relação ao controle, a 1% essa diferença baixou para dois segundos, e a 2% ficou em quatro segundos (Tabelas 3, 4 e 5).

**Tabela 3 - Dados de Temperatura e Umidade Relativa do ar na Sala de Criação Durante a Realização dos Experimentos com Indicação por Teste do Tempo do Primeiro Pouso e da**

**Primeira Picada e o Total de Pousos Durante a Exposição do Hospedeiro Humano em Superfície Tratada com Óleo de *Trichilia pallida* na Concentração de 0,2% e ao Controle.**

Teste	Médias		Óleo 0,2%			Controle		
	T. E. (°C)	U. R. (%)	1º Pousos	1º Picada	Totais pousos	1º Pousos	1º Picada	Totais pousos
1	26,1	64	00:00:04	00:00:13	12	00:00:04	00:00:12	6
2	24,6	68	00:00:02	00:00:12	12	00:00:04	00:00:21	10
3	26,7	69	00:00:07	00:00:20	9	00:00:01	00:00:06	7
4	26,5	53	00:00:02	00:00:27	10	00:00:12	00:00:25	6
5	23,8	50	00:00:01	00:00:27	10	00:00:13	00:00:23	8
6	26,4	53	00:00:02	00:00:17	4	00:00:03	00:00:15	2
7	25,3	59	00:00:02	00:00:14	15	00:00:08	00:00:33	14
8	27,3	61	00:00:01	00:00:20	10	00:00:05	00:00:26	10
9	25,7	57	00:00:05	00:00:39	10	00:00:02	00:00:14	9
10	27,0	70	00:00:08	00:00:32	13	00:00:01	00:00:11	13
11	26,6	68	00:00:01	00:00:14	5	00:00:01	00:00:11	10
12	26,6	67	00:00:10	00:00:26	11	00:00:04	00:00:26	15
13	26,6	67	00:00:02	00:00:13	15	00:00:01	00:00:09	10
14	26,7	67	00:00:26	00:01:04	6	00:00:04	00:00:29	8
15	26,7	67	00:00:04	00:00:25	8	00:00:03	00:00:29	8
<b>Média</b>	<b>26,17</b>	<b>62,66</b>	<b>00:00:05</b>	<b>00:00:24</b>	<b>10</b>	<b>00:00:04</b>	<b>00:00:19</b>	<b>9</b>
<b>Desvio Padrão</b>	<b>0,948</b>	<b>----</b>	<b>Total de pousos nos 15 testes</b>		<b>150</b>	<b>Total de pousos nos 15 testes</b>		<b>136</b>

Legenda: T.E. = temperatura externa

U.R. = umidade relativa

Fonte: Os Autores.

**Tabela 4 - Dados de Temperatura e Umidade Relativa do ar na Sala de Criação Durante a Realização dos Experimentos com Indicação por Teste do Tempo do Primeiro Pousos e da Primeira Picada e o Total de Pousos Durante a Exposição do Hospedeiro Humano em Superfície Tratada com Óleo de *Trichilia pallida* na Concentração de 1% e ao Controle.**

Teste	Médias		Óleo 1%			Controle		
	T. E. (°C)	U. R. (%)	1º Pousos	1º Picada	Totais pousos	1º Pousos	1º Picada	Totais pousos
1	26,2	66	00:00:01	00:00:16	13	00:00:06	00:00:13	8
2	24,6	68	00:00:02	00:00:10	13	00:00:05	00:00:15	7
3	27,1	65	00:00:04	00:00:20	12	00:00:02	00:00:15	13
4	27,2	50	00:00:01	00:00:15	16	00:00:07	00:00:20	9
5	24,2	52	00:00:03	00:00:15	10	00:00:03	00:00:33	12
6	27,4	75	00:00:01	00:00:10	9	00:00:01	00:00:11	8
7	25,3	59	00:00:02	00:00:10	10	00:00:01	00:00:14	3
8	27,3	61	00:00:06	00:00:33	10	00:00:01	00:00:14	11
9	26,4	60	00:00:16	00:00:16	7	00:00:02	00:00:11	7
10	26,7	69	00:00:15	00:00:15	6	00:00:01	00:00:15	11
11	26,7	60	00:00:24	00:00:24	5	00:00:01	00:00:18	9
12	26,5	67	00:00:14	00:00:14	1	00:00:02	00:00:18	8
13	26,5	67	00:00:01	00:00:14	13	00:00:02	00:00:13	10
14	26,5	67	00:00:02	00:00:58	3	00:00:01	00:00:31	11
15	26,0	67	00:00:03	00:00:21	6	00:00:02	00:00:23	11
<b>Média</b>	<b>26,34</b>	<b>63,53</b>	<b>00:00:02</b>	<b>00:00:19</b>	<b>9</b>	<b>00:00:02</b>	<b>00:00:17</b>	<b>9</b>
<b>Desvio Padrão</b>	<b>0,942</b>	<b>---</b>	<b>Total de pousos nos 15 testes</b>		<b>134</b>	<b>Total de pousos nos 15 testes</b>		<b>138</b>

Legenda: T.E. = temperatura externa.

U.R. = umidade relativa

Fonte: Os Autores.

**Tabela 5 - Dados de Temperatura e Umidade Relativa do ar na Sala de Criação Durante a Realização dos Experimentos com Indicação por Teste do Tempo do Primeiro Pouso e da Primeira Picada e o Total de Pousos Durante a Exposição do Hospedeiro Humano em Superfície Tratada com Óleo de *Trichilia pallida* na Concentração de 2% e ao Controle.**

Teste	Médias		Óleo 2%			Controle		
	T. E. (°C)	U. R. (%)	1º Pouso	1º Picada	Totais pousos	1º Pouso	1º Picada	Totais pousos
1	23,9	69	00:00:07	00:00:15	2	00:00:08	00:00:28	8
2	23,0	63	00:00:07	00:00:27	8	00:00:02	00:00:26	13
3	25,2	78	00:00:01	00:00:11	8	00:00:07	00:00:22	8
4	27,9	58	00:00:02	00:00:16	9	00:00:02	00:00:16	7
5	27,4	50	00:00:03	00:00:25	9	00:00:02	00:00:18	10
6	27,6	74	00:00:01	00:00:08	7	00:00:02	00:00:11	6
7	25,4	59	00:00:03	00:00:15	7	00:00:01	00:00:26	6
8	27,2	60	00:00:01	00:00:27	10	00:00:01	00:00:14	7
9	26,5	57	00:00:03	00:00:39	4	00:00:04	00:00:22	4
10	26,8	69	00:00:04	00:00:21	5	00:00:01	00:00:13	10
11	26,7	68	00:00:02	00:00:21	6	00:00:03	00:00:16	10
12	26,3	68	00:00:03	00:00:36	5	00:00:03	00:00:09	8
13	26,3	68	00:00:03	00:00:16	12	00:00:02	00:00:16	13
14	26,4	68	00:00:19	00:00:50	2	00:00:03	00:00:31	12
15	26,4	68	00:00:02	00:00:27	16	00:00:02	00:00:20	11
<b>Média</b>	<b>26,2</b>	<b>65,13</b>	<b>00:00:04</b>	<b>00:00:23</b>	<b>7</b>	<b>00:00:02</b>	<b>00:00:19</b>	<b>9</b>
<b>Desvio Padrão</b>	<b>1,343</b>	<b>---</b>	<b>Total de pousos nos 15 testes</b>		<b>110</b>	<b>Total de pousos nos 15 testes</b>		<b>133</b>

Legenda: T.E. = temperatura externa

U.R. = umidade relativa

Fonte: Os Autores.

O tempo de aproximação e pouso para as cinco concentrações do óleo testadas, foi reduzido, já para o tempo da picada, pode-se observar que na concentração de 4% a diferença, apesar de reduzida, foi mais expressiva, se comparada com as demais concentrações. Esse fato, assim como nos testes realizados através do método novo, também pode estar associado à maior concentração das substâncias ativas.

A média da temperatura e umidade da sala de criação, durante os testes com óleo nas concentrações 3% e 4%, foi 26,1°C e ficou em 64% e 63%, respectivamente. A diferença nas médias do tempo de pouso da primeira fêmea, na mão com óleo em ambas as concentrações, 3% e 4%, ficou em dois segundos. A diferença da primeira picada, na mão com 3% de óleo, em relação ao seu controle, foi de cinco segundos, enquanto na concentração a 4% essa diferença foi de 12 segundos (Tabelas 6 e 7).

A rápida aproximação das fêmeas, observada em todos os experimentos, através do tempo de atração e de pouso, também pode estar associada ao “efeito de intrusão”, que possivelmente, pode ter sido estimulado pela agitação inerente ao

início dos experimentos e da presença humana, ensejando seleção passiva ou oportunista por parte desses hematófagos, semelhante ao efeito que ocorre em pesquisas de campo, como observado por FORATTINI *et.al.* (1981) em um levantamento sobre a atividade de culicídeos em mata residual no Vale do Ribeira, São Paulo.

**Tabela 6 - Dados de Temperatura e Umidade Relativa do ar na Sala de Criação Durante a Realização dos Experimentos com Indicação por Teste do Tempo do Primeiro Pousos e da Primeira Picada e o Total de Pousos Durante a Exposição do Hospedeiro Humano em Superfície Tratada com Óleo de *Trichilia pallida* na Concentração de 3% e ao Controle.**

Teste	Médias		Óleo 3%			Controle		
	T. E. (°C)	U. R. (%)	1º Pousos	1º Picada	Totais pousos	1º Pousos	1º Picada	Totais pousos
1	24,4	60	00:00:13	00:00:31	4	00:00:02	00:00:15	8
2	23,5	63	00:00:12	00:00:29	4	00:00:03	00:00:21	9
3	25,3	69	00:00:02	00:00:11	8	00:00:04	00:00:17	6
4	22,9	54	00:00:03	00:00:34	4	00:00:05	00:00:25	6
5	26,3	51	00:00:02	00:00:17	12	00:00:01	00:00:19	10
6	27,1	73	00:00:01	00:00:10	15	00:00:07	00:00:16	12
7	25,5	59	00:00:01	00:00:12	13	00:00:05	00:00:29	15
8	26,4	68	00:00:04	00:00:24	13	00:00:02	00:00:20	16
9	26,5	67	00:00:07	00:00:43	10	00:00:04	00:00:24	10
10	26,7	54	00:00:13	00:00:25	9	00:00:01	00:00:11	8
11	26,6	67	00:00:02	00:00:21	10	00:00:01	00:00:16	17
12	26,9	68	00:00:03	00:00:23	11	00:00:01	00:00:12	12
13	27,9	70	00:00:05	00:00:31	10	00:00:02	00:00:18	10
14	28,1	70	00:00:01	00:00:23	12	00:00:03	00:00:16	8
15	28,1	70	00:00:03	00:00:12	6	00:00:02	00:00:16	14
<b>Média</b>	<b>26,14</b>	<b>64,2</b>	<b>00:00:04</b>	<b>00:00:23</b>	<b>9</b>	<b>00:00:02</b>	<b>00:00:18</b>	<b>11</b>
<b>Desvio Padrão</b>	<b>1,572</b>	<b>---</b>	<b>Total de pousos nos 15 testes</b>		<b>141</b>	<b>Total de pousos nos 15 testes</b>		<b>161</b>

Legenda: T.E. = temperatura externa  
U.R. = umidade relativa

Fonte: Os Autores.

**Tabela 7 - Dados de Temperatura e Umidade Relativa do ar na Sala de Criação Durante a Realização dos Experimentos com Indicação por Teste do Tempo do Primeiro Pousos e da Primeira Picada e o Total de Pousos Durante a Exposição do Hospedeiro Humano em Superfície Tratada com Óleo de *Trichilia pallida* na Concentração de 4% e ao Controle.**

Teste	Médias		Óleo 4%			Controle		
	T. E. (°C)	U. R. (%)	1º Pousos	1º Picada	Totais pousos	1º Pousos	1º Picada	Totais pousos
1	24,4	60	00:00:01	00:00:56	11	00:00:05	00:00:27	12
2	23,4	64	00:00:04	00:00:24	8	00:00:02	00:00:10	7
3	25,4	68	00:00:03	00:00:12	6	00:00:05	00:00:14	9
4	23,0	57	00:00:02	00:00:17	9	00:00:03	00:00:23	8
5	26,8	52	00:00:02	00:00:10	11	00:00:03	00:00:28	14
6	26,8	78	00:00:02	00:00:24	11	00:00:01	00:00:13	7
7	25,6	58	00:00:01	00:00:20	11	00:00:04	00:00:17	3
8	26,3	68	00:00:05	00:00:27	11	00:00:02	00:00:11	16
9	26,7	67	00:00:03	00:00:51	10	00:00:01	00:00:14	11
10	26,8	68	00:00:05	00:00:24	9	00:00:02	00:00:11	9

11	27,2	67	00:00:10	00:00:23	11	00:00:01	00:00:08	11
12	27,3	67	00:00:03	00:00:18	9	00:00:03	00:00:14	13
13	27,7	54	00:00:12	00:00:25	5	00:00:02	00:00:09	8
14	27,7	54	00:00:05	00:00:40	9	00:00:02	00:00:12	12
15	27,8	70	00:00:08	00:00:30	10	00:00:01	00:00:10	12
<b>Média</b>	<b>26,19</b>	<b>63,46</b>	<b>00:00:04</b>	<b>00:00:26</b>	<b>9</b>	<b>00:00:02</b>	<b>00:00:14</b>	<b>10</b>
<b>Desvio Padrão</b>	<b>1,533</b>	<b>---</b>	<b>Total de pousos nos 15 testes</b>		<b>141</b>	<b>Total de pousos nos 15 testes</b>		<b>152</b>

Legenda: T.E. = temperatura externa

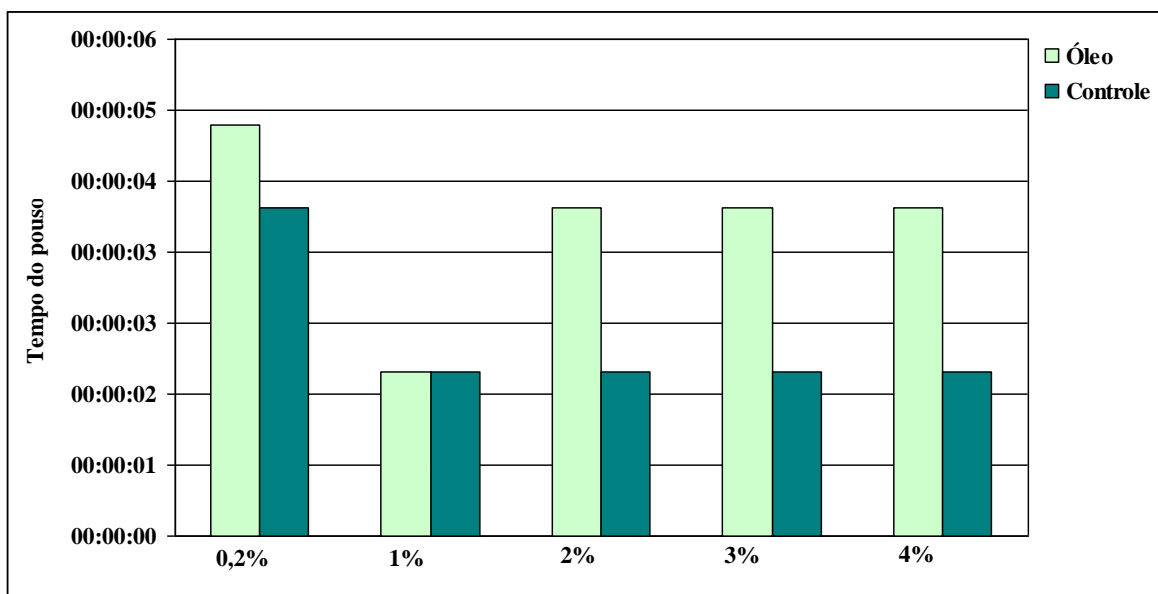
U.R. = umidade relativa

Fonte: Os Autores.

O tempo de resposta das fêmeas com exposição direta, foi reduzido nas concentrações entre 0,2% e 3% não ultrapassando cinco segundos, a diferença mais elevada foi atingida pela concentração de 4%, porém não ultrapassando 12 segundos. O resultado observado possibilita a hipótese de que quanto maior a concentração, maior o potencial efeito repelente do óleo.

A resposta das fêmeas aos odores, sua aproximação e pouso, foram registrados com diferença de um minuto para a concentração 0,2%; em 1% o tempo foi igual para o óleo e controle; e em 2%, 3% e 4% a diferença foi de dois minutos (gráfico 1).

**Gráfico 1 - Média do Tempo, em Segundos, para Atração e Pouso da Primeira Fêmea na Mão com Óleo e na Mão Controle no Teste Realizado em Condições Monitoradas de Temperatura e Umidade Relativa do ar.**



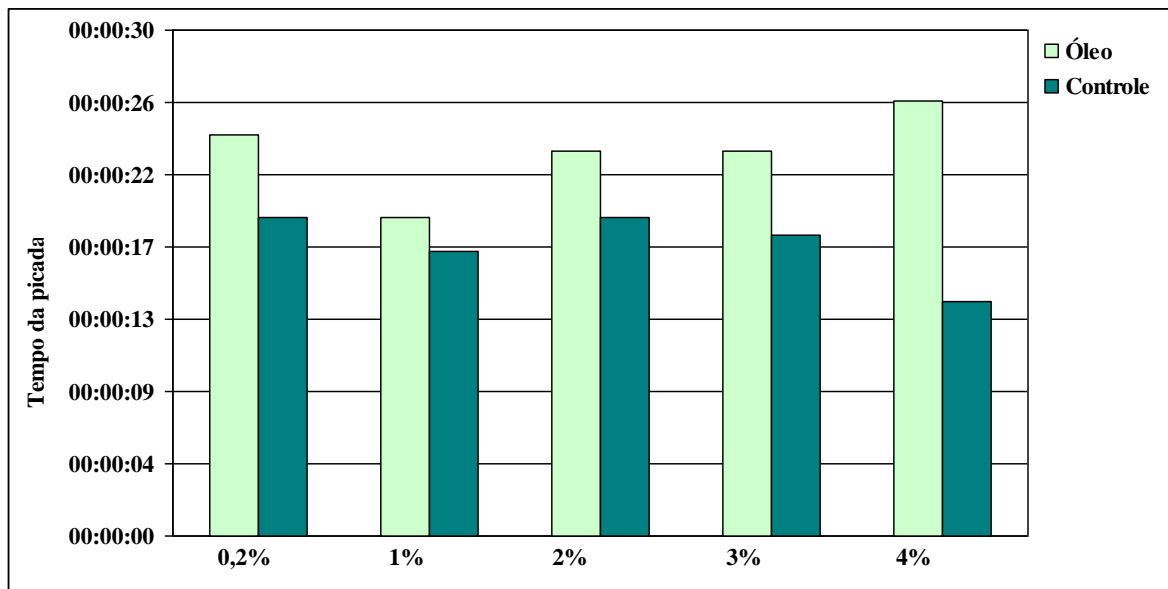
Fonte: Os Autores.



Após o pouso as fêmeas logo selecionaram o melhor local para realizar o repasto sanguíneo. E assim, como no tempo de pouso, a média do tempo da primeira picada em ambas as situações, óleo e controle, mostrou que em todas as concentrações a atração das fêmeas pelo controle foi mais rápida do que a atração pelo óleo, com intervalo de tempo de apenas poucos segundos de diferença.

No óleo a 0,2% a diferença do tempo da primeira picada, para o óleo em relação ao controle, foi de cinco segundos; a 1% essa diferença ficou em dois segundos; a 2% quatro segundos, a 3% cinco segundos e a 4% doze segundos (gráfico 2).

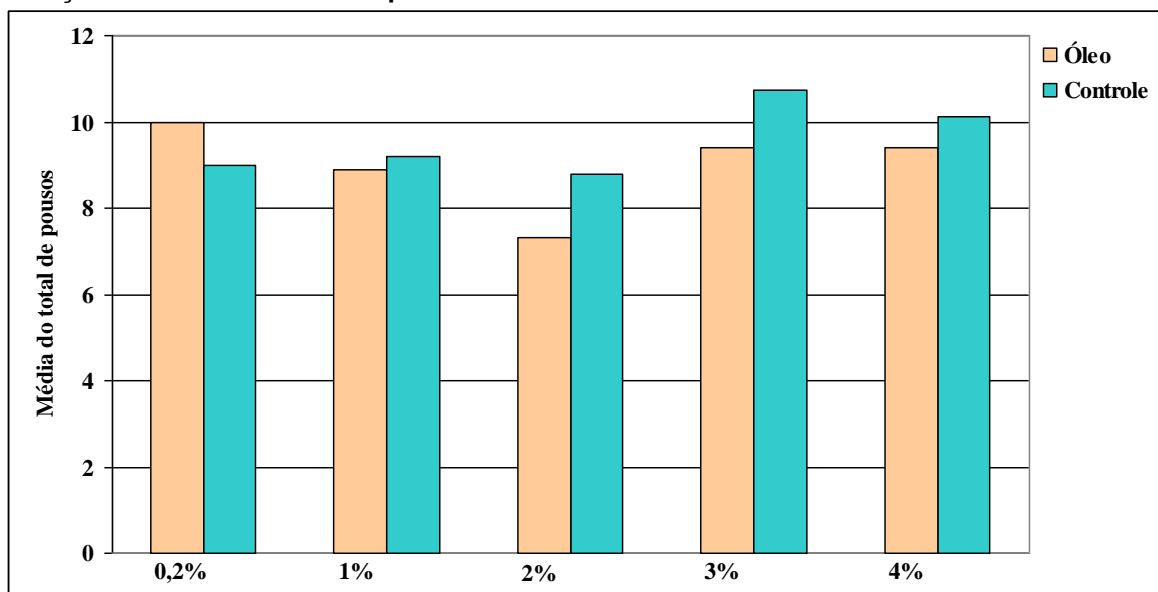
**Gráfico 2 - Média do Tempo, em Segundos, da Primeira Picada de uma das Fêmeas na Mão com Óleo e na Mão Controle.**



Fonte: Os Autores.

O número total de fêmeas que pousaram em ambas as mãos, com óleo e controle, foram quantificadas e os valores apresentaram-se muito próximos e reduzidos. Foi observada maior atração pelo controle, com exceção da concentração do óleo a 0,2% que atraiu mais fêmeas do que o seu controle. Em média foram calculados 10 pousos na mão com óleo a 0,2% e 9 na mão controle. Na concentração a 1% foram 8,9 pousos e no seu controle 9,2; a 2% foram 7,3 e no controle 8,8; a 3% em média pousaram 9,4 fêmeas e no seu controle 10,7 e a 4% foram 9,4 no óleo e 10,1 no controle (gráfico 3).

**Gráfico 3 - Média do Total de Pousos em Parte do Hospedeiro Humano (mão) Tratada com Óleo e Controle no Teste Realizado Através do Método Convencional na Sala de Criação em Condições Monitoradas de Temperatura e Umidade Relativa do ar.**



Fonte: Os Autores.

## 5 Conclusão

Os resultados obtidos através desse trabalho indicam que é possível existir um potencial repelente no óleo essencial de *T. pallida*, pois, apesar dos baixos índices de repelência observados, foi registrada diferença significativa na correlação óleo e controle. Esses resultados podem servir de base para futuras pesquisas, utilizando diferentes concentrações do óleo, até que se obtenha a concentração ideal. Um estudo mais aprofundado das substâncias que estão presentes no óleo pode ajudar a identificar a substância ativa, e a partir dessa substância, fracionando-a e aumentando o número de concentrações, alcançarem o ingrediente ativo com efeito repelente para mosquitos.

Levando-se em consideração os resultados obtidos em pesquisas já realizadas, para outros grupos de insetos com diferentes partes da planta utilizada, onde folhas e ramos mostraram resultados diferentes, um estudo dessas partes vegetais da *T. pallida* separadamente seria importante para avaliar o potencial de cada uma delas e também discriminar em qual das partes existe maior concentração de substância ativa com efeito repelente.

Um fator importante que deve ser levado em consideração são as possíveis variações nos teores de substâncias ativas presentes nas plantas de *T. pallida* utilizadas. Sendo coletadas em épocas e localizações geográficas diferentes, e sofrendo variações ambientais ao longo do ano, pode mostrar resultados contraditórios quando testada para diferentes finalidades.

## 6 Referências Bibliográficas

- BERNARDO-GIL, M.G.; RIBEIRO, M.A. & ESQUÍVEL, M.M. 2002. Produção de extractos para a indústria alimentar: uso de fluidos supercríticos. **Boletim de Biotecnologia** **73**:14-21.
- BERNIER, U.R.; KLINE, D.L.; SCHRECK, C.E.; YOST, R.A & BARNARD, D.R. 2002. Chemical analysis of human skin emanations: comparison of volatiles from humans that differ in attraction of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Journal of the American Mosquito Control Association** **18** Suppl 3:186-195.
- BERNIER, U.R.; KLINE, D.L.; POSEY, K.H.; BOOTH, M.M.; YOST, R.A. & BARNARD, D.R. 2003. Synergistic attraction of *Aedes aegypti* (L.) to binary blends of l-lactic acid and acetone, dichloromethane, or dimethyl disulfide. **Journal of Medical Entomology** **40** Suppl 5:653-656
- BOSCH, O.J.; GEIER, M. & BOECKH, J. 2000. Contribution of fatty acids to olfactory host finding of female *Aedes aegypti*. **Chemical Senses** **25**:323-330.
- BROWN, M. & HERBERT, A. 1997. Insect Repellents: An overview. **Journal of American Academy of Dermatology**. **36**:243-9.
- BRUNETON, J. 1991. **Elementos de fitoquímica y de farmacognosia**. Barcelona: editorial Acribiá.
- CONSTANTINI, C.; GIBSON, G.; SAGNON, N.F.; TORRE, A.D.; BRADY, J. & COLUZZI, M. 1996. Mosquito responses to carbon dioxide in a West African Sudan savanna village. **Medical and Veterinary Entomology** **10**:220-227.
- DAVIS, E.E. & BOWEN, M. F. 1994. Sensory Physiological Basis for Attraction in Mosquitoes. **Journal of the American Mosquito Control Association**, **10**: 316-325.
- DOGAN, E.B.; J.W. AYRES & P.A. ROSSIGNOL. 1999. Behavioural mode of action of deet: inhibition of lactic acid attraction. **Medical and Veterinary Entomology**. **13**:97-100.
- EDMAN, J.D. 1979. Orientation of some Florida mosquitoes (Diptera: Culicidae) toward small vertebrates and carbon dioxide in the field. **Journal Medical Entomological**. **15**:292-296.
- EIRAS, A.E. & JEPSON, P.C. 1991. Host location by *Aedes aegypti* (Diptera:

- Culicidae): a wind tunnel study of chemical cues. **Bulletin of Entomological Research** **81**:151-160
- FORATTINI, O.P. 2002. **Culicidologia Médica: Identificação, Biologia, Epidemiologia**. São Paulo, vol.2.
- FORATTINI, O. P. 1962. **Entomologia Médica**. São Paulo: Tipografia EDANEE S.A.
- FORATTINI, O. P.; GOMES, A.C.; SANTOS, J.L.F.; GALATI, E.A.B.; RABELLO, E. X. & NATAL, D. 1981. Observações sobre atividade de mosquitos Culicidae, em mata residual no Vale do Ribeira, S. Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública** **15**:557-586.
- FLOORE, T. 2000. Mosquito Information. **The American Mosquito Control Association**. 17 outubro 2001.
- FRADIN, M.S. 1998. Mosquitoes and Mosquito Repellents: A Clinician's Guide. **Annals of Internal Medicine**, **128**: 931-940.
- GILLIES, M.T. 1980. The Role of Carbon Dioxide in Host-Feeding by mosquitoes (Díptera: Culicidae): a review. **Bulletin of Entomology Research**, **70**: 525-532.
- KNOLS, B.G.J.; JONG, R. & TAKKEN, W. 1995. Differential attractiveness of isolated humans to mosquitoes in Tanzania. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** **89**:604-606.
- MARTINEZ, S.S. 2002. O NIM – *Azadirachta indica*: natureza, usos múltiplos, produção. **Instituto Agrônômico do Paraná**, Londrina. 142p.
- MUKABANA, W.R.; TAKKEN, W.; KILLEEN, G.F. & KNOLS, B.G.J. 2004. Allomonal effect of breath contributes to differential attractiveness of humans to the African malaria vector *Anopheles gambiae*. **Malaria Journal** **3**:1-8.
- MCCABE, E.T., W.F.BARTHEL, S.I.GENTLER & S.A.HALL (1954). Insect Repellents. III. N, N-dioethylamides. **J.Org. Chem.** **19**:493-498.
- PATES, H.V.; TAKKEN, W.; STUKE, K. & CURTIS, C.F. 2001. Differential behavior of *Anopheles gambiae sensu strictu* (Diptera:Culicidae) to human and cow odors in the laboratory. **Bulletin of Entomological Research** **91**:289-296.
- QIU, Y.T.; SMALLEGANGE, R.C.; HOPPE, S.; VAN LOON, J.J.A; BAKKER, E.J. & TAKKEN, W. 2004. Behavioural and electrophysiological responses of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* Giles *sensu stricto* (Diptera:Culicidae) to human skin emanations. **Medical and Veterinary Entomology** **18**:429-438.

- ROEL, A.R. **Efeitos de extratos orgânicos de *Trichilia pallida* Swartz (Meliaceae) na sobrevivência e desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda*** (Lepdoptera: Noctuide). Piracicaba, 1998, 115p. Tese (Doutorado)-Esal/USP.
- RUEDA, L.M.; HARRISON, B.A.; BROWN, J.S.; WHITT, P.B.; HARRISON, R.L. & GARDNER, R.C. 2001. Evaluation of 1-octen-3-ol, carbon dioxide, and light as attraction for mosquitoes associated with two distinct habitats in North Carolina. **Journal of the American Mosquito Control Association** 17 Suppl 1:61-66.
- SANTOS NETO, L.G. 2002. **Odores humanos e CO<sub>2</sub> comercial como atrativos de mosquitos (Díptera, Culicidae) no estado do Paraná**, Brasil [Tese de Doutorado]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná.
- SIMMONDS, M.S.J.; P.C. STEVENSON; E.A. PORTER & N.C. VEITCH. 2001. Insect antifeedant activity of three new tetranortriterpenoids from *Trichilia pallida*. **Journal of Natural Products**, 64:1117-1120, abril.
- SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. 1999. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/ Florianópolis: ed. UFRGS/ ed. UFSC.
- SUTHERLAND, D.J. & CRANS, W.J. 2001. Mosquitoes in your life. **New Jersey Agriculture Experiment Station Publication**. 12 janeiro 2002.
- SUKUMAR, K.; PERICH, M. & BOOBAR, L. L. 1991. Botanical Derivatives in Mosquito Control: A Review. **Journal of the American Mosquito Control Association**, 7: 210-237.
- SCHRECK, C.E.; SMITH, N.; CARLSON, D.A.; PRICE, G.D.; HAILE, D. & GODWIN, D.R. 1981. A material isolated from human hands that attracts female mosquitoes. **Journal of Chemical Ecology** 8 Suppl 2:429-438.
- SCHRECK, C.E.; KLINE, D.L. & CARLSON, D.A. 1990. Mosquito attraction to substances from the skin of different humans. **Journal of the American Mosquito Control Association** 6 Suppl 3:406-410.
- SMITH, C.N.; SMITH, N.; GOUCK, H.K.; WEIDHAAS, D.E.; GILBERT, I.H.; MAYER, M.S.; SMITTLE, B.J. & HOFBAUER, A. 1970. L-Lactic acid as a factor in the attraction of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) to human hosts. **Annals of the Entomological Society of America** 63(3): 760-770.

- STEIB, B.M.; GEIER, M. & BOECKH, J. 2001. The effect of lactic acid on odors-related host preference of yellow fever mosquitoes. **Chemical Senses** **26**:523-528.
- TAKKEN, W. & KNOLS, B.G. 1999. Odor-mediated behavior of afrotropical malarial mosquitoes. **Annual Review of Entomology** **44**:131-157
- TORRECILAS, S. **Efeito de extratos aquosos de *Trichilia pallida* Swartz (Meliaceae) no desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith)** (Lepdoptera: Noctuidae) criada em diferentes genótipos de milho. Piracicaba, 1997, 143p. Dissertação (Mestrado)-USP.
- TORRES-ESTRADA, J.L. & RODRIGUEZ, M.H. 2003. Señales físico químicas involucradas em la búsqueda de hospederos y em la inducción de picadura por mosquitos. **Salud Pública de México** **45** Suppl. 6:497-505.
- VERPOORTE, R. 1998. **Antimicrobially Active Alkaloids**. In: Alkaloids; Biochemistry, Ecology and Medicinal Applications (M.F. ROBERTS & M. WINK), pp. 397-433, New York: Plenum Press.
- VIEGAS JÚNIOR, C. 2003. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. **Química Nova** **26**(3): 390-400.  
(<http://www.infoescola.com/doencas/dengue/>), acessado em 08/03/2008.  
(<http://www.parasitologia.org.br/default.asp?MENU=22&EDITORIA=624>), acessado em 08/03/2008
- ZWIEBEL, L.J. & TAKKEN, W. 2004. Olfactory regulation of mosquito-host interactions. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** **34**:645-652.

## Anexo 1 – Tabela com Descrição do Trabalho em Laboratório

### **TESTE DE REPELÊNCIA** **MÉTODO CONVENCIONAL**

Data:

Idade das fêmeas:

Produto:		TESTE N°:						
Concentração:								
Horário Início:								
Horário Término:								
	TEMPO		Temperatura externa			Umidade Relativa		
	Óleo	Controle	Média	Máxima	Mínima	Média	Máxima	Mínima
1°Pouso								
1°Picada								
Obs:								