

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**ANA CRISTINA TISSOT**

**TESTES DE REPELÊNCIA COM NOVA METODOLOGIA EM *Aedes aegypti*  
LINNAEUS, 1762 (CULICIDAE, DIPTERA) E DETERMINAÇÃO QUÍMICA DO  
ÓLEO ESSENCIAL DE *Trichilia pallida* (MELIACEAE).**

**CURITIBA  
2008**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**ANA CRISTINA TISSOT**

**TESTES DE REPELÊNCIA COM NOVA METODOLOGIA EM *Aedes aegypti*  
LINNAEUS, 1762 (CULICIDAE, DIPTERA) E DETERMINAÇÃO QUÍMICA DO  
ÓLEO ESSENCIAL DE *Trichilia pallida* (MELIACEAE).**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, área de Concentração em Entomologia, do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Entomologia.

Orientador: Prof. Dr. Mario Antonio Navarro da Silva

**CURITIBA  
2008**

Ao meu pai Edison (*in memoriam*), e minha  
mãe Ebel, pelo incentivo, apoio e amor.  
Ao meu marido Douglas, pela  
compreensão e amor.  
Ao meu irmão Paulo pela ajuda e carinho.

## AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Mario Antonio Navarro da Silva, do curso de Pós-Graduação em Entomologia da Universidade Federal do Paraná, pela orientação, incentivo, apoio, compreensão e amizade.

Ao professor Dr. Francisco de Assis Marques, do departamento de Química da Universidade Federal do Paraná, pela colaboração e ajuda na execução do trabalho.

À professora Dr<sup>a</sup>. Beatriz Maia, do departamento de Química da Universidade Federal do Paraná, por ceder o laboratório para o desenvolvimento da pesquisa.

Ao professor Dr. José Marcelo D. Torezan, à Ms. Alba Lúcia Cavalheiro e ao técnico Edson Mendes Francisco, do Laboratório de Biodiversidades e Restauração de Ecossistemas (LABRE) da Universidade Estadual de Londrina, pela ajuda e apoio durante as coletas.

Ao Dr. Jonny Edward Duque Luna, da Universidade Federal do Paraná, pela ajuda na análise dos dados.

Aos doutorandos Emmanoel Costa e Celso Wosch, e a mestranda Érica dos Santos, do departamento de Química da Universidade Federal do Paraná, pela colaboração e tempo despendido nas extrações e diluições.

Aos bolsistas de iniciação científica, Gustavo, departamento de Química da UFPR, pela ajuda na identificação dos compostos, e em especial, à Sandra Luiza de Oliveira, departamento de Ciências Biológicas da UFPR, por toda a ajuda no desenvolvimento do trabalho, paciência e amizade.

Aos colegas de Pós-Graduação em Entomologia, Josiane Prophiro pela ajuda na criação dos mosquitos, Ana Caroline Dalla Bona, Lisiane Poncio, Elaine Fantinatti, Daniéla Calado, Andréia Barbosa, Eduardo Kwabara, Isabel, Milena pela amizade.

À todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Entomologia da UFPR.

Ao CNPq, pelo auxílio financeiro.

“Não importa onde você parou... em que momento da vida você cansou...  
O que importa é que sempre é possível e necessário recomeçar.  
Recomeçar é dar uma nova chance a si mesmo...  
É renovar as esperanças na vida e, o mais importante...  
Acreditar em você de novo. Se desejarmos fortemente o melhor e...  
Principalmente, lutarmos pelo melhor...  
O melhor vai se instalar em nossa vida.  
Porque sou do tamanho daquilo que vejo. E não do tamanho da minha altura.”

*Carlos Drummond de Andrade*

## RESUMO

Os produtos sintéticos utilizados para o controle de insetos podem causar diversos danos no ambiente como um todo, por isso estudos de plantas com propriedades inseticidas e repelentes reforçam a necessidade da utilização de recursos renováveis e rapidamente degradáveis. Com o objetivo de desenvolver um novo equipamento para teste de repelência em culicídeos utilizando uma nova metodologia de análise do comportamento de fêmeas de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) diante de produtos repelentes sintéticos e naturais, o presente estudo buscou realizar experimentos com o equipamento desenvolvido, observando seu desempenho em repelir ou atrair as fêmeas e sua eficácia em avaliar produtos repelentes sintéticos, bem como o potencial efeito repelente do óleo essencial da *T. pallida*, e o potencial efeito larvicida dos extratos aquoso, hexânico, diclorometano, metanólico e o hidrolato obtido durante a extração do óleo essencial da *T. pallida*. Os experimentos foram realizados na sala de criação sob condições controladas e monitoradas de temperatura e umidade relativa do ar. Os testes com o novo equipamento foram denominados de “método novo” em que as fêmeas tinham duas opções de escolha, mão com óleo ou mão controle, porém sem o contato direto com o hospedeiro. Primeiramente o método novo foi avaliado pelo seu desempenho através de produtos repelentes sintéticos denominados de A, B e C, realizados em 60 repetições com duração de 30 minutos cada um. O método novo foi comparado com o “método convencional” para analisar o potencial como repelente do óleo essencial da meliácea *T. pallida*. Foram utilizadas um total de 1.500 fêmeas de *Ae. aegypti*, em concentrações de 0,2%; 1%; 2%; 3% e 4% do óleo da planta diluído em etanol, em 90 repetições de 15 minutos. O efeito larvicida dos extratos da *T. pallida* foi testado em um total de 300 larvas de 3º instar, durante 24 horas em câmara climatizada (BOD). Os resultados obtidos evidenciaram que o equipamento adaptado para testar o efeito de substâncias sobre mosquitos, pode ser utilizado para avaliação de produtos que possuem como objetivo repelir fêmeas de Culicídeos, pois os experimentos com repelentes sintéticos apresentaram resultado significativo, porém o óleo da *T. pallida* revelou discreto efeito repelente nas concentrações mais elevadas (3% e 4%). A metodologia utilizada é menos agressiva e mais ética não precisando expor o pesquisador ao desconforto das picadas dos mosquitos. Porém, deve-se levar em consideração as possíveis variações nos teores das substâncias ativas presentes no óleo da planta, que podem mostrar resultados contraditórios em diferentes experimentos. Os extratos não apresentaram resultados satisfatórios como larvicidas e necessitam de um refinamento para que seja possível avaliar se, realmente, a planta não tem efeito sobre as larvas de *Ae. aegypti*, bem como de outras espécies de culicídeos ou se existe uma concentração ideal para que os extratos sejam eficientes como inseticidas.

Palavras-chave: Repelência, equipamento teste, óleo essencial, larvicida.

## ABSTRACT

The need of female mosquitoes to undertake the bloodmeal is directly linked to the development of eggs. Being able for blood intake, a female starts a strategy to seek this nutritional source, guided by signals of a host, approaching and getting in contact when the perceived scent is attractive, or not, when inhibited by products that cause repellent. Some chemical products may cause damages to the environment as a whole; therefore, the study of plants with insecticide and repellent properties reinforces the requirement for the use of renewable and rapidly degradable resources. With the purpose to analyze and evaluate a new method to test the repellent, and simultaneously, the effect of extracted substances from the native species *Trichilia pallida* P. Browne on *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762), the present study performed tests with the developed equipment, observing its performance to repel, attract or inhibit females, in addition to evaluate its artificial and natural repellent products. Besides, the potential of the essential oil of *T. pallida* and the larvicide potential of aqueous extracts, hexanic, dichloromethane, methanolic and hidrolact extract, obtained from the extraction of oil in *T. pallida* was also analyzed. The experiments were performed in the breeding room at Departamento de Zoologia of Universidade Federal do Paraná under controlled conditions of temperature and air-humidity. The tests with the new equipment were named as "new method", in which the female specimens had two options: greasy hand or control, though without direct contact with a host. At first, the new method had its performance evaluated through repellent chemical products, namely A, B and C, with 60 replicates of 30 minutes each. The new method was compared to the "conventional method" in order to analyze the repellent potential of the essential oil of the Meliaceae *T. pallida*. A total of 20 females of *Ae. aegypti* were employed in oil plant diluted in ethanol (concentrations 0,2%; 1%; 2%; 3% and 4%) in 90 replicates of 15 minutes each. The extracts larvicide effect was tested in 20 larvae of third instar, per experiment, during 24 hours in BOD chamber with climatic control. The encountered results evidenced that the adapted equipment which tests the effect of products on mosquitoes may be used to the evaluation of products that aim to repel culicid females, because, in higher concentrations, the repellent of *Ae. aegypti* was positively observed. In addition, it is a less aggressive and more ethical methodology which does not need to expose the researcher to the discomfort of mosquito bites. Notwithstanding, one must take into account the possible variations in the tenor of the active substances found in the plant oil that might display conflicting results in different experiments. The extracts did not present satisfactory results, requiring refinements so that it should be possible to evaluate whether the plant really does not have effect over the larvae of *Ae. aegypti*, as well as of other culicid species, or if there is an ideal concentration for the extracts to become efficient insecticides.

Keywords: Repellent. Test equipment. Essential oil. Larvicide.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - DESENHO ESQUEMÁTICO DO EQUIPAMENTO PARA TESTE DE REPELÊNCIA.....	31
FIGURA 2 - EQUIPAMENTO PARA TESTE DE REPELÊNCIA DESENVOLVIDO NA UFPR.....	32
FIGURA 3 - ASPECTO DAS FOLHAS DE <i>Trichilia pallida</i> , COLETADAS NA MATA PRESERVADA PERTENCENTE À FAZENDA DORALICE, LOCALIZADA NO MUNICÍPIO DE IBIPORÃ, PARANÁ.....	33
FIGURA 4 - ASPECTO DOS FRUTOS DE <i>Trichilia pallida</i> , COLETADAS NA MATA PRESERVADA PERTENCENTE À FAZENDA DORALICE, LOCALIZADA NO MUNICÍPIO DE IBIPORÃ, PARANÁ.....	33
FIGURA 5 – SEGMENTO DA FAZENDA DORALICE, IBIPORÃ, PARANÁ, MARGEADA PELO RIO TIBAGI.....	34
FIGURA 6 – PEQUENA ÁREA DA FAZENDA DORALICE, IBIPORÃ, PARANÁ - ASPECTO DA ENTRADA DA MATA PRESERVADA, ONDE FORAM REALIZADAS AS COLETAS.....	35
FIGURA 7 – VISTA PARCIAL DA FAZENDA DORALICE, IBIPORÃ, PARANÁ – ESPÉCIE <i>Trichilia pallida</i> UTILIZADA PARA A COLETA E POSTERIOR EXTRAÇÃO DO ÓLEO, NO INTERIOR DA MATA PRESERVADA .....	35
FIGURA 8 - EQUIPAMENTO DO TIPO CLEVENGER - LABORATÓRIO DE PRODUTOS NATURAIS E ECOLOGIA QUÍMICA (LAPNEQ).....	37
FIGURA 9 - EXPERIMENTO REALIZADO ATRAVÉS DO MÉTODO NOVO PARA TESTE DE REPELÊNCIA E/OU ATRAÇÃO– EM EVIDÊNCIA FÊMEAS DE <i>Aedes aegypti</i> ATRAÍDAS PELA MÃO CONTROLE INSERIDA NA CAIXA LATERAL DO LADO ESQUERDO DO EQUIPAMENTO .....	40
FIGURA 10 - EXPERIMENTO REALIZADO ATRAVÉS DO MÉTODO CONVENCIONAL PARA TESTE DE REPELÊNCIA UTILIZANDO UMA GAIOLA COMUM COM FÊMEAS DE <i>Aedes aegypti</i> .....	41
FIGURA 11 - ASPECTO DE 3 REPÉTIÇÕES DA EXTRAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS DAS FOLHAS E RAMOS DA PLANTA <i>Trichilia pallida</i> UTILIZANDO ÉTER DE PETRÓLEO, DICLOROMETANO E METANOL.....	44
FIGURA 12 - ROTA-EVAPORADOR UTILIZADO PARA SEPARAR OS SOLVENTES ÉTER DE PETRÓLEO, DICLOROMETANO E METANOL DAS SUBSTÂNCIAS EXTRAÍDAS DA PLANTA <i>Trichilia pallida</i> .....	44
FIGURA 13 - PORCENTAGEM DO TOTAL DE FÊMEAS ATRAÍDAS PELAS MÃOS TRATADAS COM OS 3 REPELENTES COMERCIAIS E PELOS CONTROLES, E DAS FÊMEAS QUE PERMANECERAM NO INTERIOR DA CAIXA CENTRAL (n=1.200), DURANTE OS TESTES REALIZADOS COM OS REPELENTES QUÍMICOS SINTÉTICOS, PARA AVALIAÇÃO DO NOVO EQUIPAMENTO.....	49

<b>FIGURA 14 - DIFERENÇA DO NÚMERO TOTAL DE FÊMEAS ATRAÍDAS PELOS REPELENTES COMERCIAIS, SEUS CONTROLES E O NÚMERO DE FÊMEAS QUE NÃO OPTARAM POR NENHUM DOS LADOS (n=1.200) AO FINAL DE 30 MINUTOS DE TESTE, ATRAVÉS DO MÉTODO NOVO, EM CONDIÇÕES CONTROLADAS DE TEMPERATURA E UMIDADE RELATIVA DO AR.....</b>	<b>50</b>
<b>FIGURA 15 - ESTRUTURA MOLECULAR DO DEET (N,N-DIETIL-META-TOLUAMIDA).....</b>	<b>52</b>
<b>FIGURA 16 - ESTRUTURAS MOLECULARES DOS COMPOSTOS DO ÓLEO DE <i>Trichilia pallida</i>, IDENTIFICADAS POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....</b>	<b>54</b>
<b>FIGURA 17: ESTRUTURAS MOLECULARES DOS COMPOSTOS <math>\alpha</math>-PINENO (1), <math>\beta</math>-PINENO (2), 3-CARENO (3), LIMONENO (4), MIRCENO (5), <math>\alpha</math>-TERPINENO (6), CANFENO (7) e 1,2-EPÓXI-PULEGONA (8).....</b>	<b>55</b>
<b>FIGURA 18 - ESTRUTURA MOLECULAR DO COMPOSTO ANGULATINA A.....</b>	<b>56</b>
<b>FIGURA 19 - PORCENTAGEM DO TOTAL DE FÊMEAS ATRAÍDAS PARA CADA CONCENTRAÇÃO DO ÓLEO DE <i>Trichilia pallida</i> NOS TESTES DE REPELÊNCIA ATRAVÉS DO MÉTODO NOVO (n=1.500).....</b>	<b>61</b>
<b>FIGURA 20 - NÚMERO ACUMULADO DE FÊMEAS, POR MINUTO, ATRAÍDAS ATÉ A MÃO CONTROLE E ATÉ A MÃO COM O ETANOL, EM TESTES REALIZADOS PELO MÉTODO NOVO (n=300).....</b>	<b>61</b>
<b>FIGURA 21 - TOTAL DE FÊMEAS ATRAÍDAS NOS TESTES REALIZADOS PELO MÉTODO NOVOCOM ETANOL E SEU CONTROLE (n=300).....</b>	<b>63</b>
<b>FIGURA 22 - NÚMERO ACUMULADO DE FÊMEAS, POR MINUTO, ATRAÍDAS ATÉ A MÃO CONTROLE E ATÉ A MÃO COM O ÓLEO DE <i>Trichilia pallida</i> NA CONCENTRAÇÃO 0,2%, ATRAVÉS DO MÉTODO NOVO (n=300).....</b>	<b>63</b>
<b>FIGURA 23 - TOTAL DE FÊMEAS ATRAÍDAS NOS TESTES REALIZADOS COM ÓLEO DE <i>Trichilia pallida</i> NA CONCENTRAÇÃO 0,2% E SEU CONTROLE, ATRAVÉS DO MÉTODO NOVO (n=300).....</b>	<b>64</b>
<b>FIGURA 24 - NÚMERO ACUMULADO DE FÊMEAS, POR MINUTO, ATRAÍDAS ATÉ A MÃO CONTROLE E ATÉ A MÃO COM O ÓLEO DE <i>Trichilia pallida</i> NA CONCENTRAÇÃO 1%, ATRAVÉS DO MÉTODO NOVO (n=300).....</b>	<b>65</b>
<b>FIGURA 25 - TOTAL DE FÊMEAS ATRAÍDAS NOS TESTES REALIZADOS COM ÓLEO DE <i>Trichilia pallida</i> NA CONCENTRAÇÃO 1% E SEU CONTROLE, ATRAVÉS DO MÉTODO NOVO(n=300).....</b>	<b>66</b>
<b>FIGURA 26 - NÚMERO ACUMULADO DE FÊMEAS, POR MINUTO, ATRAÍDAS ATÉ A MÃO CONTROLE E ATÉ A MÃO COM O ÓLEO DE <i>Trichilia pallida</i> NA CONCENTRAÇÃO 2%, ATRAVÉS DO MÉTODO NOVO(n=300).....</b>	<b>66</b>
<b>FIGURA 27 - TOTAL DE FÊMEAS ATRAÍDAS NOS TESTES REALIZADOS COM ÓLEO DE <i>Trichilia pallida</i> NA CONCENTRAÇÃO 2% E SEU CONTROLE, ATRAVÉS DO MÉTODO NOVO(n=300).....</b>	<b>67</b>

<b>FIGURA 28 - NÚMERO ACUMULADO DE FÊMEAS, POR MINUTO, ATRAÍDAS ATÉ A MÃO CONTROLE E ATÉ A MÃO COM O ÓLEO DE <i>Trichilia pallida</i> NA CONCENTRAÇÃO 3%, ATRAVÉS DO MÉTODO NOVO(n=300).....</b>	<b>68</b>
<b>FIGURA 29 - TOTAL DE FÊMEAS ATRAÍDAS NOS TESTES REALIZADOS COM ÓLEO DE <i>Trichilia pallida</i> NA CONCENTRAÇÃO 3% E SEU CONTROLE, ATRAVÉS DO MÉTODO NOVO(n=300).....</b>	<b>68</b>
<b>FIGURA 30 - NÚMERO ACUMULADO DE FÊMEAS, POR MINUTO, ATRAÍDAS ATÉ A MÃO CONTROLE E ATÉ A MÃO COM O ÓLEO DE <i>Trichilia pallida</i> NA CONCENTRAÇÃO 4%, ATRAVÉS DO MÉTODO NOVO(n=300).....</b>	<b>69</b>
<b>FIGURA 31 - TOTAL DE FÊMEAS ATRAÍDAS NOS TESTES REALIZADOS COM ÓLEO DE <i>Trichilia pallida</i> NA CONCENTRAÇÃO 4% E SEU CONTROLE(n=300).....</b>	<b>70</b>
<b>FIGURA 32 - MÉDIA DO TEMPO, EM MINUTOS, PARA ATRAÇÃO E APROXIMAÇÃO DA PRIMEIRA FÊMEA ATÉ A MÃO COM ÓLEO OU ATÉ A MÃO CONTROLE, NO TESTE REALIZADO ATRAVÉS DO MÉTODO NOVO (n=1.500).....</b>	<b>74</b>
<b>FIGURA 33 - MÉDIA DO TEMPO, EM SEGUNDOS, PARA ATRAÇÃO E POUSO DA PRIMEIRA FÊMEA NA MÃO COM ÓLEO E NA MÃO CONTROLE, NO TESTE REALIZADO ATRAVÉS DO MÉTODO CONVENCIONAL, EM CONDIÇÕES MONITORADAS DE TEMPERATURA E UMIDADE RELATIVA DO AR(n=1.500).....</b>	<b>81</b>
<b>FIGURA 34 - MÉDIA DO TEMPO, EM SEGUNDOS, DA PRIMEIRA PICADA DE UMA DAS FÊMEAS NA MÃO COM ÓLEO E NA MÃO CONTROLE, NO TESTE REALIZADO ATRAVÉS DO MÉTODO CONVENCIONAL(n=1.500).....</b>	<b>82</b>
<b>FIGURA 35 - 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(n=1.500).....</b>	<b>82</b>

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA E CONCENTRAÇÃO RELATIVA (%) DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE <i>Trichilia pallida</i> OBTIDOS POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....	53
TABELA 2 - COMPARAÇÃO DO NÚMERO TOTAL DE FÊMEAS ATRAÍDAS PELO ETANOL E PELAS CONCENTRAÇÕES DO ÓLEO DE <i>Trichilia pallida</i> COM SEUS RESPECTIVOS CONTROLES PELO MÉTODO NOVO.....	62
TABELA 3 - CORRELAÇÃO ENTRE O TEMPERATURA INTERNA E EXTERNA, E UMIDADE RELATIVA DENTRO E FORA DO EQUIPAMENTO TESTE E O TEMPO DE ATRAÇÃO, PARA OS DADOS DOS TESTES REALIZADOS COM ETANOL.....	70
TABELA 4 - CORRELAÇÃO ENTRE O CLIMA DENTRO E FORA DO EQUIPAMENTO TESTE E O TEMPO DE ATRAÇÃO PARA OS TESTES REALIZADOS COM O ÓLEO DE <i>Trichilia pallida</i> NA CONCENTRAÇÃO 0,2%.....	71
TABELA 5 - CORRELAÇÃO ENTRE O CLIMA DENTRO E FORA DO EQUIPAMENTO TESTE E O TEMPO DE ATRAÇÃO, PARA OS TESTES REALIZADOS COM O ÓLEO DE <i>Trichilia pallida</i> NA CONCENTRAÇÃO 1%.....	71
TABELA 6 - CORRELAÇÃO ENTRE O CLIMA DENTRO E FORA DO EQUIPAMENTO TESTE E O TEMPO DE ATRAÇÃO PARA OS TESTES REALIZADOS COM O ÓLEO DE <i>Trichilia pallida</i> NA CONCENTRAÇÃO 2%.....	72
TABELA 7 - CORRELAÇÃO ENTRE O CLIMA DENTRO E FORA DO EQUIPAMENTO TESTE E O TEMPO DE ATRAÇÃO PARA OS TESTES REALIZADOS COM O ÓLEO DE <i>Trichilia pallida</i> NA CONCENTRAÇÃO 3%.....	73
TABELA 8 - CORRELAÇÃO ENTRE O CLIMA DENTRO E FORA DO EQUIPAMENTO TESTE E O TEMPO DE ATRAÇÃO PARA OS TESTES REALIZADOS COM O ÓLEO DE <i>Trichilia pallida</i> NA CONCENTRAÇÃO 4%.....	73
TABELA 9 - DADOS DE TEMPERATURA E UMIDADE RELATIVA DO AR NA SALA DE CRIAÇÃO, DURANTE A REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS, ATRAVÉS DO MÉTODO CONVENCIONAL, COM INDICAÇÃO POR TESTE DO TEMPO DO PRIMEIRO POUSO E DA PRIMEIRA PICADA DE <i>Aedes aegypti</i> E O TOTAL DE POUSOS, DURANTE A EXPOSIÇÃO DO HOSPEDEIRO HUMANO EM SUPERFÍCIE TRATADA COM ETANOL E AO CONTROLE.....	76
TABELA 10 - DADOS DE TEMPERATURA E UMIDADE RELATIVA DO AR NA SALA DE CRIAÇÃO, DURANTE A REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS, ATRAVÉS DO MÉTODO CONVENCIONAL, COM INDICAÇÃO POR TESTE DO TEMPO DO PRIMEIRO POUSO E DA PRIMEIRA PICADA DE <i>Aedes aegypti</i> 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.....	77
TABELA 11 - DADOS DE TEMPERATURA E UMIDADE RELATIVA DO AR NA SALA DE CRIAÇÃO, DURANTE A REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS, ATRAVÉS DO MÉTODO CONVENCIONAL, COM INDICAÇÃO POR TESTE DO TEMPO DO PRIMEIRO POUSO E DA PRIMEIRA PICADA DE <i>Aedes aegypti</i> 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.....	77

**TABELA 12 - DADOS DE TEMPERATURA E UMIDADE RELATIVA DO AR NA SALA DE CRIAÇÃO, DURANTE A REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS, ATRAVÉS DO MÉTODO CONVENCIONAL, COM INDICAÇÃO POR TESTE DO TEMPO DO PRIMEIRO POUSO E DA PRIMEIRA PICADA DE *Aedes aegypti* 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.....** 78

**TABELA 13 - DADOS DE TEMPERATURA E UMIDADE RELATIVA DO AR NA SALA DE CRIAÇÃO, DURANTE A REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS, ATRAVÉS DO MÉTODO CONVENCIONAL, COM INDICAÇÃO POR TESTE DO TEMPO DO PRIMEIRO POUSO E DA PRIMEIRA PICADA DE *Aedes aegypti* 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.....** 79

**TABELA 14 - DADOS DE TEMPERATURA E UMIDADE RELATIVA DO AR NA SALA DE CRIAÇÃO, DURANTE A REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS, ATRAVÉS DO MÉTODO CONVENCIONAL, 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 4% E AO CONTROLE.....** 80

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
1.1. OBJETIVO GERAL.....	<b>33</b>
1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	<b>33</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>34</b>
2.1. Equipamento elaborado para testar repelência ou atração.....	<b>34</b>
2.2. Produtos repelentes sintéticos comerciais.....	<b>35</b>
2.3. <i>Trichilia pallida</i> .....	<b>36</b>
2.3.1. Aspecto morfológico da <i>Trichilia pallida</i> .....	<b>36</b>
2.3.2. Local de coleta da <i>Trichilia pallida</i> .....	<b>37</b>
2.3.3. Extração e análise do óleo essencial.....	<b>38</b>
2.4. <i>Aedes aegypti</i> em testes de repelência.....	<b>40</b>
2.4.1. Testes com repelentes através do método novo.....	<b>41</b>
2.4.2. Teste com óleo de <i>T. pallida</i> .....	<b>42</b>
2.4.3. Teste com óleo de <i>T. pallida</i> através do método novo.....	<b>42</b>
2.4.4. Teste com óleo de <i>T. pallida</i> através do método convencional.....	<b>43</b>
2.5. Bioensaios com extratos.....	<b>44</b>
2.5.1. Hidrolato .....	<b>45</b>
2.5.2. Extrato aquoso .....	<b>45</b>
2.5.3. Extrato hexânico (éter de petróleo).....	<b>45</b>
2.5.4. Extrato diclorometano.....	<b>46</b>
2.5.5. Extrato metanólico.....	<b>46</b>
2.6. Análise Estatística.....	<b>48</b>
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>49</b>
3.1. Método novo x repelentes químicos.....	<b>49</b>
3.2. Natureza química do óleo essencial de <i>Trichilia pallida</i> .....	<b>54</b>
3.3. Método novo x óleo essencial de <i>Trichilia pallida</i> .....	<b>62</b>
3.4. Método convencional x óleo essencial de <i>Trichilia pallida</i> .....	<b>77</b>
3.5. Bioensaios com extratos.....	<b>85</b>
<b>4. CONCLUSÕES</b> .....	<b>87</b>
<b>5. SUGESTÕES</b> .....	<b>88</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>89</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A estratégia usada pelos mosquitos para encontrar as fontes sangüíneas corresponde ao rastreamento ativo combinado com a espera em locais freqüentados pelos hospedeiros. Sob o ponto de vista epidemiológico, tais lugares podem ser representados pelos domicílios humanos e abrigos de animais domésticos (FORATTINI, 2002).

Nos culicídeos os estímulos de orientação são percebidos dependendo das condições ideais de fatores externos, como temperatura, umidade, velocidade do vento, chuva e intensidade de luz, e de fatores internos, como estado fisiológico, sexo, idade e preferência alimentar, que influenciam na resposta da fêmea aos odores do hospedeiro. Encontrando o ambiente favorável para a busca do hospedeiro, a fêmea se orienta através dos órgãos dos sentidos, como a visão e o olfato, que é o responsável pela percepção das substâncias atrativas que são liberadas pelo hospedeiro através da respiração e do suor. Todos estes estímulos contribuem para assinalar ao mosquito a presença do hospedeiro que lhe será a fonte sangüínea (FORATTINI, 2002).

Após o encontro do local, os estímulos visuais vão desempenhar um papel importante na ativação do comportamento de busca e localização do hospedeiro a longa distância, como o contraste e intensidade de luz, enquanto que a distâncias mais curtas, os sinais químicos ajudam os mosquitos a identificar uma pluma de odor que os orienta até o hospedeiro (TORRES-ESTRADA & RODRIGUEZ, 2003). Ao se orientar primeiramente através da visão, além da intensidade de luz que é percebida pelos mosquitos, eles também conseguem discernir um mínimo de movimento, cor e formas, sendo para os padrões humanos uma percepção dos aspectos mais grosseiros do ambiente (BIDLINGMAYER, 1994). Esse fato ocorre principalmente com espécies diurnas e agressivas, como os representantes de *Aedes* e *Psorophora*, que estão adaptados a realizar o repasto sangüíneo nos hospedeiros em atividade. Não se aplica às espécies de hábito noturno, como *Anopheles* e *Culex*, que preferem abordar o hospedeiro em situação pouco reativa,

como o sono, onde o odor do hospedeiro é considerado o mais importante, pois o estímulo visual é mínimo ou até inexistente (MBOERA *et al.*, 1998).

O sucesso das fêmeas em realizar o repasto sanguíneo depende da localização do hospedeiro, sendo assim estímulos, internos e externos, combinados desencadeiam alguns eventos com a finalidade de facilitar o seu encontro pelos mosquitos.

A fase de receptividade ao hospedeiro ocorre quando a fêmea, após a emergência e o amadurecimento fisiológico, encontra-se apta para a ingestão de sangue e, de acordo com a espécie, adota uma estratégia para a busca deste recurso nutricional. Na fase de ativação o mosquito entra em contato com algum sinal do hospedeiro, que pode ser visual ou olfativo e vai orientá-lo em direção a este estímulo; e na fase final de atração a fêmea aproxima-se do hospedeiro, entrando em contato ou não (PINTO, 2001). Os estímulos olfativos, chamados de cairomônios, são sinais que beneficiam o receptor, como os atraentes e os fagoestimulantes, substâncias que estimulam a alimentação dos predadores ou parasitas, geralmente observado nos insetos hematófagos (PAIVA & PEDROSA-MACEDO, 1985; HOWSE *et al.*, 1998).

Diversas substâncias químicas agem como cairomônios na atratividade dos mosquitos pelo hospedeiro, entre as substâncias eliminadas principalmente por humanos e animais, encontra-se o dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) liberado através da respiração (EDMAN, 1979) e o ácido láctico liberado pelo suor. Ao entrar em contato com estímulos de temperatura e umidade do corpo do hospedeiro, através de termorreceptores e higrorreceptores localizados nas antenas, a fêmea decide se vai ou não introduzir a probóscide para realizar o repasto sanguíneo.

Para a maioria dos seres vivos os sinais químicos desempenham um papel relevante na transmissão de informações biologicamente importantes, sendo a comunicação química entre indivíduos feita com auxílio de substâncias voláteis biosintetizadas pelo organismo e excretadas para o ambiente pelo emissor. Este sinal vai então provocar uma resposta do indivíduo receptor, que pode ser imediata ou a longo prazo, alterando o seu comportamento ou a sua fisiologia (PAIVA & PEDROSA-MACEDO, 1985).

O sistema nervoso dos insetos constitui a conexão entre os órgãos sensoriais que captam os estímulos do ambiente, e os órgãos executores das respostas representados principalmente pela musculatura e sistema glandular. O sistema nervoso é dividido em três partes, sendo uma delas conhecida como sistema nervoso periférico onde são encontrados os neurônios sensoriais que estão associados aos órgãos dos sentidos (FORATTINI, 1996).

Os aspectos fundamentais dos sinais olfativos, percebidos pelos órgãos dos sentidos nos mosquitos, têm revelado o envolvimento de receptores olfativos nos sensilos das antenas e no palpo maxilar (ZWIEBEL & TAKKEN, 2004). A resposta ao CO<sub>2</sub> é apresentada a partir do palpo maxilar na maioria dos culicídeos, enquanto as células receptoras de outros voláteis do hospedeiro são predominantemente encontradas na antena, embora diversas células receptoras no palpo maxilar também podem responder a outros voláteis (GRANT & O'CONNELL, 1996 *Apud* ZWIEBEL & TAKKEN, 2004).

A percepção de estímulos olfativos, nos insetos em geral, é um fenômeno altamente complexo devido às interações dos receptores com o sistema nervoso central, onde a informação é integrada e interpretada, traduzindo-se nas respostas comportamentais, e a resposta final é ainda influenciada pelo fato do indivíduo ter sido anteriormente exposto ao estímulo ou não (PAIVA & PEDROSA-MACEDO, 1985).

Todo o processo que desencadeia na necessidade das fêmeas em realizar o repasto sangüíneo está diretamente ligado ao desenvolvimento dos ovos a partir dos produtos resultantes da digestão do sangue ingerido, os quais são convertidos em substâncias protéicas integrantes do vitelo. A partir do momento em que a fêmea necessita sair em busca de alimento há normalmente uma preferência por hospedeiro, no qual ocorre diferenciação entre as populações de culicídeos. Zoofílicos, alimentando-se preferencialmente em animais, ou antropofílicos, preferindo o homem como hospedeiro, e nesse caso o mosquito adquire hábitos em relação à fonte e passa a freqüentar o mesmo ambiente, desenvolvendo a domiciliação, passando a se alimentar dentro ou fora dos domicílios, chamados de endofílicos e endofágicos ou exofílicos e exofágicos, respectivamente.

Devido às diferenças que existem de composição e quantidade dos compostos voláteis liberados nas emanações de humanos em relação aos liberados pelos animais, os mosquitos zoofílicos que preferem hospedeiro animal, respondem preferencialmente ao CO<sub>2</sub>, como observado em *Anopheles (Cellia) quadriannulatus* Theobald, 1911; e ao octenol liberados na respiração, e os antropofílicos que preferem hospedeiro humano, respondem ao ácido láctico e uma variedade de compostos do suor, como os ácidos graxos que mostram efeito atrativo para *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) (TORRES-ESTRADA & RODRIGUEZ, 2003).

Há também uma variação, de pessoa para pessoa, em relação à concentração dos compostos que são liberados. Relatos apontam pessoas adultas como sendo mais atrativas do que crianças para *Anopheles (Nyssorhynchus) albimanus* Wiedemann, 1820; *Anopheles gambiae* Patton, 1905 e *Anopheles (Cellia) farauti* Laveran, 1902, e homens são mais atrativos para *Ae. aegypti* do que mulheres (KNOLS *et al.*, 1995).

Análises da composição das emanações da pele humana revelaram a presença de 300 a 400 compostos químicos, incluindo ácidos carboxílicos, aldeídos, álcoois, cetonas, amidos, sulfidos, entre outros, porém somente poucos desses compostos, como ácido láctico, octenol e CO<sub>2</sub> têm se mostrado mais atrativos para mosquitos (PURI *et al.*, 2006) e na maioria das investigações a atração ocorre quando os compostos estão combinados.

## **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 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 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). A variabilidade na atratividade de humanos por *An. gambiae* existe e pode ser atribuída às diferenças na composição das emanações liberadas da pele abrangendo odores do corpo, aquecimento e umidade (MUKABANA *et al.*, 2002).

Observações das respostas de pouso de *An. gambiae*, uma espécie altamente antropofílica, utilizando suor humano, ácido láctico, ácido 2-oxopentanóico e os ácidos carboxílicos, mostraram que os três primeiros são mais atrativos do que o último (HEALY & COPLAND, 2000). A análise do comportamento desta espécie de *Anopheles* em relação aos compostos do suor humano, também mostrou respostas de atração positiva (CONSTANTINI *et al.*, 2001; HEALY *et al.*, 2002).

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).

### **Dióxido de carbono**

Dentre os estímulos olfativos, o CO<sub>2</sub> é o cairomônio que tem sido mais investigado em diferentes famílias de Dipteros. 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), mas à concentrações acima do normalmente exalado por um humano, o CO<sub>2</sub> torna-se atrativo (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).

Uma comparação da atratividade de três diferentes padrões de CO<sub>2</sub> liberado, 25 mL/min (galinha), 250 mL/min (homem) e 2.500 mL/min (cavalo ou vaca), mostraram que o aumento do CO<sub>2</sub> atraiu proporcionalmente mais *Culex (Culex) tarsalis* Coquillet, 1896, porém diminuiu a atração para *Cx. quinquefasciatus*, *Aedes (Ochlerotatus) nigromaculis* (Ludlow, 1906) e *Aedes (Ochlerotatus) dorsalis* Meigen, 1830 (KLINE *et. al.*, 1990).

A atratividade de pintinhos, com peso igual, de dois a cinco dias de idade em comparação com pintinhos de três semanas de idade, mostrou que *Ae. aegypti*

prefere os pintinhos mais velhos enquanto *Cx. tarsalis* não tem preferência. Teoricamente um pintinho jovem produz 400mL de CO<sub>2</sub>/hora e um mais velho 350ml de CO<sub>2</sub>/hora, uma diferença menor do que 1mL de CO<sub>2</sub>/minuto, a qual significa que a preferência de *Ae. aegypti* pelo pintinho mais velho não ocorre primeiramente devido à quantidade de CO<sub>2</sub> produzida (McIVER, 1968).

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.

Voláteis testados na combinação com CO<sub>2</sub> atraíram um número significativamente maior de fêmeas de *An. gambia*, nas armadilhas iscadas com ácido láctico combinado com CO<sub>2</sub>, do que nas armadilhas iscadas somente com CO<sub>2</sub> (MURPHY *et. al.*, 2001). Na respiração humana, outros voláteis como o CO<sub>2</sub>, não disputam um papel importante no comportamento de busca do hospedeiro por *An. gambiae*, entretanto, confirmam que os cairomônios usados pelas fêmeas para localizar o hospedeiro humano são relacionados à pele e de origem microbiana (DEJONG & KNOLS, 1995). 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).

### **Associação do ácido láctico ou CO<sub>2</sub> a diferentes compostos**

A combinação 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 (BERNIER *et. al.*, 2003).

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 a 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 à combinação de ácido láctico e CO<sub>2</sub>, mas pode responder também à 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 (SCHRECK *et. al.*, 1981 e BERNIER *et. al.*, 2002).

EIRAS & JEPSON (1991) registraram que o ácido láctico e o suor da mão sozinhos não atraíram as fêmeas, mas quando combinados com elevada quantidade de CO<sub>2</sub> passaram a ser atrativos.

Ácido láctico e octenol adicionados ao CO<sub>2</sub> aumentaram a captura de *Aedes (Ochlerotatus) taeniorhynchus* (Wiedemann, 1821), *Anopheles (Anopheles) atropos* Dyar & Knab, 1906 e *Anopheles (Anopheles) crucians* Wiedemann, 1828, enquanto para espécies de *Culex (Melanoconin) spp.* Theobald, 1992 o ácido láctico reduziu as capturas e o octenol aumentou, sendo observado o oposto para *Wyeomyia (Wyeomyia) mitchellii* (Theobald, 1905) e *Culex (Culex) nigripalpus* Theobald, 1901 (KLINE *et. al.*, 1990).

Devido à urbanização e o turismo crescente na costa da região sudoeste de Queensland, Austrália, armadilhas de vigilância e controle de vetores do vírus Ross River, como *Aedes (Ochlerotatus) vigilax* (Skuse, 1889) e *Culex (Culex) annulirostris* Skuse, 1889, foram utilizadas com CO<sub>2</sub> e octenol, mostrando que o octenol sozinho foi pouco atrativo para *Ae. vigilax*, aumentando significativamente sua captura e também de *Aedes (Verrallina) funereus* (Theobald, 1903) quando ao octenol foi adicionado CO<sub>2</sub>, sugerindo que o octenol pode ser considerado como um suplemento para armadilhas com CO<sub>2</sub> para vigilância de mosquitos transmissores de arbovírus na Austrália, contudo, capturas de *Cx. annulirostris* e *Culex (Culex) sitiens* Wiedemann, 1828 não variaram significativamente (KEMME *et. al.*, 1993).

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.

## **Armadilhas e equipamentos**

Pesquisas que avaliam o potencial de atração que os odores humanos causam nos mosquitos, muitas vezes são realizadas em laboratório através de equipamentos adaptados para este tipo de análise. EIRAS & JEPSON (1991) e GEIER & BOECKH (1999) observaram o comportamento de *Ae. aegypti* diante do ácido láctico e do CO<sub>2</sub>, provenientes das mãos, através de um modelo de túnel de

vento em forma de tubo em Y, chamado de olfatômetro, e constataram o potencial atrativo dessas substâncias. O bioensaio em túnel de vento apresentado é especialmente adaptado para o teste de comportamento dos efeitos de odores sintéticos e também de odores de origem natural, devido à rápida resposta dos mosquitos, a sensibilidade e a simplicidade dos procedimentos testados. GEIER *et al.* (1999) também analisaram o comportamento de *Ae. aegypti* diante do ácido láctico e do CO<sub>2</sub> provenientes da pluma de odores da pele humana, através do método do túnel de vento.

O túnel de vento em forma de tubo em Y pode ser eficiente principalmente para bioensaios com a finalidade de avaliar o efeito atrativo de odores, sintéticos ou naturais, pois nas duas extremidades menores do tubo são liberados os odores que seguem, com o vento liberado, até o tubo principal de onde virão as fêmeas que poderão optar pelo lado mais atrativo.

Bioensaios em túnel de vento não podem ser realizados para investigar o comportamento dos mosquitos quando expostos à estímulos físicos ou a gradientes de temperatura, pois a pluma de odor pode difundir para cima. Porém, EIRAS & JEPSON (1994) usaram um plano alternativo para investigar os efeitos do estímulo do odor humano nos mosquitos em uma área fechada. Utilizando o olfatômetro descrito por Feinsod & Spielman (1979) conseguiram investigar simultaneamente a interação entre os estímulos físicos (calor e umidade) e químicos (ácido láctico e odor humano). Utilizando vapores de água e correntes de convecção, obtiveram uma resposta altamente significativa para a atratividade de *Ae. aegypti* aos odores das mãos humanas (EIRAS & JEPSON, 1994).

MBOERA *et al.* (1998) analisaram o comportamento de fêmeas de *Cx. quinquefasciatus* frente a estímulos com odores variados, através de um olfatômetro com duas opções de escolha. O equipamento adaptado, no sentido horizontal, oferecia às fêmeas duas opções de entrada, uma com o odor e outra com o controle, ambas localizadas uma ao lado da outra, porém sem ocorrer interferência e mistura de odores.

Em uma gaiola experimental desenvolvida por McIVER (1968) com um prato girando, juntamente com um tipo de armadilha adesiva, foi testada a preferência por

odores de aves jovens e camundongos, mostrando resultados semelhantes ao estudo de campo onde *Ae. aegypti* mostrou maior atratividade por camundongos.

Utilizando uma técnica de armadilha refrigerada para captura de odores de animais que possibilita a separação de odores não químicos de CO<sub>2</sub>, observou uma preferência onde o CO<sub>2</sub> ocorria em maior abundância, independente de onde estava sendo liberado (McIVER, 1968).

Testes em campo para avaliar odores atrativos geram bons resultados e podem ser realizados de maneira simples. KNOLS *et al.*, 1995 utilizando barracas ocupadas por humanos, observaram que determinadas espécies de mosquitos respondem de diferentes formas às substâncias de origem bacteriana, pois algumas pessoas são mais atrativas do que outras, e mesmo após desocupadas a atratividade dentro das barracas persistiu por algum tempo. Resultado semelhante foi obtido por MURPHY *et al.* (2001) através de armadilhas luminosas operadas próximas de cabanas onde pessoas dormiam, permanecendo ligadas durante toda a noite atraindo o máximo de insetos possível, principalmente espécies do gênero *Anopheles*, sendo coletados no período da manhã.

A armadilha luminosa é uma opção para captura, não só de mosquitos como de outros insetos, possível de ser utilizada próxima de abrigos humanos ou de animais e também no interior ou borda de matas, somente com luz, com odores atrativos adaptados na armadilha ou através de iscas, como utilizado por TISSOT & NAVARRO (2004) em estudo para investigar a preferência por hospedeiro e estratificação de culicídeos em área de remanescente florestal.

ANDRADE & BUENO (2001b) avaliaram aparelhos eletrônicos repelentes de mosquitos introduzindo a mão com o aparelho ligado e desligado em gaiolas com fêmeas de *Aedes (Stegomyia) albopictus* Skuse, 1894, na comparação final constataram falhas na eficácia desse recurso.

A metodologia utilizada para avaliar o efeito repelente de produtos ou equipamentos, normalmente, se resume à introdução da mão de um voluntário impregnada com o produto ou da mão segurando o equipamento repelente, dentro de uma gaiola com um número elevado de mosquitos, sendo estipulado um tempo de teste que pode variar, e ao final realizada a contagem das picadas ou das fêmeas atraídas. Esse método muitas vezes mostra-se eficaz, porém a exposição de uma

pessoa ao desconforto e incomodo, devido às picadas, não parece ser o modo mais ético para investigação de repelentes.

ODALO *et. al.* (2005) avaliaram o efeito repelente de seis espécies diferentes de plantas para *An. gambiae s.s.*, e obtiveram resultado significativo utilizando o método de introduzir a mão, a ser oferecida às fêmeas de mosquitos, coberta com óleo essencial da planta, durante três minutos. A mesma metodologia, porém utilizando parte do dedo humano e da superfície da pele de um rato jovem, foi adotada por ANDRADE & BUENO (2001a) para comparação dos métodos de análise utilizando cinco produtos repelentes.

Utilizando um olfatômetro modificado do original descrito por Feinsod & Spielman (1979), DOGAN & ROSSIGNOL (1999) investigaram o comportamento de fêmeas de *Ae. aegypti* ao discriminar entre atração, inibição e repelência, de 22 formulações químicas e oito diluições com DEET. O equipamento funcionava no sentido vertical, diferente da maioria que funciona no sentido horizontal, as fêmeas eram liberadas na câmara do meio e tinham a opção de se deslocar em direção à câmara inferior onde estava o estímulo, em direção a câmara superior, o controle, ou então permanecerem na câmara do meio sendo inibidas, por um período de oito minutos, ao final foi registrado o número de mosquitos que estavam próximos da parte superior, da inferior e do meio.

### **Repelentes sintéticos**

Um dos compostos químicos considerados como o mais eficiente é o DEET (N,N-dietil-meta-toluamida), formulado para uso tópico como repelente de insetos em 1953 e comercializado a partir de 1956 (ROBBINS & CHERNIACK, 1986), pode ser encontrado na formulação de vários produtos utilizados atualmente.

Recentemente DITZEN *et. al.* (2008) analisaram o comportamento de *An. gambiae* e de *Drosophila melanogaster* (Meigen, 1830) (Brachycera: Drosophilidae), testaram as respostas eletrofisiológicas dos neurônios sensoriais olfatórios nas antenas dos insetos. Os resultados mostraram que, em ambos, o DEET bloqueia as respostas desses neurônios a odores normalmente atraentes.

Estimativas baseadas em entrevista e vendas em uma cidade da Tanzânia, constataram que 2,5 milhões de residentes chegam a gastar até um milhão de dólares por mês em produtos repelentes. Globalmente, o mercado desses produtos atinge um valor de dois bilhões de dólares por ano (PATES *et al.*, 2002).

ANDRADE & BUENO (2001a) avaliaram comparativamente repelentes sintéticos comerciais para proteção pessoal contra fêmeas de *Ae. albopictus* e observaram efeito positivo para estes produtos. Enquanto GOVERE *et al.* (2000) compararam três repelentes comercializados no Sul da África, sendo um deles o DEET, utilizando uma espécie de *Anopheles*, e obtiveram resultados com níveis satisfatórios de proteção pessoal desses produtos como repelentes.

Em um Parque Nacional no Sul da África, GOVERE *et al.* (2001) observaram que o DEET apresentou resultados positivos na proteção contra o vetor local da malária *Anopheles arabienses* Patton, 1905, reduzindo o número de picadas. Nesta mesma localidade, DURRHEIM & GOVERE (2002) constataram a redução de picadas, da espécie citada, de 80 para 69% ao aplicar 15% de DEET.

O DEET mesmo sendo utilizado para repelência, de acordo com DOGAN *et al.* (1999) pode ter um efeito atrativo. O ácido láctico, presente no suor humano, é atrativo para os mosquitos, sendo constatado que na ausência de um hospedeiro que estivesse liberando ácido láctico, DEET foi atrativo e na presença do hospedeiro liberando ácido láctico o DEET foi inibidor.

### **Efeito das substâncias extraídas de vegetais sobre os insetos**

A toxicidade de uma substância química em insetos não a qualifica necessariamente como um inseticida. Diversas propriedades devem estar associadas à atividade, tais como eficácia mesmo em baixas concentrações, ausência de toxicidade frente a mamíferos e animais superiores, ausência de fitotoxicidade, fácil obtenção, manipulação e aplicação, viabilidade econômica e não ser cumulativa no tecido adiposo humano e de animais domésticos. Dentro da classificação de inseticidas são incluídas também substâncias que repelem e que atraem insetos (VIEGAS JUNIOR, 2003).

O efeito repelente de plantas sobre insetos também tem sido avaliado. Espécies vegetais pertencentes à família Meliaceae, ordem Rutales, têm se destacado por possuírem composição química semelhante e conter compostos limonóides com ação contra várias espécies de insetos, além de geralmente possuir baixa toxicidade (MARTINEZ, 2002).

Os compostos quando extraídos podem mostrar sua eficiência na proteção pessoal, tal como o óleo obtido da semente de *Carapa guianensis* Aubl., espécie pertencente à família Meliaceae conhecida popularmente como andiroba, que confirma sua atividade larvicida, inseticida e de repelência contra os mosquitos *A. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus*.

Substâncias obtidas do chá das folhas e o extrato dos frutos de *Melia azedarach* L. (família Meliaceae), de origem asiática, conhecida como cinamomo, são inseticidas. SOUZA & VENDRAMIM (2001) no estudo da atividade inseticida de extratos aquosos de meliáceas, em mosca-branca (*Bemisia tabaci*, Hemiptera, Aleyrodidae), constataram efeito ovicida apenas com os extratos de frutos verdes e folhas de *M. azedarach*.

Há muito tempo tem-se pesquisado a habilidade da espécie *Azadirachta indica* A. de Jussieu (família Meliaceae) em repelir insetos, sendo descrita pela primeira vez na literatura em 1928 e 1929 por dois cientistas Indianos, R.N. Chopra e M.A Husain, porém sua importância foi demonstrada somente em 1962.

O nim, como é conhecida popularmente a *A. indica*, é originária da Índia e de Myanmar, é usada principalmente como planta medicinal, sombreadora, recentemente como inseticida, adubo, na produção de madeira, entre outros, tem demonstrado ser eficaz em vários aspectos, causando efeito em mais de 500 espécies de insetos, tais como envenenamento e repelência de larvas e adultos, impede que as fêmeas depositem ovos e inibe o desenvolvimento de ovos, larvas e pupas, entre outros efeitos (MARTINEZ, 2002).

O óleo de nim destaca-se como um produto ecologicamente correto e eficiente. É totalmente isento de efeitos nocivos para animais e até o momento não representa perigo aos inimigos naturais e aos insetos benéficos. Seu poder controlador de insetos está relacionado a uma série de ingredientes ativos, sendo os principais conhecidos como tetranortriterpenóides, mais especificamente limonóides,

este grupo que engloba uma série de substâncias é característico de espécies pertencentes à família Meliaceae.

Os limonóides representam o nível máximo na seqüência de produção de terpenóides, em plantas que normalmente não são atacadas por insetos (VIEGAS JUNIOR, 2003).

SHARMA *et al.* (1995) avaliaram a ação repelente do óleo de nim, em campo, sobre diferentes espécies de culicídeos e constataram que ele pode ser aplicado como medida de proteção pessoal contra picadas, principalmente para espécies dos gêneros *Anopheles*, *Aedes* e *Culex*.

A utilização de óleos essenciais obtidos através da destilação teve origem na China, expandido posteriormente ao ocidente, aperfeiçoando-se. O seu desenvolvimento industrial surgiu na Europa, mais exatamente na Grécia. Na destilação ocorre o processo de separação das misturas líquidas, baseado na diferença de composições dos constituintes nas fases líquida e de vapor em equilíbrio, devido à diferença de volatilidade entre os componentes do líquido.

DUA *et al.* (1995) testaram creme de nim contra *Ae. albopictus*, *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus*, entre outras espécies, e mencionaram que a sua aplicação pode ser uma alternativa segura e adequada de proteção contra mosquitos, pois a aplicação do creme mostrou-se eficaz como repelente por aproximadamente 4 horas.

O estímulo para realização de novas pesquisas com espécies pertencentes à família Meliaceae, com o objetivo de encontrar novas espécies com atividade inseticida e novos compostos, parte dos bons resultados obtidos com a utilização do nim.

Do mesmo modo que os extratos de nim, os extratos das demais meliáceas também podem causar repelência, alterar o crescimento, prolongar o desenvolvimento, impedir a muda, afetar a reprodução, causar mortalidade, entre outros efeitos, sobre vários grupos de insetos (MARTINEZ, 2002).

Apesar de serem menos pesquisadas que o nim e o cinamomo, algumas meliáceas pertencentes ao gênero *Trichilia* L., subfamília Melioideae onde também encontram-se os gêneros *Melia* e *Azadirachta*, possuem potencial como inseticida. Os seus extratos são conhecidos por possuírem uma variedade de propriedades

biológicas, incluindo analgésico, inseticida e atividade inibidora de crescimento em insetos. Sua atividade contra insetos tem sido atribuída ao grupo dos tetranortriterpenóides que inclui o hirtin e o trichilin (SIMMONDS, 2001). O estudo da *Trichilia* também se destaca por ser um dos gêneros com maior número de espécies, cerca de 70, e por se apresentar amplamente distribuída nas regiões tropicais das Américas, onde foi pouco explorado até então (BOGORNÍ & VENDRAMIM, 2003).

O efeito de *Trichilia havanensis* Jacq. em larvas do besouro da batata (*Leptinotarsa decemlineata*, Coleoptera, Chrysomelidae) foi observado no Colorado, onde os compostos do extrato da planta refletiram no modo de ação das proteases digestivas e nas enzimas de detoxificação do inseto (ORTEGO *et al.*, 1999).

WHEELER & ISMAN (2001) observaram uma forte atividade contra picada de formiga no uso do extrato de *Trichilia americana* Pennington, e WHEELER *et al.* (2001) incluíram o extrato de várias espécies dessa planta na dieta artificial de larvas de lepidoptera (*Spodoptera litura*, Lepidoptera, Noctuidae), algumas das espécies reduziram significativamente o crescimento das larvas após 7 e 10 dias. Já haviam relatos referente à redução de até 50% no crescimento dessas larvas de lepidoptera, sendo que o extrato da casca mostrou ser o tecido mais ativo em relação às outras partes da planta (XIE *et al.*, 1994).

Estudos utilizando 3% do extrato do caule de *Trichilia pallida* P. Browne, conhecida popularmente como catiguá, mostraram eficiência como inseticida sobre as lagartas-do-cartucho do milho, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae), causando 86% de mortalidade. A adição de extratos de folhas e ramos da mesma espécie obtidos com acetato de etila, no alimento dessas lagartas, prolongou a fase larval e reduziu o peso das pupas. A traça-do-tomateiro, *Tuta absoluta* (Lepidoptera, Gelechiidae), também apresentou suscetibilidade aos extratos aquosos de folhas e ramos de *T. pallida*, sendo que a 5% (p/v) os extratos causaram 80% de mortalidade das lagartas em laboratório (MARTINEZ, 2002).

SOUZA & VENDRAMIM (2001) também desenvolveram experimentos para avaliar a atividade inseticida do extrato aquoso de *T. pallida* em mosca-branca, *B. tabaci*, e observaram que os ramos foram a única estrutura que proporcionaram mortalidade de ovos em relação ao córtex e às folhas.

A variação no efeito de uma planta inseticida em função da estrutura vegetal utilizada para o preparo do extrato, se deve ao fato de os compostos fitoinseticidas não estarem distribuídos uniformemente por toda a planta (SOUZA & VENDRAMIM, 2001).

BALANDRIN *et al.* (1988) constataram, em *A. indica*, que do total dos 25 componentes voláteis que haviam sido identificados até aquele período, cerca de 75% encontravam-se nas sementes e o demais estavam presentes em outras partes da planta.

Para *Trichilia* esse efeito diferenciado também é conhecido. A raiz e o córtex de *T. roka* apresentam atividade inseticida, provavelmente devido à presença de sendamina e 7-acetiltriquilina (GRAINGE & AHMED, 1988 *Apud* SOUZA & VENDRAMIM, 2001), substâncias que inibem a alimentação e o crescimento de diversas espécies de insetos (KLOCKE, 1987).

O gênero *Trichilia* P. Browne pertence à família Meliaceae e conta com quase 70 espécies distribuídas por toda a América tropical, África e região Indo-Malaia (SOUZA *et al.*, 2001).

A espécie *Trichilia pallida* conhecida popularmente como baga-de-morcego ou catiguá, encontra-se amplamente dispersa por quase todo o país desde a região Amazônica até o Paraná, faltando apenas no Nordeste (HARRY, 1998).

A *T. pallida* é extremamente variável, medindo de 4 a 25 m de altura, dotada de copa globosa, com brotos sem escamas. Possui o tronco ereto, medindo de 15 a 25 cm de diâmetro. As folhas são compostas imparipenadas, trifolioladas ou unifolioladas, com 1 a 9 folíolos subcoriáceos e glabros de 9 a 20 cm de comprimento. Inflorescências em fascículos axilares com flores unissexuadas (plantas geralmente dióicas). Fruto em cápsula obovóide, deiscente, com uma única semente que ao abrir-se deixa expor um arilo vermelho muito vistoso que envolve a semente (HARRY, 1998).

*T. pallida* é uma planta semidecídua, heliófita ou de luz difusa, seletiva higrófila, secundária, característica de matas de galeria e florestas úmidas. Possui dispersão ampla porém descontínua e esparsa ao longo de sua área de distribuição, com frequência baixa. Produz anualmente grande quantidade de sementes viáveis, amplamente disseminadas pela avifauna (HARRY, 1998).

Essa espécie tem o hábito de formar agrupamentos distantes um dos outros com uma média de 10 indivíduos por grupo, e uma densidade média de seis indivíduos por hectare de mata ciliar (ZIMBACK, 2004).

Floresce quase o ano todo, ocorrendo com maior intensidade durante os meses de novembro a fevereiro, e os frutos amadurecem principalmente entre dezembro e março (HARRY, 1998). Porém segundo PATRÍCIO & CERVI (2005) a época de floração no estado do Paraná ocorre entre janeiro e junho, tendo frutos maduros a partir de maio.

De acordo com MORELLATO (2004) *in* MORELLATO (1996) as flores de *Trichilia pallida* são atrativas para um grande número de polinizadores incluindo vespas e abelhas, mas os principais polinizadores são dípteros da família Syrphidae.

Extratos de plantas vêm sendo utilizados pelo homem desde a Idade Antiga, numa prática que persiste até hoje, com mais de 2.000 espécies de plantas conhecidas por suas propriedades inseticidas (VIEGAS JUNIOR, 2003).

Atualmente *Ae. aegypti* transmissor do vírus da dengue e da febre amarela, apresenta uma ampla dispersão em áreas urbanas por todo o mundo devido ao seu comportamento sinantrópico e ao hábito antropofílico. Por ser uma espécie de importância médica e que mostra maior atração pelo ácido láctico (ZWIEBEL & TAKKEN, 2004) vem sendo utilizada como objeto de estudo em pesquisas para o desenvolvimento de estratégias de combate a larvas e adultos. Formas imaturas são monitoradas através de bioensaios com substâncias larvicidas (ANSARI *et al.*, 2000; SIMAS *et al.*, 2004; FURTADO *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2006; ABDELKRIM & MEHLHORN, 2006). O comportamento de busca do local para oviposição e do hospedeiro para a alimentação pelas fêmeas é observado utilizando organismos vivos, substâncias químicas ou vegetais com potencial repelente (NAVARRO *et al.*, 2003; LICCIARDI *et al.*, 2006).

Constatando os danos que os produtos químicos podem causar no ambiente como um todo, o estudo de plantas com propriedades inseticidas e repelentes reforça a necessidade da utilização de recursos renováveis e rapidamente degradáveis. Estas vantagens são atribuídas ao emprego de substâncias extraídas de plantas silvestres quando comparadas ao emprego dos produtos sintéticos, além do desenvolvimento da resistência dos insetos a essas substâncias ser um processo

lento, pois são compostas da associação de vários princípios ativos, são de fácil acesso e apresentam baixo custo (ROEL, 2001).

Com o objetivo de analisar e avaliar um novo método para testes de repelência de *Ae. aegypti* ao efeito das substâncias extraídas da planta *T. pallida*. O presente estudo buscou realizar testes com o novo equipamento desenvolvido, observar o seu desempenho em repelir, atrair ou inibir as fêmeas do mosquito e avaliar sua eficácia em testes com produtos repelentes químicos sintéticos. E principalmente avaliar o potencial como repelente do óleo essencial da *T. pallida*, pertencente a uma das famílias de plantas com histórico de investigação, por questões ambientais e de sustentabilidade, evitando assim a introdução de espécies exóticas e o uso de produtos sintéticos.

## 1.1. OBJETIVO GERAL

Desenvolver uma nova metodologia através de equipamento para testar substâncias repelentes e avaliar a capacidade do óleo essencial da planta *Trichilia pallida* Swartz (Sapindales, Meliaceae) em repelir, atrair ou a ausência de efeito em fêmeas de *Aedes aegypti*, durante a procura do hospedeiro humano para realizar a hematofagia.

## 1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1.2.1. Elaborar o equipamento e executar os experimentos de repelência de Culicidae, que elimina o contato hospedeiro-vetor;

1.2.2. Conferir a eficácia da técnica empregada através dos testes utilizando produtos químicos sintéticos repelentes;

1.2.3. Extrair e identificar os compostos químicos presentes no óleo essencial da *T. pallida*;

1.2.4. Avaliar o potencial de repelência ou atração do óleo essencial de *T. pallida*, no comportamento de hematofagia de *Ae. aegypti*.

1.2.5. Avaliar o hidrolato, o extrato aquoso, os extratos hexânico, metanólico e diclorometano e o óleo essencial de *T. pallida*, como inseticida para larvas de *Ae. aegypti*.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Equipamento elaborado para testar repelência ou atração

O equipamento de análise de repelência foi desenvolvido e construído no Laboratório de Entomologia Médica e Veterinária da Universidade Federal do Paraná, em material acrílico, a caixa central medindo 24,5 cm x 24,5 cm de tamanho, dois tubos de 45 cm de comprimento e 5,5 cm de diâmetro saindo das laterais opostas com abertura nos dois extremos, em cada uma das laterais foram acoplados tubos que acabam em duas caixas menores com 15 cm de tamanho e aberturas laterais de 10 cm de diâmetro onde foram feitos os testes, sendo as mãos, com o produto e o controle, inseridas no interior das caixas menores. O equipamento permaneceu vedado durante todos os experimentos, com um fluxo de ar saindo de dentro para fora através de um sistema de ventilação adaptado utilizando um “cooler” pequeno de computador instalado na face superior da caixa central, com dimensões de 8 cm x 8 cm e aproximadamente 2.000 rpm (Figuras 1 e 2).

Os experimentos foram realizados na Sala de Criação de insetos do Departamento de Zoologia da UFPR, com temperatura e umidade monitorados e controlados, em 25°C e 60 a 70%, respectivamente. Dados da temperatura e umidade no interior do equipamento também foram registrados durante a realização dos experimentos, utilizando um termohigrômetro digital.

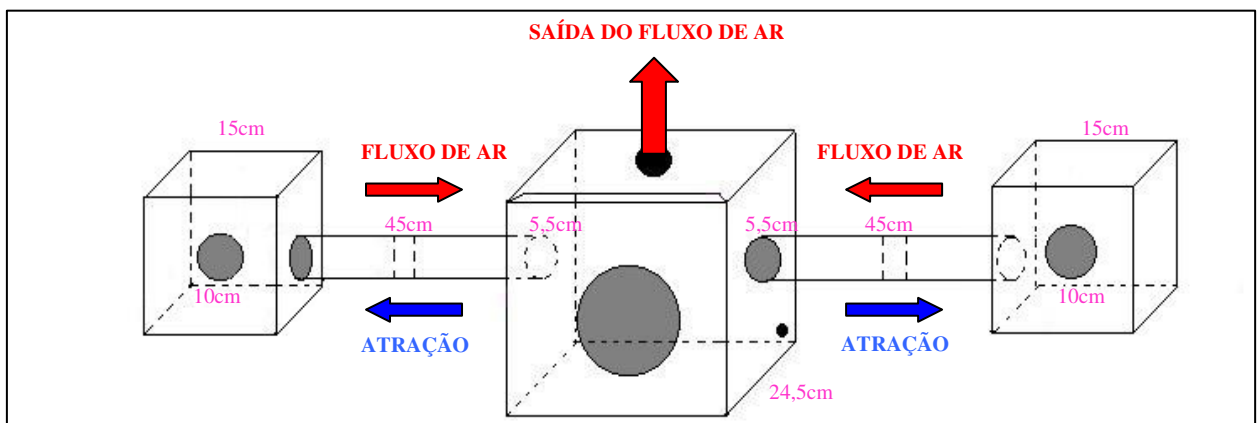
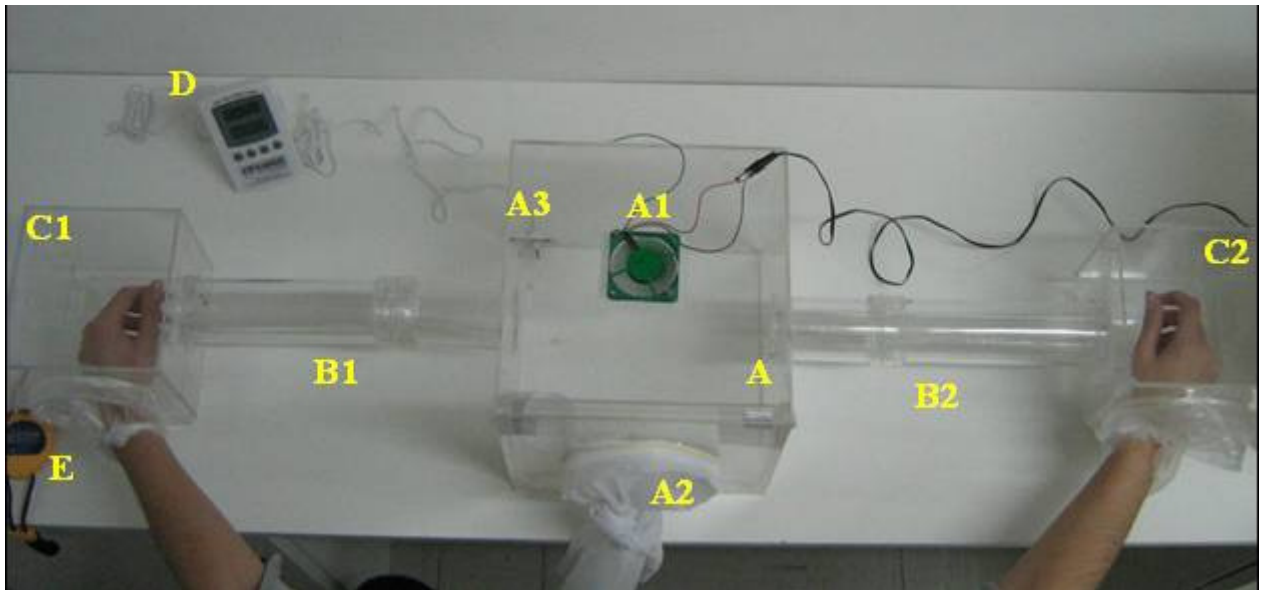


FIGURA 1 - DESENHO ESQUEMÁTICO DO EQUIPAMENTO PARA TESTE DE REPELÊNCIA



**FIGURA 2 - EQUIPAMENTO PARA TESTE DE REPELÊNCIA DESENVOLVIDO NA UFPR**

Legenda: (A) caixa central para liberação das fêmeas; (A1) circulação do ar de dentro para fora, 110V; (A2) abertura para acesso à caixa central; (A3) sensor do termohigrômetro para controle da temperatura interna e temperatura e umidade externas; (B1) e (B2) passagem das fêmeas até as mãos, esquerda sem produto e direita com produto; (C1) e (C2) caixas laterais para liberar os odores, controle e óleo respectivamente; (D) termohigrômetro digital com sensor externo e interno; (E) cronômetro digital.

## 2.2. Produtos repelentes sintéticos comerciais

Para avaliar o desempenho do equipamento foram utilizados três produtos repelentes sintéticos encontrados à disposição no mercado que foram denominados de produto A, produto B, ambos formulados com DEET; *Aloe barbadensis* Mill. = *Aloe vera* (L.) Burm.; álcool e fragrância, e produto C composto por água, butilenoglicol, etil butilacetilaminopropionato, álcool laurílico etoxilado, fosfato de potássio monobásico, fosfato de sódio dibásico, fragrância e EDTA dissódico. Com exceção do produto C, os produtos A e B possuem na sua composição o DEET (N,N-dietil-meta-toluamida), substância química muito utilizada na maioria dos produtos repelentes sintéticos comerciais.

## 2.3. *Trichilia pallida*

### 2.3.1. Aspecto morfológico da *Trichilia pallida*



**FIGURA 3 - ASPECTO DAS FOLHAS DE *Trichilia pallida*, COLETADAS NA MATA PRESERVADA PERTENCENTE À FAZENDA DORALICE, LOCALIZADA NO MUNICÍPIO DE IBIPORÃ, PARANÁ**



**FIGURA 4 - ASPECTO DOS FRUTOS DE *Trichilia pallida*, COLETADAS NA MATA PRESERVADA PERTENCENTE À FAZENDA DORALICE, LOCALIZADA NO MUNICÍPIO DE IBIPORÃ, PARANÁ**

### 2.3.2. Local de coleta de *Trichilia pallida*

A coleta foi realizada no município de Ibiporã (Latitude 23°17' Sul e Longitude 51°3' Oeste) limitando-se ao Norte com Sertanópolis, a Oeste e Sul, com Londrina, e a Leste com Jataizinho. A sua altitude é de 486 metros na sede municipal (<http://www.samaeibi.com.br/munic%EDpio.htm>).

O local encontra-se às margens do Rio Tibagi, no Norte do Paraná, distante 12Km da cidade de Londrina, Latitude entre 28°08'47" e 23°55'46" Sul e Longitude entre 50°52'23" e 51°19'11" Oeste (<http://www.londrina.pr.br/cidades/londados.php3>).

Os ramos e folhas da planta foram coletados na Fazenda Doralice que possui 260 alqueires e localiza-se a 8 Km de Ibiporã. A área da fazenda, no período em que foram realizadas as coletas, estava sendo utilizada para o cultivo de soja e palmito, o local de coleta é uma área de mata preservada margeada pelo Rio Tibagi (Figura 5 e 6). As coletas foram realizadas nos meses de Dezembro de 2006, Abril e Outubro de 2007. As árvores utilizadas encontram-se em três pontos distintos da mata, a primeira mais próxima do início da mata e da plantação de soja a uma distância de aproximadamente 120m, a segunda dentro da mata e próxima do rio distante da primeira aproximadamente 400m e a terceira na mata mais fechada, também próxima ao rio, e distante da segunda aproximadamente 250m (Figura 7).



**FIGURA 5 – SEGMENTO DA FAZENDA DORALICE, IBIPORA, PARANÁ, MARGEADA PELO RIO TIBAGI**



**FIGURA 6 – PEQUENA ÁREA DA FAZENDA DORALICE, IBIPORÁ, PARANÁ - ASPECTO DA ENTRADA DA MATA PRESERVADA, ONDE FORAM REALIZADAS AS COLETAS**



**FIGURA 7 – VISTA PARCIAL DA FAZENDA DORALICE, IBIPORÁ, PARANÁ – ESPÉCIE *Trichilia pallida* UTILIZADA PARA A COLETA E POSTERIOR EXTRAÇÃO DO ÓLEO, NO INTERIOR DA MATA PRESERVADA**

### **2.3.3. Extração e análise do óleo essencial**

Para obter uma resposta mais adequada dentro do objetivo proposto, foi extraído o óleo essencial das folhas e ramos de *T. pallida*, pois com o óleo são extraídas grande parte das substâncias voláteis, e podem ser armazenadas por um tempo maior sem que haja a perda dessas substâncias.

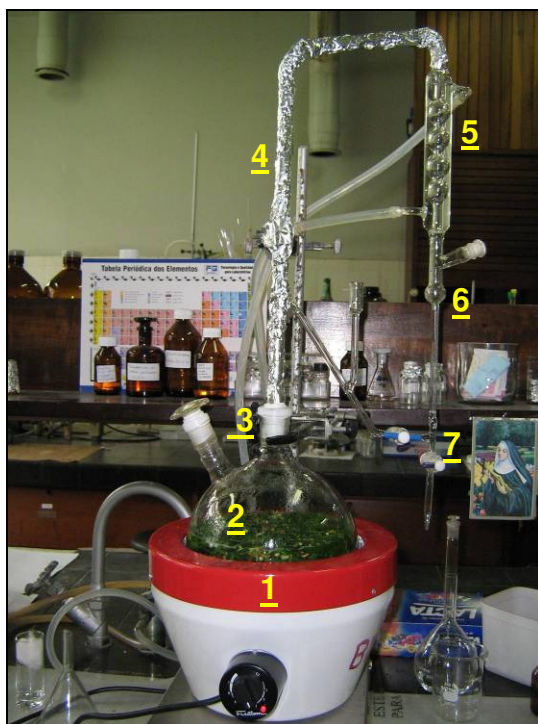
Primeiramente, as folhas e ramos de *T. pallida* foram secos em estufa a 40°C, por 48 horas. Após esse período foram triturados em um liquidificador até a obtenção do pó. Em um balão de dois litros foi adicionado um litro de água destilada

e aproximadamente 200g do pó da planta. A extração foi feita por hidrodestilação, em aparelho tipo Clevenger (Figura 8), no Laboratório de Produtos Naturais e Ecologia Química (LAPNEQ), do Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná.

Na destilação tipo Clevenger, o aquecimento da água até a fervura provoca a formação de vapor que arrasta os compostos mais voláteis. Após a condensação, estes compostos separam-se da água por decantação. Na destilação por arraste a vapor o material é sujeito a temperaturas próximas dos 100 °C, o que poderá levar à decomposição dos constituintes termolábeis. O aquecimento prolongado em contacto com a água, poderá conduzir à hidrólise de ésteres, polimerização de aldeídos ou decomposição de outros compostos (BERNARDO-GIL *et. al.*, 2002).

A composição química do óleo foi determinada através da técnica de Cromatografia gasosa/espectrômetro de massas (GC/MS), sendo a análise efetuada em equipamento Varian, modelo Saturno 2000, equipado com coluna capilar CP-Sil 8 CB (5% - fenil-metilsiloxano com as seguintes dimensões: 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm (espessura do filme). O gás He foi empregado como gás de arraste a um fluxo de 1,0 mL/min e a razão do fluxo injetado na coluna ("Split Flow") foi ajustada para uma relação de 20:1. As temperaturas do injetor e do detector foram mantidas a 250°C. A temperatura do forno seguiu a seguinte programação: 60°-280°C a 3°C/min. A energia para a ionização das moléculas foi de 70eV e a temperatura da fonte de íon foi de 180°C. Os componentes individuais foram identificados por comparação de seus índices de retenção e espectros de massas com os dados dos compostos autênticos citados em literatura (ADAMS, 1995; JENNINGS & SHIBAMOTO, 1980). Na Cromatografia gasosa (CG) os compostos foram submetidos à análise usando o instrumento Varian 3800, equipado com uma coluna com as mesmas dimensões e polaridade similar (VA-5) à da coluna empregada na análise de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. As condições de análise foram as mesmas descritas acima. O CG foi equipado com detector de ionização de chamas (FID). As porcentagens dos compostos na amostra foram calculadas através das áreas de seus picos, sem correção para fatores de resposta.

O equipamento do tipo Clevenger funciona com sistema de arraste à vapor, sendo a base forrada por uma manta (1) que aquecida, passa o calor para o balão volumétrico contendo o pó da planta e água destilada (2), entra em ebulição dando início ao processo de extração. O vapor contendo as substâncias do óleo, é arrastado através do equipamento (3 e 4), passa por um sistema de refrigeração (5), sendo em seguida armazenado (6). O óleo permanece no equipamento até o encerramento do processo de extração (6 e 7), aproximadamente quatro horas, juntamente com o resíduo do óleo diluído na água destilada, denominado de hidrolato, onde podem ser encontradas algumas substâncias que não puderam ser extraídas. Ao encerrar o procedimento, o óleo é retirado do equipamento, sendo separado do hidrolato, fase aquosa em contato com o óleo, durante o processo (7) (Figura 8).



**FIGURA 8 - EQUIPAMENTO DO TIPO CLEVINGER - LABORATÓRIO DE PRODUTOS NATURAIS E ECOLOGIA QUÍMICA (LAPNEQ)**

#### **2.4. *Aedes aegypti* em testes de repelência**

As fêmeas adultas de *Ae. aegypti* utilizadas nos testes foram obtidas através da reprodução da colônia Rockefeller mantida na Sala de Criação do Departamento

de Zoologia da UFPR, a uma temperatura de  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  e umidade relativa 60 a 70%, alimentadas diariamente com uma solução de mel a 10% e uma vez por semana com sangue de cobaia BalbiC. A utilização de cobaia foi aprovada pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal (CEEA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, a qual refere-se o certificado de número 235.

No novo equipamento elaborado, foi desenvolvido o “método novo”. Inicialmente neste equipamento foram feitos experimentos com produtos de ação repelente e após a finalização desta etapa, deu-se início aos testes com o óleo de *T. pallida*. Através do método novo, comparado com o que denominamos de “método convencional” de testes, onde a mão de um voluntário é inserida no interior de uma gaiola com um número elevado de fêmeas, por um período variável em minutos, até que seja registrado a primeira picada ou até o término do tempo programado, sendo então contados o número de picadas.

#### **2.4.1. Testes com repelentes através do método novo**

Para os experimentos realizados através do método novo com os produtos repelentes, denominados os produtos de A, B e C. Foram utilizadas um total de 1.200 fêmeas, sendo 400 para cada produto testado, 20 fêmeas por teste, em 20 repetições. Para cada teste, as mãos da voluntária foram higienizadas com produto neutro e em seguida, 0,5 mL do produto repelente foi espalhado na mão direita, enquanto a mão esquerda serviu como controle. Foi observado o desempenho do novo equipamento, durante 30 minutos, através da repelência das fêmeas pelo produto químico, atração pelo controle ou a ausência de escolha, onde permaneceram na gaiola principal, não optando por um dos dois lados. Os testes foram efetuados no período diurno, respeitando a preferência para atividade de hematofagia de *Ae. aegypti*, com o hospedeiro sentado, ou seja, em posição de descanso, não tendo realizado esforço físico anteriormente à realização dos testes. Os dados de temperatura e umidade relativa dentro do equipamento e da sala foram monitorados e registrados.

#### **2.4.2. Teste com óleo de *T. pallida***

O potencial de repelência e/ou atração do óleo essencial de *T. pallida* foi testado através da nova metodologia e comparado com o método convencional. Para cada experimento foram utilizadas 20 fêmeas de *Ae. aegypti*, totalizando 300 fêmeas por concentração e 1.500 fêmeas nas cinco concentrações do óleo. A idade das fêmeas variou entre 5 a 7 dias, possivelmente copuladas, pois espécimes estenogâmicas são capazes de se acasalar em pequenos espaços durante o vôo ou em pouso sobre uma superfície (CONSOLI & OLIVEIRA, 1998) e necessitando de sangue para o desenvolvimento dos ovos. Os testes com *Ae. aegypti* foram desenvolvidos no período diurno, nas mesmas condições que foram efetuadas para os experimentos com repelentes.

O óleo utilizado nos experimentos foi solubilizado em etanol nas concentrações 0,2%; 1%; 2%; 3% e 4%. Após a higienização das mãos foi aplicado na mão direita, que permaneceu no interior da gaiola de uma das extremidades do equipamento enquanto a mão esquerda sem nenhuma substância serviu de controle, e foi introduzida na gaiola da outra extremidade. Nestas condições observou-se durante 15 minutos o número total de fêmeas que se aproximaram das mãos. Foram realizadas 15 repetições para cada concentração.

#### **2.4.3. Teste com óleo de *T. pallida* através do método novo**

Nos testes realizados com o óleo de *T. pallida*, através do método novo, analisou-se o comportamento das fêmeas que tinham por escolha a mão com óleo aplicado ou a mão sem óleo introduzidas em lados opostos dentro do equipamento. As fêmeas ao deslocar-se na direção da mão com óleo seriam atraídas, e ao contrário voando em direção da mão controle, seriam repelidas pelo óleo. Durante o período de 15 minutos, foram quantificadas, a cada minuto, apenas as fêmeas que pousaram na tela protetora ao final dos tubos, nas três opções. O total de fêmeas observadas em cada experimento foi registrado, sendo considerado para as análises o número mais elevado de fêmeas que ocorreu durante os 15 minutos de teste. Foi

registrado também o tempo em que a primeira fêmea entrou em contato com a tela protetora para ambos os lados, com e sem produto, denominado de tempo de atração. Os dados de temperatura e umidade relativa dentro do equipamento e da sala foram monitorados e registrados (Figura 9).



**FIGURA 9 - EXPERIMENTO REALIZADO ATRAVÉS DO MÉTODO NOVO PARA TESTE DE REPELÊNCIA E/OU ATRAÇÃO- EM EVIDÊNCIA FÊMEAS DE *Aedes aegypti* ATRAÍDAS PELA MÃO CONTROLADA INSERIDA NA CAIXA LATERAL DO LADO ESQUERDO DO EQUIPAMENTO**

#### **2.4.4. Testes com óleo de *T. pallida* através do método convencional**

Os testes realizados através do método convencional para testar o óleo da *T. pallida*, foram iniciados logo após o término dos testes realizados através do método novo. A mão tratada com o óleo foi introduzida em um gaiola de dimensões 30 cm x 30 cm, com 20 fêmeas no seu interior. Nas mesmas condições fisiológicas das fêmeas utilizadas nos testes anteriores. Através do cronômetro digital foi registrado o tempo em que a primeira fêmea foi atraída e o tempo da primeira picada. O controle foi realizado utilizando a mesma metodologia do teste realizado com o óleo. Os testes foram desenvolvidos no período diurno, respeitando as preferências fisiológicas da espécie de culicidae para a realização do repasto sanguíneo. Os experimentos foram efetuados na sala de criação, com temperatura e umidade monitoradas (Figura 10).



**FIGURA 10 - EXPERIMENTO REALIZADO ATRAVÉS DO MÉTODO CONVENCIONAL PARA TESTE DE REPELÊNCIA UTILIZANDO UMA GAIOLA COMUM COM FÊMEAS DE *Aedes aegypti***

## **2.5. Bioensaios com extratos**

Neste experimento foram utilizadas larvas de 3° ínstar de *Ae. aegypti*, oriundas da criação mantida na Sala de Criação do Departamento de Zoologia. Os ensaios com as larvas foram realizados para avaliar o efeito das substâncias extraídas da *T. pallida* utilizando diferentes solventes. Para os experimentos foram utilizadas 20 larvas por concentração em quatro réplicas, transferidas para copos plásticos com a solução dos extratos diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) misturados em proporções equivalentes de água mineral e mantidas em câmara climatizada (BOD) por 24 horas com temperatura e umidade controladas.

O controle para os experimentos com extratos, exceto hidrolato, foi realizado a partir de 25 mL, 15 mL, 7,5 mL e 5 mL de DMSO, misturado em água mineral em proporções equivalentes que resultaram em 100 mL de solução total.

Após 24 horas de exposição nos tratamentos foi registrado o número de larvas mortas, considerando aquelas que não apresentaram movimentos e não respondiam a nenhum estímulo.

### 2.5.1. Hidrolato

A atividade da fase aquosa que permaneceu em contato com o óleo foi resultante da extração do óleo, que apresenta quantidade mínima de substâncias na sua composição. Foi utilizado 0,5; 1 e 1,5 mL diluído em 100 mL de água. As larvas de *Ae. aegypti* foram transferidas para a solução diluída do hidrolato onde permaneceram por 24 horas em câmara climatizada (BOD).

### 2.5.2. Extrato aquoso

O extrato aquoso foi preparado utilizando 10g de folhas e ramos secos em estufa a 40°C por 72 horas, após esse período foram triturados em liquidificador e misturados em 100 mL de água destilada. A mistura foi aquecida a 50°C por quatro horas, e permaneceu em repouso à temperatura ambiente por 48 horas. As concentrações do extrato utilizadas foram 0,5; 1; 2; 3 e 5 mL. O teste controle foi realizado utilizando apenas água mineral. As larvas de *Ae. aegypti* foram transferidas para a solução diluída do extrato aquoso onde permaneceram por 24 horas em câmara climatizada (BOD).

### 2.5.3. Extrato hexânico (éter de petróleo)

O extrato hexânico foi obtido a partir de 30g de folhas e ramos secos em estufa a 40°C por 72 horas, após esse período foram triturados em liquidificador e misturados em 250 mL do solvente éter de petróleo. A mistura foi concentrada em três repetições durante o período de 24 horas (Figura 11). As substâncias da *T. pallida* extraídas com éter de petróleo foram isoladas do solvente através do equipamento denominado rotaevaporador a 40°C, as substâncias extraídas foram armazenadas em local escuro sendo diluídas apenas no momento em que os testes foram realizados (Figura 12).

Para os bioensaios, o extrato hexânico foi diluído em dimetilsulfóxido (DMSO) em 25, 15, 7,5 e 5 mL e misturados com água mineral em proporções equivalentes que resultaram em 100 mL de solução total. As larvas de *Ae. aegypti* foram transferidas para a solução diluída do extrato hexânico, em quatro réplicas de cada concentração, onde permaneceram por 24 horas em câmara climatizada (BOD).

#### **2.5.4. Extrato diclorometano**

O extrato diclorometano foi obtido logo após a extração com éter de petróleo utilizando a mesma porção de planta que já havia sido utilizada, extraíndo outras substâncias. Foi adicionado 250 mL do solvente diclorometano e concentrado em três repetições durante o período de 24 horas (Figura 11). As substâncias da *T. pallida* extraídas com diclorometano foram isoladas do solvente através do rotaevaporador a 40°C, as substâncias extraídas foram armazenadas em local escuro sendo diluídas apenas no momento em que os testes foram realizados (Figura 12).

Para os bioensaios, o extrato diclorometano foi diluído em DMSO a 25, 15, 7,5 e 5 mL e misturados com água mineral em proporções equivalentes que resultaram em 100 mL de solução total. As larvas de *Ae. aegypti* foram transferidas para a solução diluída do extrato diclorometano, em quatro réplicas de cada concentração, onde permaneceram por 24 horas em câmara climatizada (BOD).

#### **2.5.5. Extrato metanólico**

O extrato metanólico foi obtido após a extração com diclorometano utilizando a mesma porção de planta que já havia sido utilizada. Foi adicionado 250 mL do solvente metanol e concentrado em três repetições durante o período de 24 horas (Figura 11). As substâncias da *T. pallida* extraídas com metanol foram isoladas do solvente através do rotaevaporador a 40°C, as substâncias extraídas foram

armazenadas em local escuro sendo diluídas apenas no momento em que os testes foram realizados (Figura 12).

Para os bioensaios, o extrato metanólico foi diluído em DMSO a 25, 15, 7,5 e 5 mL e misturados com água mineral em proporções equivalentes que resultaram em 100 mL de solução total. As larvas de *Ae. aegypti* foram transferidas para a solução diluída do extrato metanólico, em quatro réplicas de cada concentração, onde permaneceram por 24 horas em câmara climatizada (BOD).



**FIGURA 11 - ASPECTO DE 3 REPETIÇÕES DA EXTRAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS DAS FOLHAS E RAMOS DA PLANTA *Trichilia pallida* UTILIZANDO ÉTER DE PETRÓLEO, DICLOROMETANO E METANOL**



**FIGURA 12 - ROTA-EVAPORADOR UTILIZADO PARA SEPARAR OS SOLVENTES ÉTER DE PETRÓLEO, DICLOROMETANO E METANOL DAS SUBSTÂNCIAS EXTRAÍDAS DA PLANTA *Trichilia pallida***

## 2.6. Análise Estatística

A estratégia adotada para a análise dos resultados, obtidos através dos testes realizados com os produtos repelentes e com o óleo de *T. pallida*, foi a utilização de métodos estatísticos não-paramétricos, para comparação dos dados que não possuíam distribuição normal. As metodologias utilizadas para esses resultados foram os testes de Wilcoxon, alternativo ao teste t, como utilizado por GEIER & BOECKH (1999); SIMMONDS (2001) e Kruskal Wallis, alternativo ao ANOVA. O teste de Wilcoxon é aplicado para comparar dois grupos de dados relacionados, e o teste de Kruskal-Wallis para comparar grupos de dados independentes.

### **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.1. Método novo x repelentes químicos**

Com o objetivo de testar odores repelentes de maneira menos agressiva e ética, uma primeira tentativa foi realizada utilizando equipamento adaptado do tipo túnel de vento em forma de tubo em Y, semelhante ao utilizado por EIRAS & JEPSON (1994) e GEIER & BOECKH (1999), para odores atrativos. O primeiro teste com repelentes comerciais mostrou ineficiência, pois ao serem liberados os odores, do repelente e do controle, nas extremidades paralelas do tubo em Y, o repelente volatilizou e impregnou o equipamento por completo, não sendo possível avaliar o comportamento das fêmeas frente a fonte de odor.

Em função dos resultados obtidos na primeira tentativa de teste, um novo equipamento foi adaptado para avaliar odores. Para não ocorrer impregnação dos odores dos produtos repelentes por todo o equipamento, os tubos foram colocados em extremidades opostas, e o ar ao invés de ser liberado para o interior foi sugado de dentro para fora, assim os odores passaram pelos tubos laterais e saíram pela extremidade superior da gaiola principal, onde foram liberadas as fêmeas, sem que odor liberado de um lado interferisse no odor liberado do outro lado.

O equipamento desenvolvido, no sentido horizontal, se parece com o utilizado por DOGAN & ROSSIGNOL (1999) no sentido vertical para verificar atração, repelência e inibição simultaneamente, porém com adaptações para ser utilizado testando produtos diretamente nas mãos do hospedeiro humano, sem ocorrer contato direto com o mosquito. Esta técnica foi denominada de “método novo”, para diferenciá-lo da metodologia utilizada, normalmente, para avaliar produtos repelentes no qual denominamos de “método convencional”, onde um voluntário introduz uma das mãos dentro de uma gaiola comum com número elevado de fêmeas. O método convencional, normalmente é eficiente, porém pode causar desconforto devido às picadas e também problemas éticos.

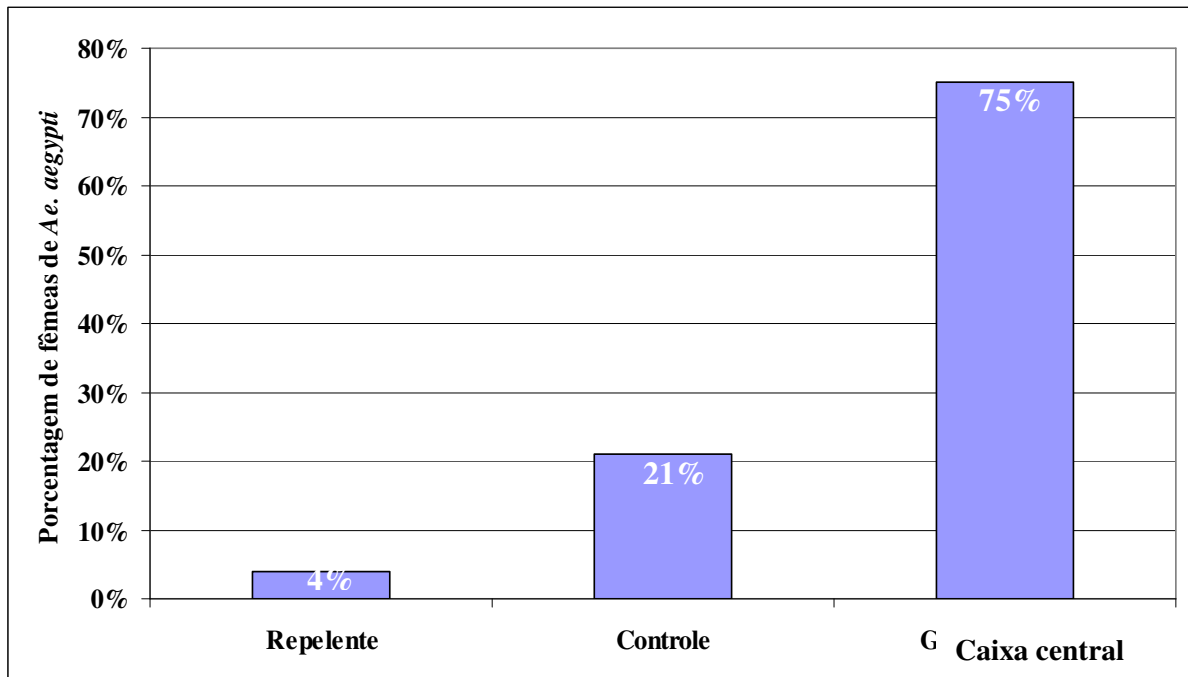
DOGAN & ROSSIGNOL (1999) registraram resultados positivos com o olfatômetro adaptado, tanto para repelência como para atração e inibição de fêmeas

de Culicidae, e definiram como um método com características extraordinárias que nenhum outro parece possuir.

O método novo desenvolvido neste trabalho para testar repelência foi avaliado, primeiramente, utilizando produtos repelentes comerciais. Estes produtos receberam denominações genéricas, não sendo apresentado ao longo do trabalho o nome comercial. As formulações apresentadas nas embalagens estão reproduzidas no item material e métodos. É importante ressaltar que o objetivo principal da investigação foi avaliar a eficiência do equipamento desenvolvido e não dos produtos repelentes comerciais, portanto, estes produtos foram considerados a princípio como cumprindo a tarefa apresentada em seus rótulos, ou seja, são eficientes, evitando a hematofagia das fêmeas de Culicidae. Desta forma pode-se avaliar o desempenho da nova metodologia, antes de submeter os produtos naturais aos testes.

Considerando a eficiência dos produtos repelentes comercializados, os três produtos selecionados denominados A, B e C, foram utilizados durante os testes em condições controladas de temperatura externa, ou seja, no interior da sala de criação e monitoradas as temperaturas interna e no interior do equipamento. Ambas permaneceram entre 25°C e a umidade relativa da sala oscilou entre 50 e 60%. O resultado final mostrou o desempenho do equipamento, pois o comportamento das fêmeas foi o esperado, tendo duas opções de escolha. Do total de 1.200 fêmeas utilizadas, 21% optaram pelos controles e apenas 4% pela mão tratada com repelente comercial. O número de fêmeas que permaneceram na caixa central, não optando por nenhum dos dois lados, foi 75% do total dos 60 testes realizados com o três produtos químicos (Figura 13).

O produto A foi menos atrativo com 2,2% das fêmeas atraídas, seu controle atraiu 16,7% e as fêmeas que permaneceram na caixa central 81%. O produto B atraiu 3,5% das fêmeas, seu controle atraiu 19,5% e as fêmeas na caixa central 77%. E o produto C atraiu 7,5% das fêmeas enquanto o seu controle atraiu 25% e as fêmeas na caixa central totalizaram 67,5%. A forma como o equipamento foi montado viabilizou a opção de escolha sem a necessidade de contato direto da fêmea com o hospedeiro (Figura 14).

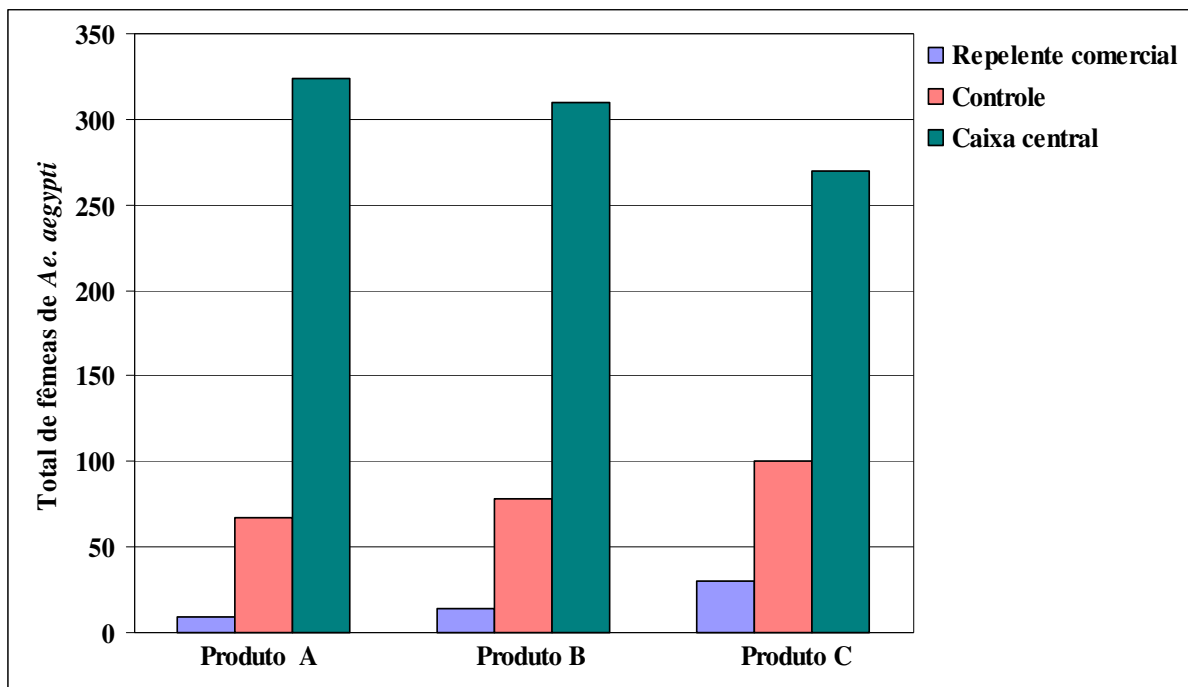


**FIGURA 13 - PORCENTAGEM DO TOTAL DE FÊMEAS ATRAÍDAS PELAS MÃOS TRATADAS COM OS 3 REPELENTE COMERCIAIS E PELOS CONTROLES, E DAS FÊMEAS QUE PERMANECERAM NO INTERIOR DA CAIXA CENTRAL (n=1.200), DURANTE OS TESTES REALIZADOS COM OS REPELENTE QUÍMICOS SINTÉTICOS, PARA AVALIAÇÃO DO NOVO EQUIPAMENTO**

A permanência de fêmeas na caixa central pode ser consequência de sua condição fisiológica. Apesar de *Ae. aegypti* ser considerada uma espécie estenogâmica, ou seja, capaz de se acasalar em pequenos espaços durante o vôo ou pousadas sobre uma superfície (CONSOLI & OLIVEIRA, 1998) é praticamente impossível detectar se as fêmeas realmente copularam, quando se trabalha com número elevado de indivíduos em uma gaiola de criação. Outras possibilidades poderiam ser, o estresse causado pelo deslocamento das fêmeas de uma gaiola para outra ou temperatura e/ou umidade fora dos padrões ideais para a procura de um hospedeiro pelas fêmeas, de acordo com as oscilações observadas e registradas dentro da sala de criação e no ambiente externo. Nos culicídeos os estímulos de orientação são percebidos dependendo das condições ideais de fatores externos, como temperatura, umidade, velocidade do vento, chuva e intensidade de luz, e de fatores internos, como estado fisiológico, sexo, idade e preferência alimentar, que influenciam na resposta da fêmea aos odores do hospedeiro (FORATTINI, 2002).

No sentido de avaliar se as diferenças observadas foram significativas, entre os produtos e controles, aplicou-se o teste de Wilcoxon, ou teste “t”, entre o produto A, B e C e seus respectivos controles. Segundo o teste, os valores da probabilidade dos produtos e seus respectivos controles foram, para o produto A e seu controle  $p=0,011$ ; para B e seu controle  $p=0,019$  e para C e seu controle  $p=0,007$ . Esses resultados mostram que há diferença significativa entre os produtos e seus controles, comprovando assim a eficácia do método novo para teste de repelência, pois os resultados indicaram que o equipamento oferece condições para as fêmeas discriminarem entre o hospedeiro com e sem produtos repelentes.

Para analisar a diferença entre os produtos A, B e C, excluindo os seus controles, aplicou-se o teste de Kruskal-Wallis, que mostrou diferença significativa com valor de  $p=0,025$ . O teste das médias de ocorrência de atratividade das fêmeas para os produtos apresentou o  $\chi^2$  igual a 17,091; grau de liberdade  $df=2$  e  $p=0,0002$ . As condições do experimento ainda permitem diferenciar a eficiência dos produtos.



**FIGURA 14 - DIFERENÇA DO NÚMERO TOTAL DE FÊMEAS ATRAÍDAS PELOS REPELENTES COMERCIAIS, SEUS CONTROLES E O NÚMERO DE FÊMEAS QUE NÃO OPTARAM POR NENHUM DOS LADOS (n=1.200) AO FINAL DE 30 MINUTOS DE TESTE, ATRAVÉS DO MÉTODO NOVO, EM CONDIÇÕES CONTROLADAS DE TEMPERATURA E UMIDADE RELATIVA DO AR**

No momento em que a fêmea, após a emergência e o amadurecimento fisiológico, encontra-se apta para a ingestão de sangue necessário para o desenvolvimento dos ovos, passa a ser receptiva aos odores e entrando em contato com algum sinal do hospedeiro consegue detectar a fonte que lhe servirá para realizar o repasto sangüíneo (PINTO, 2001).

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 fonte para a atração. 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 liberada dessa substância. Este fato está relacionado com a densidade de glândulas sudoríparas ecrinas presentes e responsáveis pela produção do suor composto em sua maior parte de água e sais, a sua atividade e as diferenças de pH (TORRES-ESTRADA & RODRIGUEZ, 2003). Nos experimentos foi utilizado sempre o mesmo hospedeiro para evitar as diferenças individuais.

Comparando a atratividade de *Ae. aegypti* aos compostos liberados por humanos e animais, constatou-se que devido às altas concentrações de ácido láctico exaladas da pele humana, são mais atrativas para os mosquitos do que a pele dos 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). Ao adicionar ácido láctico aos compostos liberados pelos animais, tornam-se 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).

Os repelentes comerciais são utilizados para repelir os insetos incômodos e principalmente os mosquitos. A maioria desses produtos possui como principal ingrediente ativo o DEET (N,N-dietil-meta-toluamida) que se encontra presente em diferentes concentrações de acordo com a marca do produto e vem sendo utilizado desde a década de 50 (ROBBINS & CHERNIACK, 1986) (Figura 15). Os repelentes podem apresentar componentes químicos diferentes em sua formulação, geralmente possuem fragrância e podem ser líquidos ou em creme. Seus compostos agem

sinergisticamente e atuam formando uma barreira ao redor do corpo impedindo que o mosquito se aproxime, pouse e realize o repasto sanguíneo.

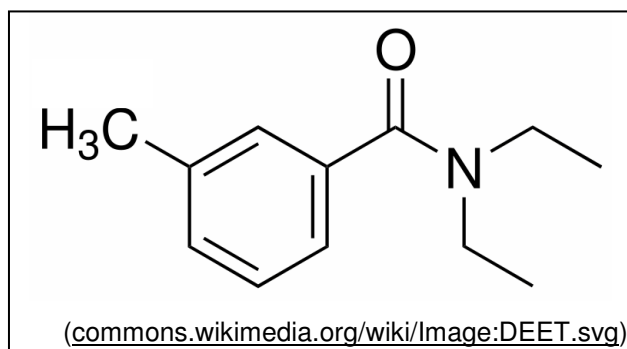


FIGURA 15: ESTRUTURA MOLECULAR DO DEET (N,N-DIETIL-META-TOLUAMIDA)

### 3.2. Natureza química do óleo essencial de *Trichilia pallida*

A composição química do óleo essencial da *T. pallida* foi analisada e os seus compostos foram identificados através da técnica de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas. Através da análise do óleo foi possível constatar e identificar 13 compostos diferentes e suas respectivas porcentagens. No entanto cinco compostos não foram identificados, porém foram apresentadas as suas porcentagens. Este fato sugere que é necessário 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.

Óleos essenciais são líquidos oleosos aromáticos obtidos a partir de diferentes partes vegetais das plantas, principalmente por hidrodestilação, e que ao ficarem expostos evaporam-se facilmente no ar. Sua função, relacionada com a volatilidade, envolve sinais de comunicação química entre os vegetais e podendo atuar como armas de defesa química contra os animais predadores.

Como funções ecológicas dos óleos essenciais, considera-se especialmente a inibição da germinação, proteção contra predadores, atração de polinizadores, proteção contra a perda de água e aumento de temperatura. Como exemplo, as

plantas com polinização noturna liberam aromas muito intensos nesses horários, devido à impossibilidade de existir o estímulo visual (CARDOSO *et. al.*).

Um fator importante que deve ser levado em consideração são as possíveis variações nos teores de substâncias ativas presentes nas plantas da *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.

De acordo com BERNARDO-GIL *et. al.* (2002) 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.

**TABELA 1 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA E CONCENTRAÇÃO RELATIVA (%) DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Trichilia pallida* OBTIDOS POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS**

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

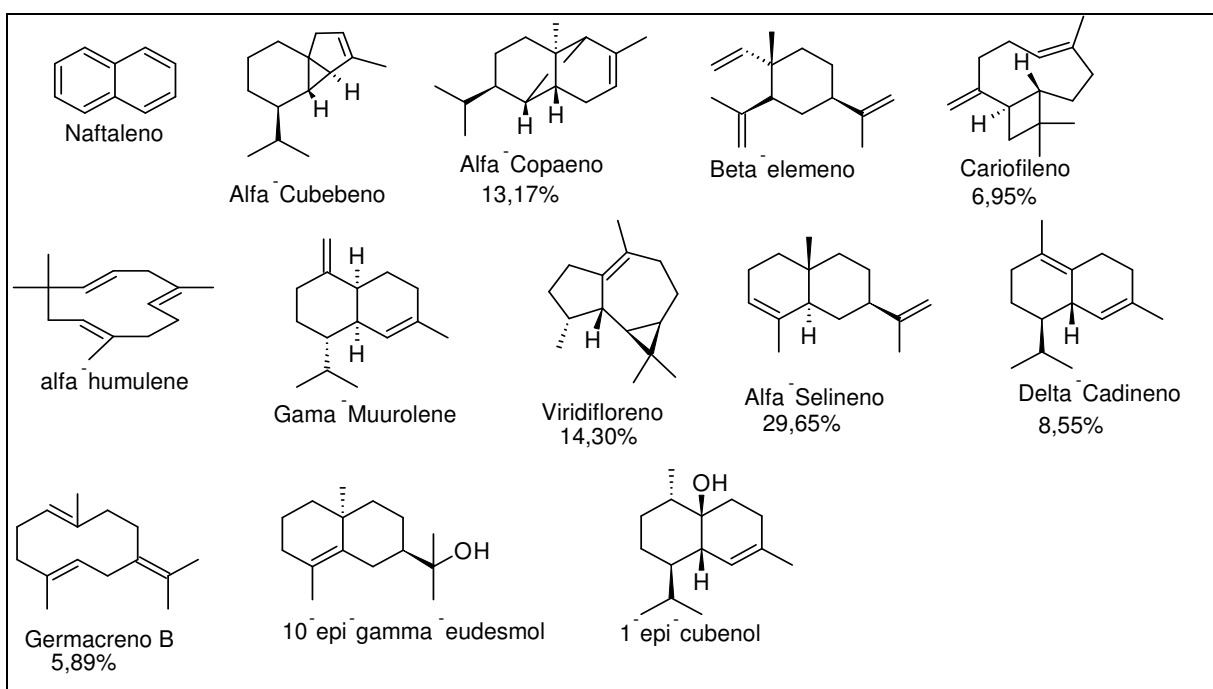
**Tempo de retenção:** tempo que a substância demora para sair da coluna (espectrômetro de massas).

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

Foi observada uma diferença na quantidade de óleo extraído das folhas e ramos coletados nos meses de dezembro e março. A primeira coleta, realizada no dia 11 de dezembro de 2006, foi registrada com menor quantidade de óleo extraído, em comparação com a segunda coleta, realizada no dia 28 de março de 2007. Esse

fato pode estar relacionado com a variação sazonal na composição química, pois conforme a estação do ano as concentrações de princípios ativos em plantas podem variar. Como observado nos óleos voláteis de *Guarea macrophylla* (Meliaceae) por LAGO *et al.* (2006), detectando uma variação sazonal dependente do grau de oxigenação dos compostos químicos presentes na planta, que pode estar associada com fatores fenológicos. Outra explicação para essa diferença, pode estar associada à ampla diversidade genética, como observado por ZIMBACK *et al.* (2004) em populações de *T. pallida* de três localidades diferentes do Estado de São Paulo.

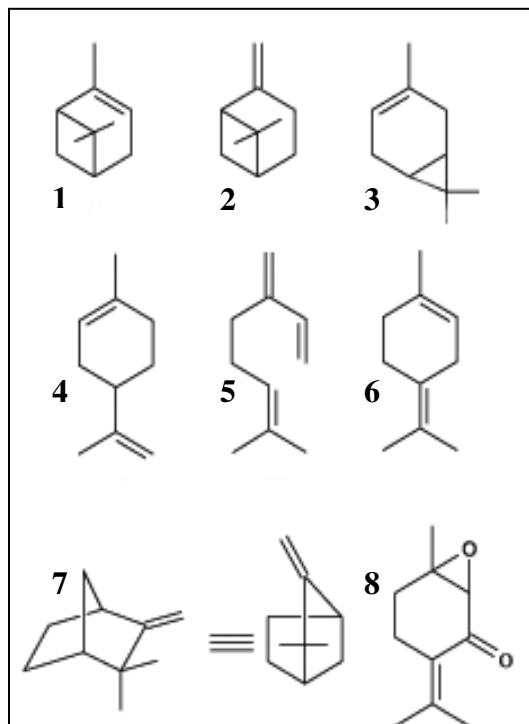
As moléculas dos compostos identificados no óleo de *T. pallida* pertencem principalmente ao grupo dos monoterpenos e sesquiterpenos (Figura 16).



**FIGURA 16 – ESTRUTURAS MOLECULARES DOS COMPOSTOS DO ÓLEO DE *Trichilia pallida* IDENTIFICADAS POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS**

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.

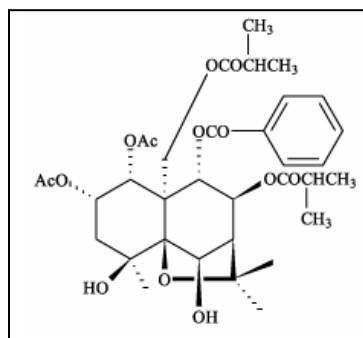
Vários monoterpenos foram isolados e avaliados quanto à toxicidade frente a diferentes insetos, entre eles destacam-se  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno, 3-careno, limoneno, mirceno,  $\alpha$ -terpineno e canfeno (VIEGAS JUNIOR, 2003) (Figura 17).



**FIGURA 17: ESTRUTURAS MOLECULARES DOS COMPOSTOS  $\alpha$ -PINENO (1),  $\beta$ -PINENO (2), 3-CARENO (3), LIMONENO (4), MIRCENO (5),  $\alpha$ -TERPINENO (6), CANFENO (7) e 1,2-EPÓXI-PULEGONA (8)**

Monoterpenos de estrutura relativamente simples, como o limoneno, mirceno e a 1,2-epóxi-pulegona exercem funções de proteção às plantas que o produzem (VIEGAS JUNIOR, 2003) (Figura 17).

Os sesquiterpenos assim como os monoterpenos costumam aparecer nos óleos essenciais vegetais e muitos atuam como fitoalexinas, antibióticos produzidos pelas plantas em resposta ao ataque de microorganismos e como agentes repelentes aos herbívoros. A atividade supressora de apetite foi relacionada ao grupo dos sesquiterpenos, que inclui algumas lactonas e a angulatina A (VIEGAS JUNIOR, 2003) (Figura 18).



**FIGURA 18: ESTRUTURA MOLECULAR DO COMPOSTO ANGULATINA A**

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.

Os terpenos (*E*)- $\beta$ -farneseno,  $\beta$ -humuleno,  $\alpha$ - e  $\beta$ -muuroleno foram isolados de uma espécie de Asteraceae, *Chrysothamus nauseosus*, sendo que durante os meses de verão a sua proteção contra herbívoros ocorre em níveis elevados devido a presença desses terpenos. Durante o inverno esses níveis caem rapidamente pois a planta tem suas folhas devoradas por outros animais. Durante a fase do crescimento e a diferenciação das plantas, os terpenos variam nas diferentes partes vegetais. Esse fato pode estar relacionado com a repelência e toxicidade em herbívoros (VIEGAS JUNIOR, 2003).

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-metilpropanoloxi)-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.

A família Meliaceae é conhecida por seus princípios ativos sendo constituídos pela mistura de substâncias derivadas dos terpenóides conhecidos como limonóides e esta mistura de substâncias é característica nas meliáceas. Somente outras duas famílias do reino vegetal possuem esses compostos, Rutaceae e Cneoraceae (SILVA *et. al.*, 1984).

ROCHA (2004) isolou e identificou, pela primeira vez da *T. pallida* a substância lupeol. Também identificou a substância gedunina, que apresenta atividade 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. Estas substâncias não foram isoladas de *T. pallida* no presente estudo.

A análise cromatográfica do óleo essencial de *Shorea robusta* Gaertn.f. (Dipterocarpaceae) revelou a presença de 28 compostos, entre eles alfa-copaeno, viridifloreno, beta-elemeno e gama-muuroleno. Os experimentos com estas substâncias registraram que o óleo influencia significativamente na localização do hospedeiro por *Hoplocerambyx spinicornis* Newman, 1842 (Coleoptera: Cerambycidae) (KAUR *et. al.*, 2003).

ARAÚJO *et. al.* (2003) identificaram os compostos de *Hyptis martiusii* Benth, (Lamiaceae) através da cromatografia gasosa, revelando a presença do viridifloreno e do germacreno B entre os 28 compostos constantes no óleo essencial, sendo registrado efeito inseticida contra larvas de *Ae. aegypti* e de *Bemisia argentifolii* Bellows & Perring, 1994 (Hemiptera:Aleyrodidae).

A influência de *Mesocyclops longisetus* (Thiébaud, 1914) (Copepoda: Cyclopoidea) na seleção do local para oviposição de fêmeas de *Ae. aegypti* foi

registrada através de ovitrampas. Foi observada uma atratividade significativamente maior pelas fêmeas do mosquito em armadilhas contendo o extrato hexânico do copépodo, onde entre os compostos identificados encontravam-se monoterpenos e sesquiterpenos incluindo alfa-copaeno e delta-cadineno (TORRES-ESTRADA *et. al.*, 2007).

A análise do óleo de *Guarea macrophylla* Vahl (Meliaceae) indicou uma variação cíclica na composição química. Enquanto sesquiterpenos apresentaram-se como a classe predominante no óleo extraído das folhas, uma variação dependente cíclica no grau de oxigenação destes compostos foi detectada, parecendo estar associado a fatores de fenologia. O óleo das folhas foi analisado através de eletroantenograma, ou seja, testes de comportamento a partir das antenas de fêmeas de *Hypsipyla grandella* Zeller, 1848 (Lepidoptera: Pyralidae), uma praga para várias espécies de meliáceas. Três compostos alcançaram resposta significativa e foram identificados como ledol, 1 cubenol e 1-epi-cubenol. Os resultados sugerem que estes compostos podem ser os responsáveis pela atração de *H. grandella* a *G. macrophylla* (LAGO *et. al.*, 2006).

*Copaifera officinalis* Linnaeus (Fabaceae), a copaíba que é cultivada no Brasil, Venezuela, Colômbia, Suriname e Guiana, também foi reconhecida como um excelente repelente de insetos e uma das substâncias identificadas é a alfa-humuleno. No entanto, FAZOLIN *et. al.* (2002) ao testarem o efeito inseticida no controle de *Cerotoma tingomarianus* Bechyné, conhecida como vaquinha-do-tomateiro, observaram que o óleo da copaíba não apresentou eficiência na mortalidade e inibição da alimentação para essa espécie de coleóptero (Chrysomelidae). Esses resultados mostram que para essa espécie de planta o efeito repelente encontra-se em evidência, se comparado com o efeito inseticida.

FAZOLIN *et. al.* (2005) também avaliaram a ação do óleo de *Piper aduncum* Linnaeus (Piperaceae) sobre *C. tingomarianus*, constatando efeito inseticida por contato e distúrbios fisiológicos pela ação da aplicação tópica.

A atividade inseticida de óleos essenciais de *Lippia turbinata* Griseb. e *Lippia polystachya* Griseb. (Verbenaceae) para larvas, pupas e adultos de *C. quinquefasciatus* foi avaliada. A composição dos óleos mostraram-se qualitativamente semelhantes e as diferenças registradas eram, principalmente,

devido à proporção de cada composto. Ambos os óleos mostraram efeito larvicida em concentrações de 80 ppm ou mais, somente o óleo de *L. turbinata* apresentou efeito sobre adultos e não foi detectada mortalidade de pupas. O potencial destes óleos para controle do mosquito vetor é discutido (GLEISER & ZYGADLO, 2007).

A atividade larvicida para *Ae. aegypti*, do óleo essencial extraído de espécies pertencentes ao gênero *Croton* L. (Euphorbiaceae), amplamente distribuída pelo nordeste do Brasil, foi analisada. Como principais compostos foram identificados metileugenol e alfa-copaeno para *Croton nepetaefolius* Baill.; alfa-pineno e beta-pineno para *Croton argyrophyloides* Müll. Arg.; e alfa-pineno, beta-felandreno e trans-cariofileno para *Croton sonderianus* Müll. Arg. (MORAIS *et. al.*, 2006)

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 que afetam as diferentes fases da vida do inseto podem ser diferenciados para determinadas espécies. As substâncias identificadas no óleo de *T. pallida* neste trabalho, como alfa-copaeno, beta elemeno, alfa humuleno, gamma muuroleno, viridifloreno, delta cadineno, germacreno B e 1 epi cubenol, também foram encontradas 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 dos 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 o elevado número de espécies de plantas existentes que vêm sendo analisadas podem revelar efeitos ainda desconhecidos, para insetos de interesse médico.

### **3.3. Método novo x óleo essencial de *Trichilia pallida***

O provável potencial repelente do óleo de *T. pallida* pôde ser observado nos testes realizados com o método novo, desde a primeira concentração utilizada. Foi possível verificar que o etanol não interfere na composição do óleo, quando adicionado a ele, pois entre o etanol e o controle ocorreu uma diferença de apenas

2% na atração das fêmeas. A diferença de atratividade das fêmeas nas concentrações do óleo foi inferior em relação ao controle.

Na concentração do óleo a 0,2% somente 14% das fêmeas foram atraídas, 41% preferiram o controle, ou seja, cerca de 2 vezes mais fêmeas foram atraídas pelos odores das mãos sem interferência do óleo, e 45% não optaram por nenhuma das mãos, ou seja, por nenhum dos lados.

Para a concentração à 1%, o óleo atraiu 15% das fêmeas, o controle 36% e 49% não optaram por nenhum dos lados permanecendo na caixa central. Em concentração a 2%, 11% das fêmeas se aproximaram do óleo, 36% do controle e 53% permaneceram na caixa central. Na concentração de 3%, 10% das fêmeas foram até o óleo, 52% até o controle e 38% não optaram pelo óleo ou pelo controle. Na concentração de 4%, apenas 8% das fêmeas mostraram preferência pelo óleo, 56% pelo controle, cerca de 6 vezes mais atração pelo controle, e 36% permaneceram sem opção no interior da caixa central (Figura 19).

Esses resultados indicam que o óleo testado, através do método novo, pode apresentar potencial para repelência ao *Ae. aegypti* principalmente em concentrações mais elevadas. Observou-se que a preferência das fêmeas nas concentrações 3% e 4% foi em número superior pelo controle, e inferior no óleo e até no número das fêmeas que não discriminaram por nenhuma das opções. Evidenciando, provavelmente, que o efeito repelente sobre as fêmeas aumenta à medida em que a concentração do óleo também aumentou. A repelência das fêmeas é proporcional ao aumento das concentrações do óleo.

O número acumulado de fêmeas foi analisado, à parte, para cada concentração. O teste com etanol mostrou um aumento progressivo no número de fêmeas atraídas, simultaneamente para o etanol e seu controle à medida em que o tempo aumentou, constatando que o etanol não interferiu nos resultados quando utilizado como solvente para diluir o óleo da planta (Figura 20). Este resultado mostra que o uso do etanol como solvente para diluir óleos essenciais é adequado.

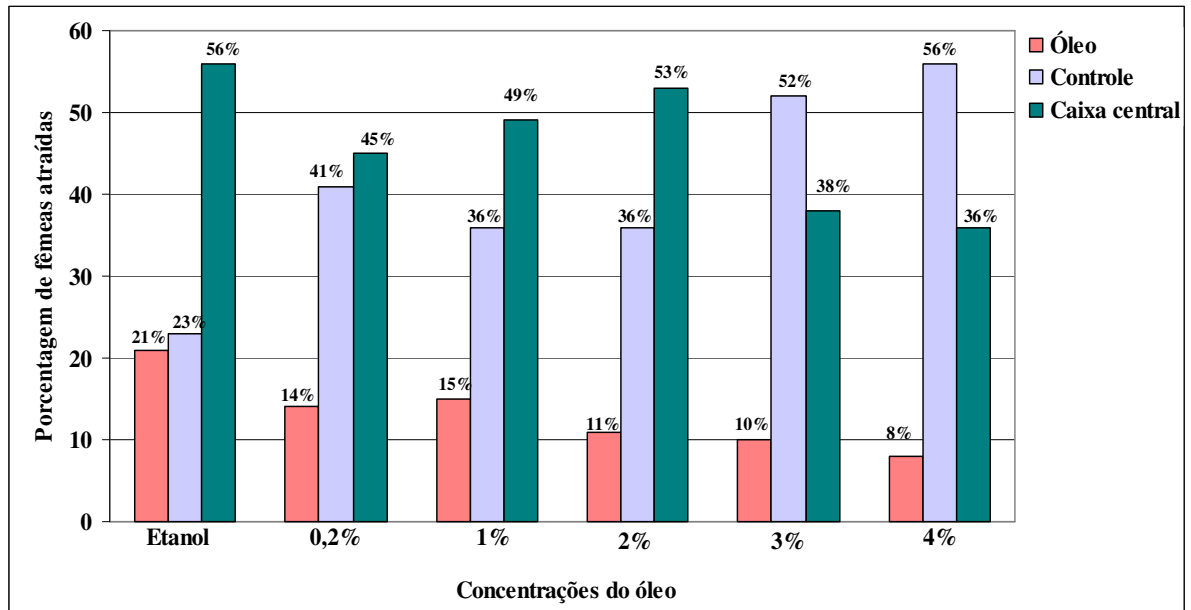


FIGURA 19 - PORCENTAGEM DO TOTAL DE FÊMEAS ATRAÍDAS PARA CADA CONCENTRAÇÃO DO ÓLEO DE *Trichilia pallida* NOS TESTES DE REPELÊNCIA ATRAVÉS DO MÉTODO NOVO (n=1.500)

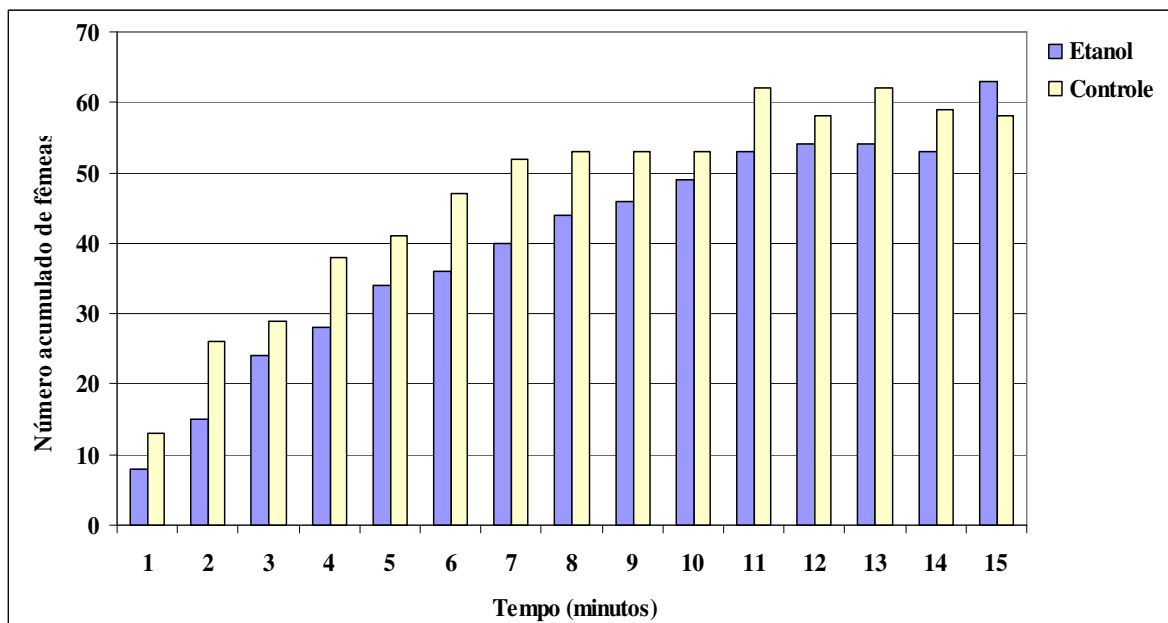


FIGURA 20 - NÚMERO ACUMULADO DE FÊMEAS, POR MINUTO, ATRAÍDAS ATÉ A MÃO CONTROLE E ATÉ A MÃO COM O ETANOL, EM TESTES REALIZADOS PELO MÉTODO NOVO (n=300)

DOGAN & ROSSIGNOL (1999) utilizaram etanol para fazer a assepsia das mãos antes de iniciar os testes com produtos repelentes, para que não ocorresse contaminação com outros odores. Indicando que o etanol não interfere nos resultados e que além de solvente pode ser utilizado para assepsia.

A diferença no número total de fêmeas atraídas em cada uma das concentrações com óleo de *T. pallida* testadas, mostrou que, de maneira geral, à medida em que a concentração do óleo aumentou o número de fêmeas que buscaram hematofagia na mão tratada reduziu (Tabela 2). Os dados foram analisados individualmente, ou seja, para cada concentração com seu respectivo controle, evidenciando que o óleo apresenta um potencial como repelente.

**TABELA 2 – COMPARAÇÃO DO NÚMERO TOTAL DE FÊMEAS ATRAÍDAS PELO ETANOL E PELAS CONCENTRAÇÕES DO ÓLEO DE *Trichilia pallida* COM SEUS RESPECTIVOS CONTROLES PELO MÉTODO NOVO**

Teste	Solvente		Óleo		Óleo		Óleo		Óleo		Óleo	
	Etanol	C	0,2%	C	1%	C	2%	C	3%	C	4%	C
1	12	0	5	5	0	8	0	6	5	6	3	4
2	8	8	6	9	1	13	2	11	2	9	2	18
3	5	5	3	10	3	9	0	9	0	5	0	11
4	3	5	4	6	1	5	0	6	3	3	3	6
5	5	9	9	8	12	9	0	8	0	14	0	10
6	9	10	3	16	12	6	8	8	2	13	1	14
7	4	4	3	8	4	6	2	6	0	13	2	11
8	6	7	4	10	5	12	7	8	4	7	1	10
9	0	1	0	2	0	3	3	3	0	15	0	10
10	3	0	2	10	1	12	9	7	1	6	1	10
11	8	0	1	5	0	9	0	6	4	13	1	12
12	0	2	0	7	0	2	0	6	3	12	1	13
13	0	2	1	9	2	8	0	9	1	16	4	13
14	0	3	1	5	0	4	1	4	2	14	1	16
15	0	13	2	13	5	4	3	12	5	10	5	10
<b>Total</b>	<b>63</b>	<b>69</b>	<b>44</b>	<b>123</b>	<b>46</b>	<b>110</b>	<b>35</b>	<b>109</b>	<b>32</b>	<b>156</b>	<b>25</b>	<b>168</b>

C = controle

O etanol foi o solvente utilizado para fazer a diluição do óleo e obter as concentrações desejadas. Foi testado também individualmente, sem o óleo e simultaneamente com o controle, para verificar se poderia ser utilizado sem que interferisse na composição e possível efeito repelente do óleo. Confirmou-se através dos testes que o etanol não apresenta efeito sobre as fêmeas. A mediana obtida através dos números totais de fêmeas atraídas nos testes com etanol e controle foi 4; sendo  $t=-0,276970$ ; grau de liberdade  $df=28$  e  $p=0,783838$  (Figura 21).

O número acumulado de fêmeas no teste com óleo de *T. pallida* na concentração a 0,2% mostrou um aumento progressivo no número de fêmeas atraídas ao óleo e seu controle, porém, a medida em que o tempo avançou a atração pelo controle foi maior em comparação com o óleo (Figura 22). Este fato pode ser em consequência da possível ação repelente do óleo ou devido a mão

controle ser a melhor opção de escolha por não ocorrer interferência de substâncias diferentes das liberadas através dos odores humanos.

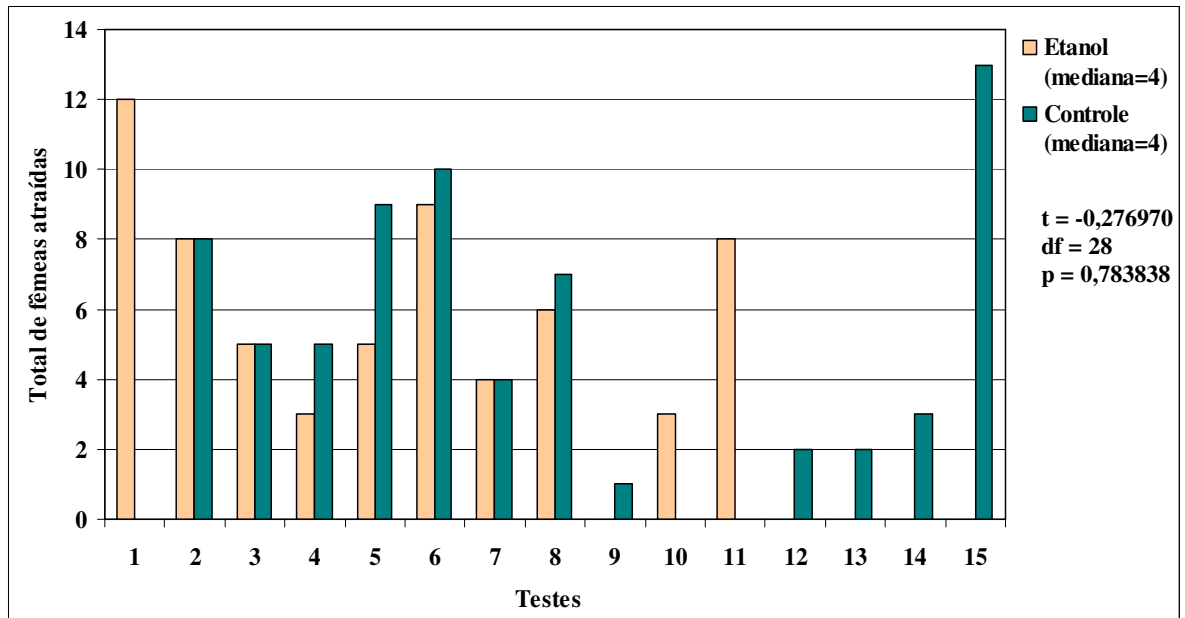


FIGURA 21 - TOTAL DE FÊMEAS ATRAÍDAS NOS TESTES REALIZADOS PELO MÉTODO NOVO COM ETANOL E SEU CONTROLE (n=300)

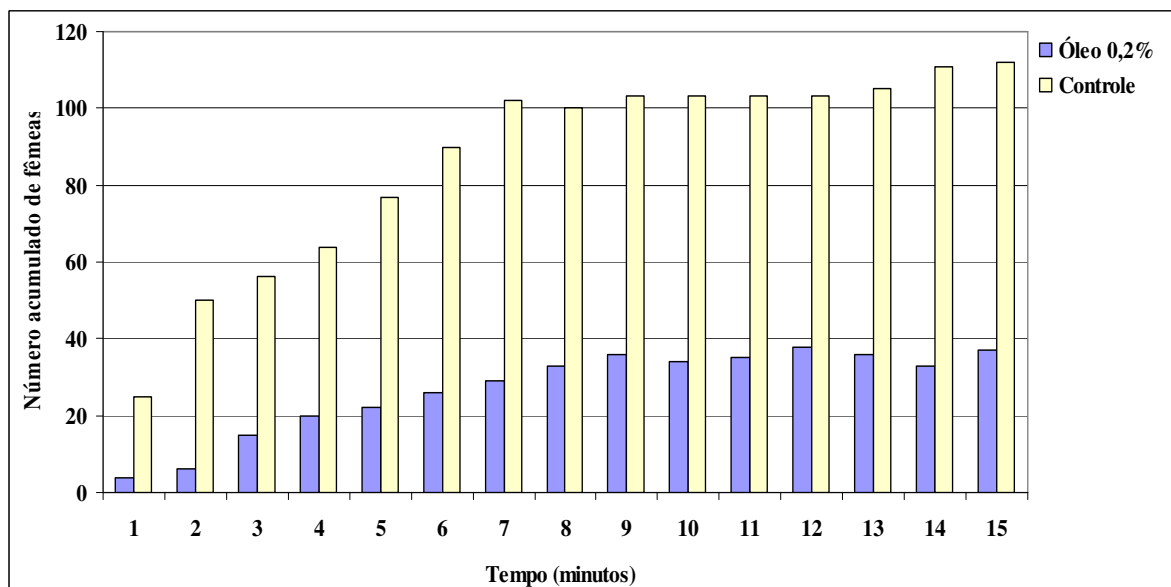
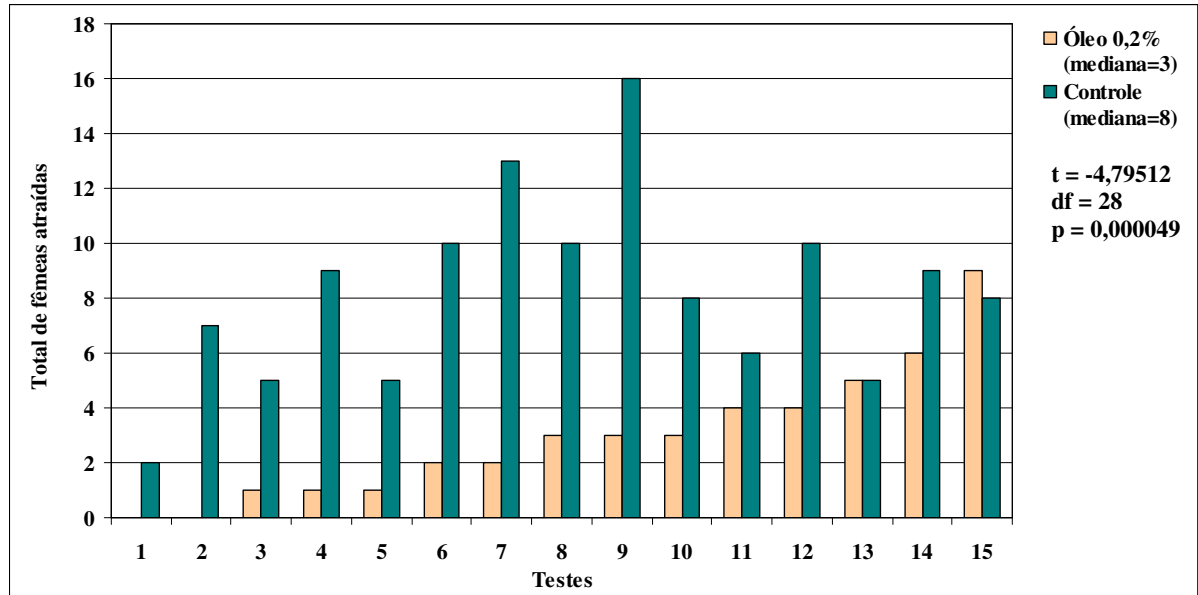


FIGURA 22 - NÚMERO ACUMULADO DE FÊMEAS, POR MINUTO, ATRAÍDAS ATÉ A MÃO CONTROLE E ATÉ A MÃO COM O ÓLEO DE *Trichilia pallida* NA CONCENTRAÇÃO 0,2%, ATRAVÉS DO MÉTODO NOVO (n=300)

A mediana obtida através dos números totais de fêmeas atraídas nos testes na concentração de 0,2% foi 3 e no seu controle 8. O valor de  $t=-4,79512$ ; grau de liberdade  $df=28$  e  $p=0,000049$  (Figura 23). Este resultado mostra-se significativo para o efeito repelente do óleo testado pelo método novo.



**FIGURA 23 - TOTAL DE FÊMEAS ATRAÍDAS NOS TESTES REALIZADOS COM ÓLEO DE *Trichilia pallida* NA CONCENTRAÇÃO 0,2% E SEU CONTROLE, ATRAVÉS DO MÉTODO NOVO (n=300)**

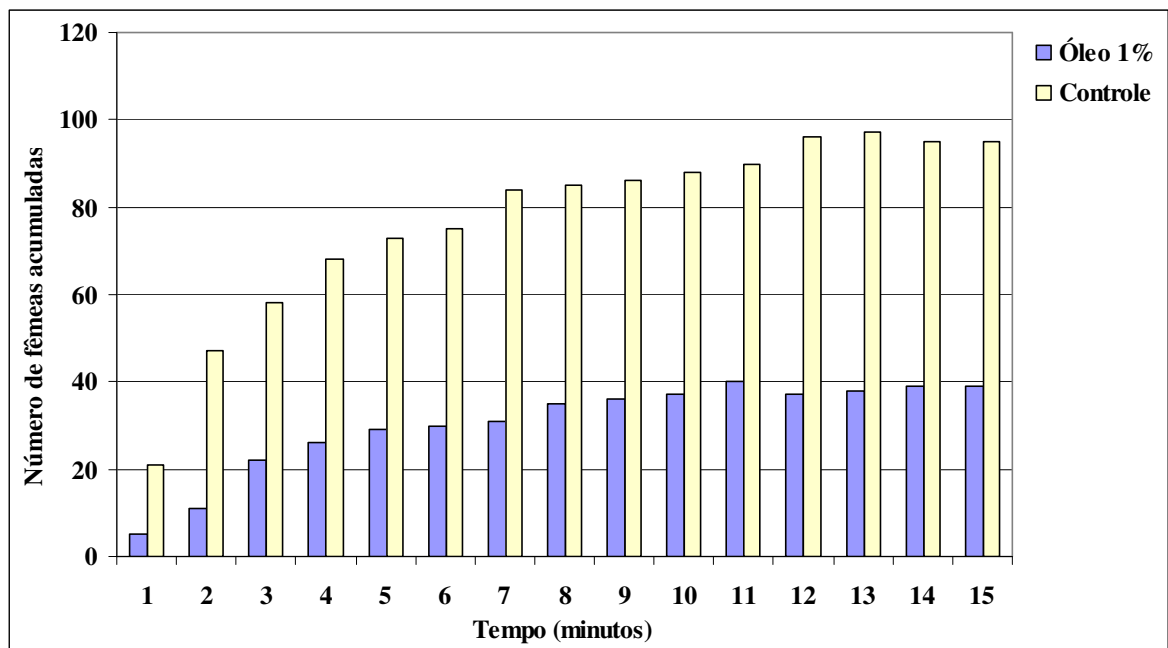
As informações sobre o uso de extratos da *T. pallida*, em concentrações próximas das utilizadas nesta pesquisa como repelente, mostram resultados positivos como inseticida, para espécies de lepidópteros durante o estágio larval.

TORRECILLAS & VENDRAMIM (2001) observaram redução na sobrevivência e no peso larval e o prolongamento do período de desenvolvimento em lagartas de *S. frugiperda*, quando foram alimentadas com folhas de milho tratadas com extrato aquoso dos ramos de *T. pallida* à 0,1% de concentração.

ROEL *et al.* (2000b) alimentando lagartas de *S. frugiperda* com folhas de milho tratadas com o extrato acetato de etila de folhas e ramos de *T. pallida* e verificaram 100% de mortalidade larval em concentração igual ou superior a 0,05% do extrato, a concentração de 0,006% afetou a sobrevivência e o desenvolvimento do inseto e não provocou qualquer efeito em concentração igual ou inferior a 0,0008%.

O óleo de *P. aduncum* apresentou efeito inseticida, para *C. tingomarianus*, na concentração de 0,04% por contato e provocou distúrbios fisiológicos pela ação da aplicação tópica em concentrações superiores a 2,5% (FAZOLIN *et. al.*, 2005).

No presente estudo o número acumulado de fêmeas nos testes com óleo de *T. pallida* na concentração a 1% mostrou resultado semelhante à concentração de 0,2%, com aumento progressivo, à medida em que o tempo avançou, em ambas situações, óleo e controle (Figura 24).



**FIGURA 24 - NÚMERO ACUMULADO DE FÊMEAS, POR MINUTO, ATRAÍDAS ATÉ A MÃO CONTROLE E ATÉ A MÃO COM O ÓLEO DE *Trichilia pallida* NA CONCENTRAÇÃO 1%, ATRAVÉS DO MÉTODO NOVO (n=300)**

A mediana obtida através dos números totais de fêmeas atraídas nos testes na concentração de 1% foi 1 e seu controle 8; sendo  $t=-3,12182$ ; o grau de liberdade  $df=28$  e  $p=0,004147$  (Figura 25).

Houve mortalidade das lagartas de *S. frugiperda* quando alimentadas com folhas de milho tratadas com o extrato aquoso dos ramos de *T. pallida* na concentração de 1% (TORRECILLAS & VENDRAMIM, 2001). O efeito inseticida de extratos aquosos na concentração 1%, de diferentes espécies pertencentes ao gênero *Trichilia* não mostrou eficiência no estágio larval de *S. frugiperda*, como observado por RODRIGUEZ & VENDRAMIM (1996, 1997) ao testarem o extrato de folhas e ramos das espécies *Trichilia elegans* A. Juss., *T. clauseni* C. DC.,

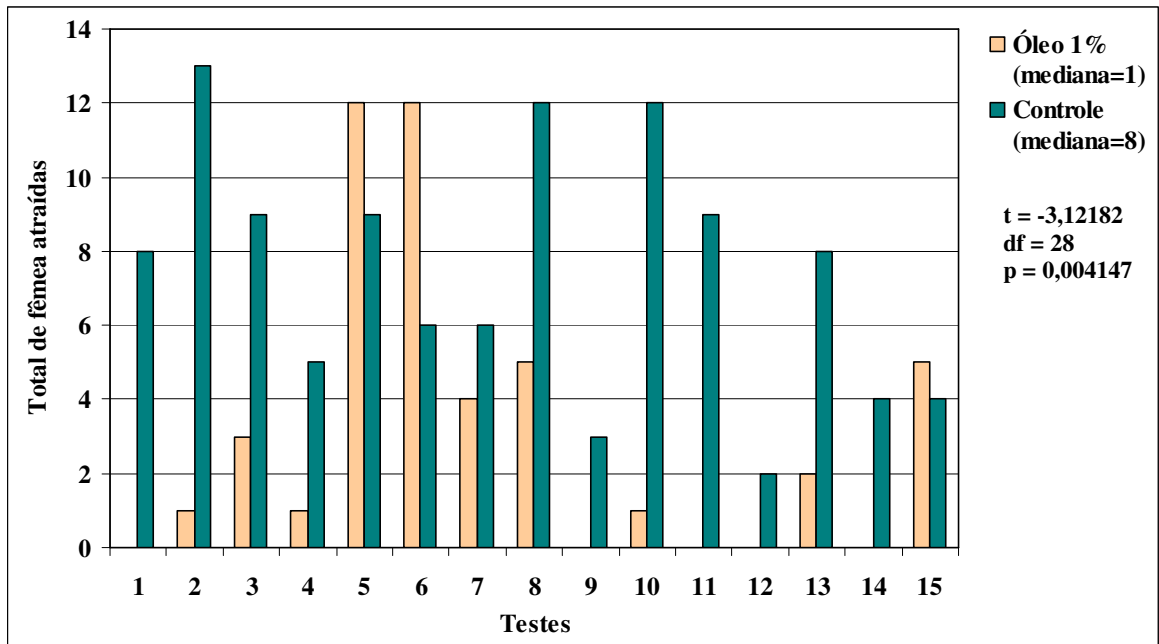


FIGURA 25. TOTAL DE FÊMEAS ATRAÍDAS NOS TESTES REALIZADOS COM ÓLEO DE *Trichilia pallida* NA CONCENTRAÇÃO 1% E SEU CONTROLE, ATRAVÉS DO MÉTODO NOVO (n=300)

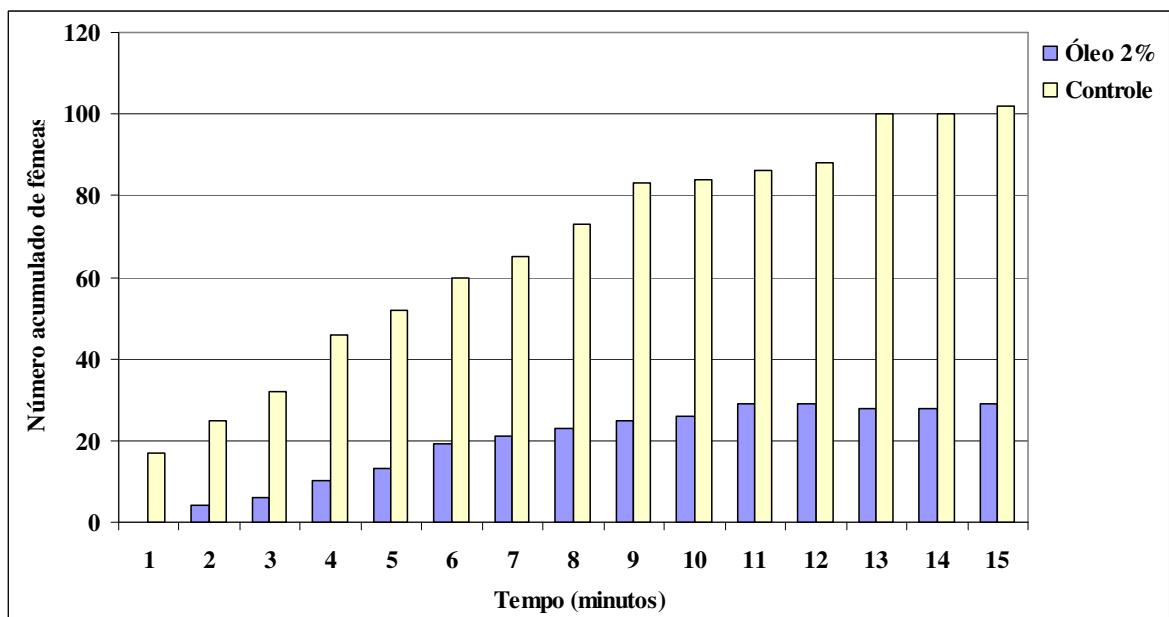
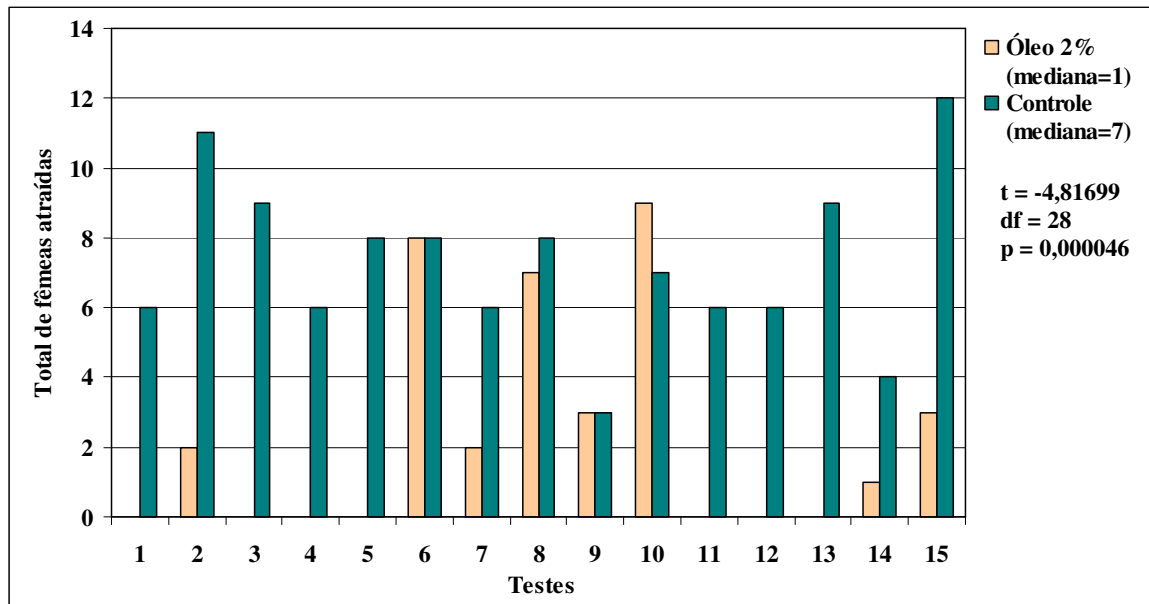


FIGURA 26. NÚMERO ACUMULADO DE FÊMEAS, POR MINUTO, ATRAÍDAS ATÉ A MÃO CONTROLE E ATÉ A MÃO COM O ÓLEO DE *Trichilia pallida* NA CONCENTRAÇÃO 2%, ATRAVÉS DO MÉTODO NOVO (n=300)

*T. casaretti* C. DC. e *T. catigua* A. Juss. A atividade inseticida dos extratos dos ramos de *T. pallida*, significativamente diferente, sobre *S. frugiperda*, em diferentes experimentos, foi observada na concentração 1%, variação na mortalidade entre 70 e 100%. O número acumulado de fêmeas no presente teste com óleo de *T. pallida*

na concentração a 2% mostrou resultado semelhante às demais concentrações de 0,2 e 1% (Figura 26).

A mediana obtida através dos números totais de fêmeas atraídas nos testes na concentração de 2% foi 1 e seu controle 7; sendo  $t=-4,81699$ ; o grau de liberdade  $df=28$  e  $p=0,000046$  (Figura 27).



**FIGURA 27 - TOTAL DE FÊMEAS ATRAÍDAS NOS TESTES REALIZADOS COM ÓLEO DE *Trichilia pallida* NA CONCENTRAÇÃO 2% E SEU CONTROLE, ATRAVÉS DO MÉTODO NOVO (n=300)**

O número acumulado de fêmeas no teste com óleo de *T. pallida* na concentração a 3% mostrou um aumento progressivo no número de fêmeas atraídas pelo controle à medida em que o tempo aumentou, enquanto que no óleo o número de fêmeas permaneceu constante durante todo o tempo, sendo inferior ao número das fêmeas atraídas pelo controle (Figura 28).

SOUZA & VENDRAMIM (2000a) utilizando a concentração de 3% do extrato de *T. pallida* obtiveram eficiente controle de *B. tabaci* biótipo B, pois o extrato dos ramos da planta provocou maior mortalidade dos ovos, mostrando-se mais eficiente do que o extrato das sementes de *A. indica* e de frutos verdes de *M. azedarach*. MARTINEZ (2002) utilizou a mesma concentração do extrato do caule de *T. pallida* e constatou eficiência como inseticida sobre *S. frugiperda*, que causou 86% de mortalidade.

A mediana obtida através dos números totais de fêmeas atraídas nos testes na concentração de 3% foi 2 e seu controle 12; sendo  $t=-7,11691$ ; o grau de liberdade  $df=28$  e  $p=0,000000$  (Figura 29).

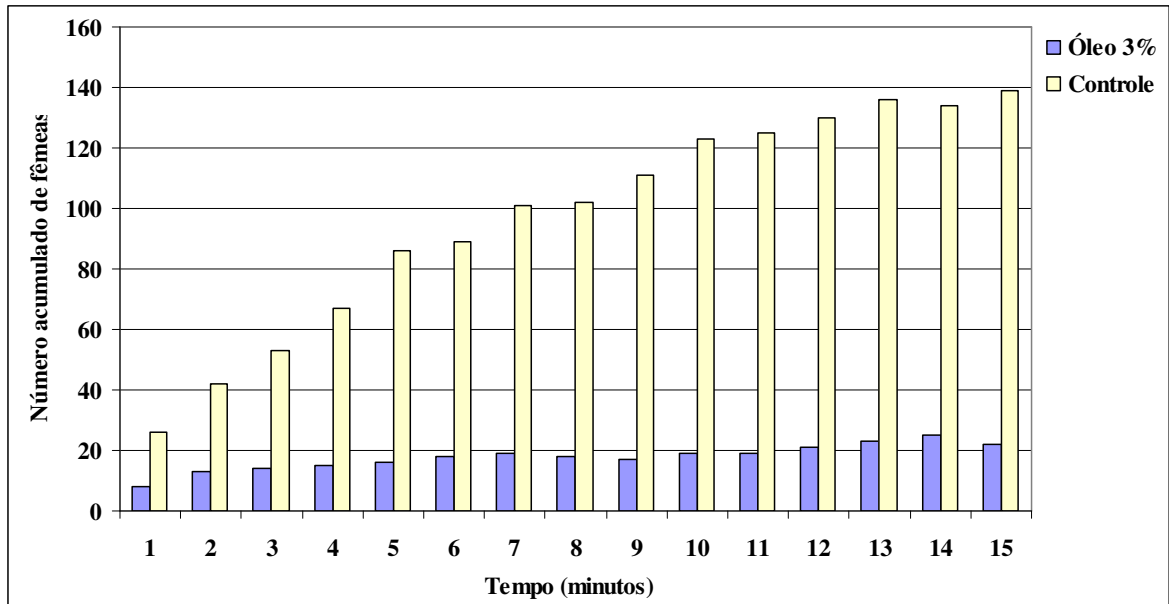


FIGURA 28 - NÚMERO ACUMULADO DE FÊMEAS, POR MINUTO, ATRAÍDAS ATÉ A MÃO CONTROLE E ATÉ A MÃO COM O ÓLEO DE *Trichilia pallida* NA CONCENTRAÇÃO 3%, ATRAVÉS DO MÉTODO NOVO (n=300)

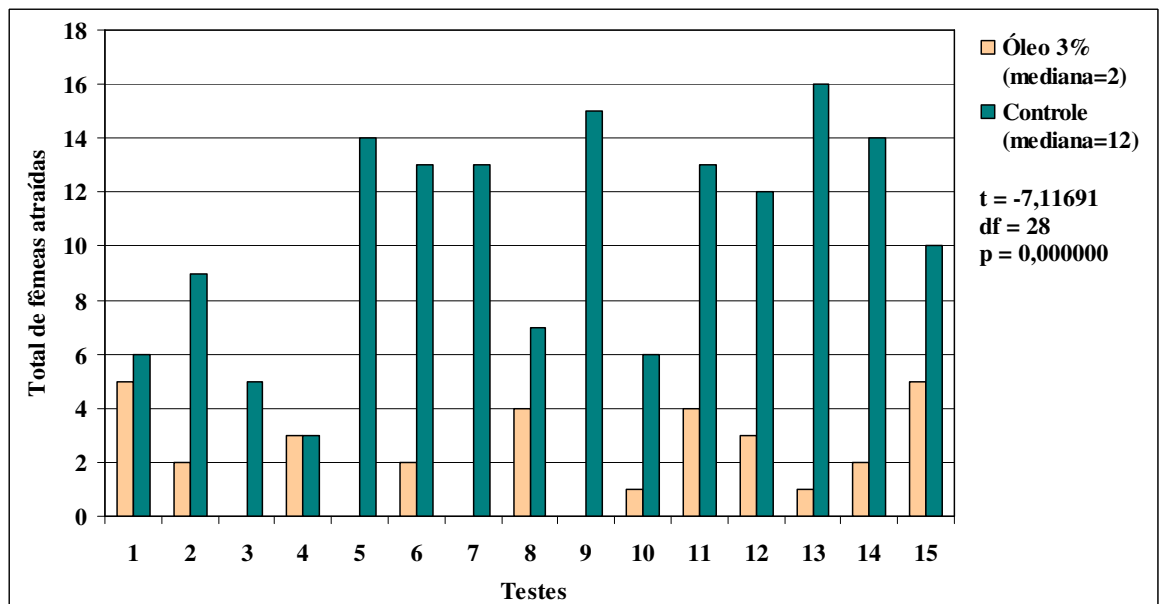
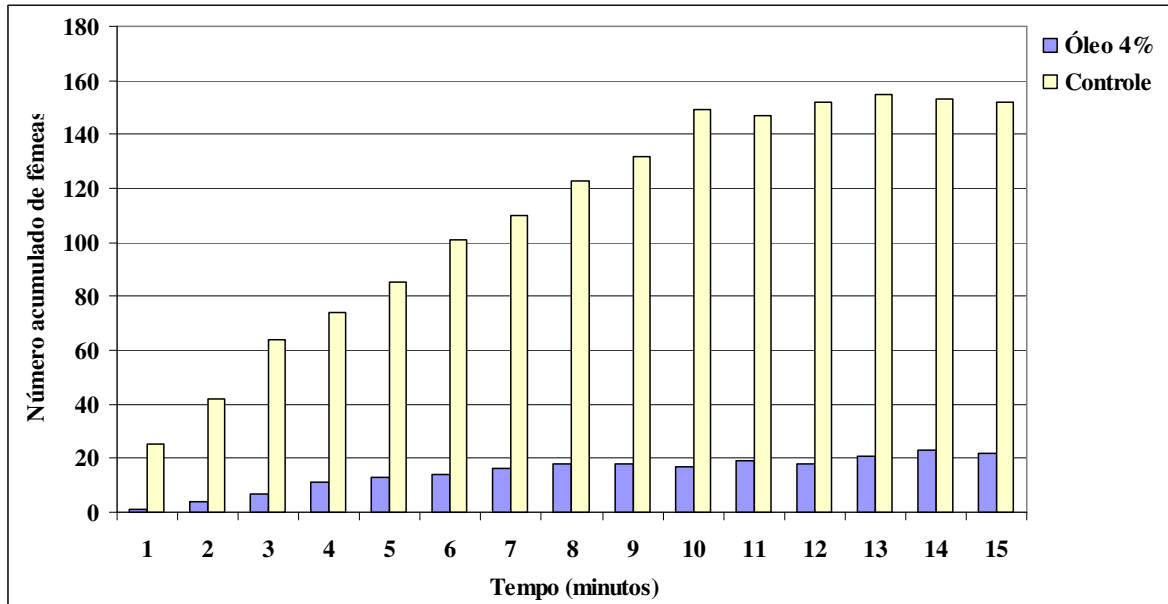


FIGURA 29 - TOTAL DE FÊMEAS ATRAÍDAS NOS TESTES REALIZADOS COM ÓLEO DE *Trichilia pallida* NA CONCENTRAÇÃO 3% E SEU CONTROLE, ATRAVÉS DO MÉTODO NOVO (n=300)

O número acumulado de fêmeas nos testes com óleo de *T. pallida* na concentração a 4% mostrou resultado semelhante à concentração 3%, com o aumento progressivo no número de fêmeas atraídas até o controle no decorrer do tempo. No óleo a atração oscilou, mas não ultrapassou o total de 25 fêmeas atraídas (Figura 30).



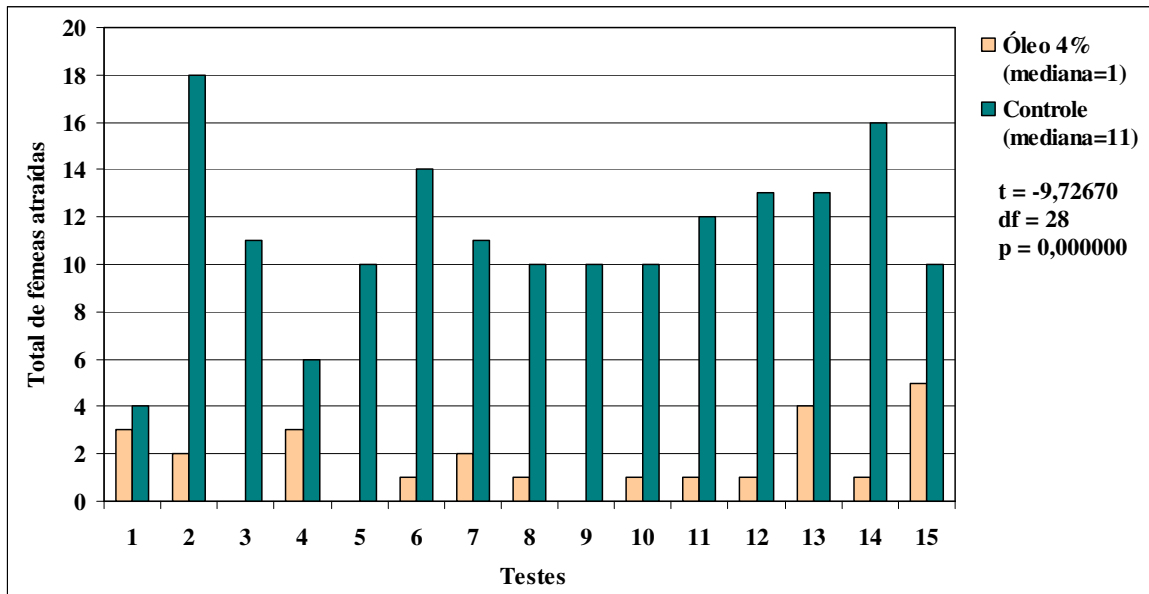
**FIGURA 30 - NÚMERO ACUMULADO DE FÊMEAS, POR MINUTO, ATRAÍDAS ATÉ A MÃO CONTROLE E ATÉ A MÃO COM O ÓLEO DE *Trichilia pallida* NA CONCENTRAÇÃO 4%, ATRAVÉS DO MÉTODO NOVO (n=300)**

MARTINEZ (2002) observou que *T. absoluta* é suscetível a extratos aquosos das folhas e ramos de *T. pallida*, e que a uma concentração de 5% (p/v) os extratos causam 80% de mortalidade. CASTIGLIONI *et. al.* (2002), com a mesma concentração do óleo, conseguiram reduzir a fecundidade das fêmeas de *Tetranychus urticae* (Koch, 1836) (Acari, Tetranychidae), reduzindo assim o dano foliar causado em *Canavalia ensiformis* (L.) D.C. (Fabaceae), observando maior eficiência dos extratos dos ramos de *T. pallida* do que o extrato das folhas.

A mediana obtida através dos números totais de fêmeas atraídas nos testes na concentração de 4% foi 1 e seu controle 11; sendo  $t=-9,72670$ ; grau de liberdade  $df=28$  e  $p=0,000000$  (Figura 31).

Durante os testes com etanol a média da temperatura interna do equipamento ficou em 25,1 °C, a média da temperatura ambiente da sala de criação ficou em 25,3 °C e a média da umidade relativa da sala ficou em 56,6%. A média do

tempo de atração da primeira fêmea, ao se aproximar da mão com etanol, apresentou diferença de 35 segundos a menos em relação ao controle (Tabela 3).



**FIGURA 31 - TOTAL DE FÊMEAS ATRAÍDAS NOS TESTES REALIZADOS COM ÓLEO DE *Trichilia pallida* NA CONCENTRAÇÃO 4% E SEU CONTROLE (n=300)**

**TABELA 3 - CORRELAÇÃO ENTRE A TEMPERATURA INTERNA E EXTERNA, E UMIDADE RELATIVA DENTRO E FORA DO EQUIPAMENTO TESTE E O TEMPO DE ATRAÇÃO, PARA OS DADOS DOS TESTES REALIZADOS COM ETANOL**

Teste	Médias			Tempo de atração	
	Temperatura interna (°C)	Temperatura externa (°C)	Umidade Relativa externa (%)	Etanol	Controle
1	23,7	23,4	67	00:00:33	-
2	24,8	25,1	42	00:03:24	00:00:30
3	21,6	23,0	60	00:00:32	00:04:12
4	24,7	24,9	60	00:02:07	00:02:16
5	25,9	26,2	57	00:02:34	00:01:00
6	24,8	24,7	59	00:00:15	00:00:10
7	26,8	26,8	60	00:02:33	00:01:50
8	24,8	24,7	57	00:02:40	00:01:40
9	23,5	23,8	49	00:00:00	00:02:57
10	26,0	26,4	61	00:02:25	-
11	24,7	25,0	52	00:00:57	-
12	27,2	27,3	53	00:00:30	00:04:15
13	25,8	25,8	50	-	00:02:34
14	26,5	27,0	62	-	00:05:18
15	26,4	26,5	60	-	00:00:43
<b>Média</b>	<b>25,14</b>	<b>25,37</b>	<b>56,6</b>	<b>00:01:14</b>	<b>00:01:49</b>
<b>Desvio Padrão</b>	<b>1,469</b>	<b>1,334</b>	<b>---</b>	<b>---</b>	<b>---</b>

Durante os testes com óleo nas concentrações a 0,2%; 1% e 2%, as médias da temperatura interna e externa ficaram em torno de 25°C, e as médias da umidade

relativa da sala ficaram em 55,8%; 56,5% e 56,4%, respectivamente ao período de testes realizados com as concentrações de óleo citadas acima.

**TABELA 4 - CORRELAÇÃO ENTRE O CLIMA DENTRO E FORA DO EQUIPAMENTO TESTE E O TEMPO DE ATRAÇÃO PARA OS TESTES REALIZADOS COM O ÓLEO DE *Trichilia pallida* NA CONCENTRAÇÃO 0,2%**

Teste	Médias			Tempo de atração	
	Temperatura interna (°C)	Temperatura externa (°C)	Umidade Relativa (%)	Óleo 0,2%	Controle
1	24,0	23,3	57	00:02:30	00:00:23
2	24,9	25,3	43	00:03:22	00:01:43
3	22,3	23,8	59	00:00:34	00:02:16
4	24,7	24,9	60	00:00:10	00:00:10
5	25,8	26,1	64	00:00:47	00:00:26
6	24,8	24,7	59	00:00:08	00:00:08
7	26,9	26,7	58	00:03:55	00:00:03
8	26,4	26,4	52	00:03:39	00:00:32
9	23,5	23,8	49	00:00:00	00:00:15
10	26,0	26,4	61	00:06:21	00:01:44
11	25,5	25,3	51	00:03:29	00:10:50
12	27,3	27,3	52	-	00:00:49
13	25,8	25,8	50	00:00:33	00:02:57
14	26,5	27,0	62	00:07:50	00:02:34
15	26,6	26,5	60	00:01:45	00:00:18
<b>Média</b>	<b>25,4</b>	<b>25,55</b>	<b>55,8</b>	<b>00:02:20</b>	<b>00:01:40</b>
<b>Desvio Padrão</b>	<b>1,375</b>	<b>1,243</b>	<b>---</b>	<b>---</b>	<b>---</b>

**TABELA 5 - CORRELAÇÃO ENTRE O CLIMA DENTRO E FORA DO EQUIPAMENTO TESTE E O TEMPO DE ATRAÇÃO PARA OS TESTES REALIZADOS COM O ÓLEO DE *Trichilia pallida* NA CONCENTRAÇÃO 1%**

Teste	Médias			Tempo de atração	
	Temperatura interna (°C)	Temperatura externa (°C)	Umidade Relativa (%)	Óleo 1%	Controle
1	24,8	23,8	56	-	00:00:50
2	25,4	25,1	43	00:02:46	00:00:23
3	23,0	24,8	59	00:00:18	00:02:18
4	24,9	25,1	56	00:15:00	00:00:10
5	25,9	26,2	66	00:00:24	00:02:33
6	24,9	24,8	60	00:00:40	00:00:11
7	26,9	27,1	65	00:02:58	00:00:19
8	27,1	27,2	50	00:01:14	00:00:21
9	23,6	23,9	51	-	00:00:42
10	26,9	27,3	67	00:14:15	00:01:01
11	25,5	25,4	51	-	00:00:27
12	27,3	27,3	52	-	00:00:25
13	26,2	26,1	51	00:02:02	00:00:37
14	26,8	27,1	61	-	00:03:54
15	26,6	26,7	60	00:04:19	00:01:36
<b>Média</b>	<b>25,72</b>	<b>25,86</b>	<b>56,53</b>	<b>00:02:55</b>	<b>00:01:03</b>
<b>Desvio Padrão</b>	<b>1,299</b>	<b>1,242</b>	<b>---</b>	<b>---</b>	<b>---</b>

A diferença na média do tempo de resposta em que a primeira fêmea se aproximou, da mão com óleo a 0,2% em relação ao seu controle foi de um minuto e vinte segundos. Na concentração de 1% essa diferença foi de um minuto e cinqüenta e dois segundos e para a concentração a 2% foi registrado diferença de um minuto e cinco segundos (Tabelas 4, 5 e 6).

Observa-se que para as três primeiras concentrações testadas, o tempo de resposta das fêmeas ficou entre um e dois minutos.

**TABELA 6 - CORRELAÇÃO ENTRE O CLIMA DENTRO E FORA DO EQUIPAMENTO TESTE E O TEMPO DE ATRAÇÃO PARA OS TESTES REALIZADOS COM O ÓLEO DE *Trichilia pallida* NA CONCENTRAÇÃO 2%**

Teste	Médias			Tempo de atração	
	Temperatura interna (°C)	Temperatura externa (°C)	Umidade Relativa (%)	Óleo 2%	Controle
1	25,3	24,2	57	-	00:00:20
2	25,5	25,2	42	00:06:23	00:00:26
3	23,7	25,3	69	-	00:00:21
4	24,8	24,9	59	-	00:00:24
5	24,0	23,9	61	-	00:00:09
6	22,6	22,7	55	00:02:55	00:01:43
7	25,3	25,2	70	00:05:35	00:02:26
8	27,4	27,7	52	00:01:55	00:00:09
9	26,6	27,7	44	00:04:41	00:03:19
10	27,4	27,5	65	00:02:25	00:00:15
11	25,3	25,4	51	-	00:06:08
12	27,3	27,2	51	-	00:03:05
13	26,6	26,5	50	-	00:00:27
14	26,8	27,1	61	00:08:01	00:00:16
15	26,6	26,8	60	00:05:10	00:01:19
<b>Média</b>	<b>25,68</b>	<b>25,82</b>	<b>56,46</b>	<b>00:02:28</b>	<b>00:01:23</b>
<b>Desvio Padrão</b>	<b>1,459</b>	<b>1,534</b>	<b>---</b>	<b>---</b>	<b>---</b>

Durante os testes com óleo nas concentrações a 3% e 4%, a média das temperaturas interna e externa ficaram em torno de 26°C e as médias da umidade relativa da sala em 58,2% e 57,7%, respectivamente às concentrações do óleo citadas acima. A diferença das médias do tempo de resposta e aproximação da primeira fêmea na mão com óleo a 3% foi dois minutos e quinze segundos, e na mão com óleo a 4% foi de três minutos e treze segundos (Tabelas 7 e 8).

**TABELA 7 - CORRELAÇÃO ENTRE O CLIMA DENTRO E FORA DO EQUIPAMENTO TESTE E O TEMPO DE ATRAÇÃO PARA OS TESTES REALIZADOS COM O ÓLEO DE *Trichilia pallida* NA CONCENTRAÇÃO 3%**

Teste	Médias			Tempo de atração	
	Temperatura interna (°C)	Temperatura externa (°C)	Umidade Relativa (%)	Óleo 3%	Controle
1	24,3	24,2	60	00:02:36	00:00:10
2	23,6	23,5	55	00:05:50	00:00:10
3	25,5	25,3	69	00:00:00	00:01:12
4	22,2	22,9	46	00:07:32	00:00:11
5	25,6	26,0	45	-	00:01:20
6	27,6	27,8	64	00:10:20	00:00:40
7	25,5	25,6	51	-	00:00:43
8	26,6	26,6	60	00:05:13	00:02:25
9	26,7	26,7	59	-	00:00:20
10	26,4	26,4	60	00:08:57	00:00:41
11	26,2	26,3	60	00:00:20	00:00:29
12	26,8	26,7	60	00:00:18	00:00:44
13	27,9	27,9	62	00:02:31	00:00:51
14	28,1	28,1	61	00:00:08	00:00:07
15	28,1	28,1	61	00:00:06	00:00:06
<b>Média</b>	<b>26,07</b>	<b>26,14</b>	<b>58,2</b>	<b>00:02:55</b>	<b>00:00:40</b>
<b>Desvio Padrão</b>	<b>1,697</b>	<b>1,619</b>	---	---	---

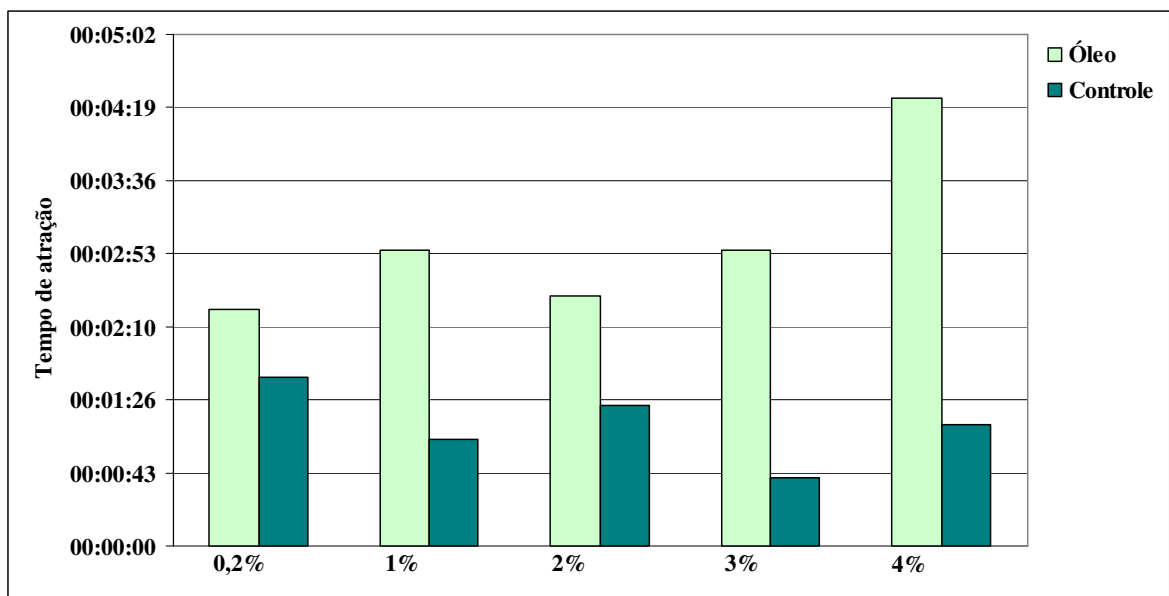
**TABELA 8 - CORRELAÇÃO ENTRE O CLIMA DENTRO E FORA DO EQUIPAMENTO TESTE E O TEMPO DE ATRAÇÃO PARA OS TESTES REALIZADOS COM O ÓLEO DE *Trichilia pallida* NA CONCENTRAÇÃO 4%**

Teste	Médias			Tempo de atração	
	Temperatura interna (°C)	Temperatura externa (°C)	Umidade Relativa (%)	Óleo 4%	Controle
1	24,4	24,5	60	00:06:49	00:03:48
2	23,7	23,7	56	00:03:28	00:00:34
3	25,6	25,4	68	-	00:00:18
4	22,8	22,9	49	00:06:48	00:04:47
5	26,4	26,8	44	-	00:00:25
6	27,4	27,7	64	00:03:57	00:02:40
7	25,6	25,6	51	00:04:08	00:00:23
8	26,6	26,6	60	00:12:57	00:00:38
9	26,7	26,7	60	-	00:02:34
10	26,5	26,5	60	00:01:56	00:00:27
11	27,1	27,0	59	00:07:13	00:00:08
12	23,7	21,3	49	00:11:24	00:00:37
13	27,5	27,5	62	00:01:28	00:00:15
14	27,7	27,7	62	00:06:05	00:00:24
15	27,7	27,7	62	00:00:03	00:00:03
<b>Média</b>	<b>25,96</b>	<b>25,84</b>	<b>57,73</b>	<b>00:04:25</b>	<b>00:01:12</b>
<b>Desvio Padrão</b>	<b>1,606</b>	<b>1,946</b>	---	---	---

Os resultados mostram que para ambas concentrações 3% e 4%, o tempo de atração média das fêmeas ficou acima de dois minutos. Observou-se que nas concentrações mais baixas o tempo de resposta das fêmeas não ultrapassou dois minutos. Essa diferença pode estar associada ao aumento da concentração do óleo,

onde as substâncias ativas, com efeito repelente, estão mais concentradas e por isso agindo de modo mais intenso e efetivo.

A média do tempo em que a primeira fêmea se aproximou da mão com óleo e da mão controle pode ser melhor visualizada através do gráfico abaixo, indicando que para todas as concentrações a atração das fêmeas pelo controle foi mais rápida do que a atração pelo óleo (Figura 32). Esse fato ocorreu devido à liberação dos odores, principalmente o ácido láctico, que são atrativos para as fêmeas de mosquito.



**FIGURA 32 - MÉDIA DO TEMPO, EM MINUTOS, PARA ATRAÇÃO E APROXIMAÇÃO DA PRIMEIRA FÊMEA ATÉ A MÃO COM ÓLEO OU ATÉ A MÃO CONTROLE, NO TESTE REALIZADO ATRAVÉS DO MÉTODO NOVO (n=1.500)**

A atração pela mão com óleo a 0,2% foi dois minutos e vinte segundos e seu controle um minuto e quarenta segundos. Em 1% o tempo de aproximação até o óleo foi duas vezes maior em relação ao controle, dois minutos e cinqüenta e cinco segundos e seu controle um minuto e três segundos. A 2% o tempo também foi de quase duas vezes para aproximação da fêmea até o óleo, dois minutos e vinte e oito segundos, até seu controle um minuto e vinte e três segundos. Na concentração de 3% de óleo manteve as fêmeas afastadas por mais tempo, em média demorou seis vezes mais a aproximação até o óleo, dois minutos e cinqüenta e cinco segundos, enquanto até o controle o tempo foi de quarenta segundos e para a concentração a

4% o tempo foi quase quatro vezes maior para o óleo, quatro minutos e vinte e cinco segundos e seu controle um minuto e doze segundos.

O efeito de seis espécies de *Trichilia*, entre elas *T. pallida*, foi estudado por BORGONI & VENDRAMIM (2003), mostrando que o extrato aquoso dos ramos dessa espécie causou alta mortalidade e redução de peso em lagartas de *S. frugiperda*.

A atividade inseticida de *T. pallida* já foi observada sobre as lagartas de *S. frugiperda* por vários pesquisadores (ROEL *et al.*, 2000a, RODRÍGUEZ & VENDRAMIM, 1996; TORRECILLAS & VENDRAMIM, 2001; ROEL & VENDRAMIM, 1999; ROEL *et al.*, 2000a, b), sobre *Tuta absoluta* (Meyrick) (THOMAZINI *et al.*, 2000) e *Bemisia tabaci* (Genn.) (SOUZA & VENDRAMIM, 2000a, b; 2001). Apesar de ser uma espécie que possui atividade inseticida para diferentes grupos de insetos e pertencer a uma das famílias de plantas mais promissoras no combate aos insetos atualmente, o efeito do óleo essencial de *T. pallida* em *Ae. aegypti*, nas concentrações testadas, não apresentaram atividade significativa como repelente, porém, concentrações mais elevadas e fracionadas do óleo, podem apresentar resultados mais precisos. Como acontece com a espécie *C. guianensis*, a andiroba, que apresenta efeito larvicida, inseticida e de repelência contra os mosquitos *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus*.

#### **3.4. Método convencional x óleo essencial de *Trichilia pallida***

O óleo essencial de *T. pallida* foi testado, também, pelo método convencional, onde a mão com óleo e em seguida a mão controle foram inseridas diretamente dentro da gaiola, sem que houvesse uma barreira para proteção contra as picadas das fêmeas. A partir do momento em que a mão foi colocada no interior da gaiola foi iniciada a contagem do tempo, sendo anotados o tempo em que a primeira fêmea pousou, o tempo em que foi sentida a primeira picada, e o número total de fêmeas que pousaram.

O etanol foi testado apenas para constatar que não causaria interferência nos compostos do óleo ao ser usado como solvente para diluir o óleo.

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 do pousos em 15 testes realizados foi de 120 fêmeas (Tabela 9).

**TABELA 9 - DADOS DE TEMPERATURA E UMIDADE RELATIVA DO AR NA SALA DE CRIAÇÃO, DURANTE A REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS, ATRAVÉS DO MÉTODO CONVENCIONAL, COM INDICAÇÃO POR TESTE DO TEMPO DO PRIMEIRO POUSO E DA PRIMEIRA PICADA DE *Aedes aegypti* 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	Total de 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>

A média da temperatura e umidade da sala de criação, durante os testes com óleo nas concentrações a 0,2%; 1% e 2% ficou 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 10, 11 e 12).

**TABELA 10 - DADOS DE TEMPERATURA E UMIDADE RELATIVA DO AR NA SALA DE CRIAÇÃO, DURANTE A REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS, ATRAVÉS DO MÉTODO CONVENCIONAL, COM INDICAÇÃO POR TESTE DO TEMPO DO PRIMEIRO POUSO E DA PRIMEIRA PICADA DE *Aedes aegypti* 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	Total pousos	1º Pousos	1º Picada	Total 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

**TABELA 11 - DADOS DE TEMPERATURA E UMIDADE RELATIVA DO AR NA SALA DE CRIAÇÃO, DURANTE A REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS, ATRAVÉS DO MÉTODO CONVENCIONAL, COM INDICAÇÃO POR TESTE DO TEMPO DO PRIMEIRO POUSO E DA PRIMEIRA PICADA DE *Aedes aegypti* 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	Total pousos	1º Pousos	1º Picada	Total 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

**TABELA 12 - DADOS DE TEMPERATURA E UMIDADE RELATIVA DO AR NA SALA DE CRIAÇÃO, DURANTE A REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS, ATRAVÉS DO MÉTODO CONVENCIONAL, COM INDICAÇÃO POR TESTE DO TEMPO DO PRIMEIRO POUSO E DA PRIMEIRA PICADA DE *Aedes aegypti* 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	Total pousos	1º Pouso	1º Picada	Total 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

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 64% e 63% de umidade relativa, respectivamente. A diferença nas médias do tempo de pouso da primeira fêmea na mão com óleo em ambas 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 que na concentração a 4% essa diferença foi de 12 segundos (Tabelas 13 e 14).

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. Efeito semelhante ao 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 13 - DADOS DE TEMPERATURA E UMIDADE RELATIVA DO AR NA SALA DE CRIAÇÃO, DURANTE A REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS, ATRAVÉS DO MÉTODO CONVENCIONAL, COM INDICAÇÃO POR TESTE DO TEMPO DO PRIMEIRO POUSO E DA PRIMEIRA PICADA DE *Aedes aegypti* 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	Total pousos	1º Pousos	1º Picada	Total 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

A resposta das fêmeas aos odores testados, sua aproximação e pouso, foram registrados com diferença de um minuto para a concentração 0,2%; em 1% o tempo foi igual para óleo e controle; e em 2%, 3% e 4% a diferença foi de dois minutos (Figura 33).

Após o pouso as fêmeas logo selecionaram o melhor local para realizar o repasto sangüíneo. E assim, como no tempo de pouso, a média do tempo da primeira picada em ambas situações, no óleo e no controle, observou-se 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 (Figura 34).

**TABELA 14 - DADOS DE TEMPERATURA E UMIDADE RELATIVA DO AR NA SALA DE CRIAÇÃO, DURANTE A REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS, ATRAVÉS DO MÉTODO CONVENCIONAL, COM INDICAÇÃO POR TESTE DO TEMPO DO PRIMEIRO POUSO E DA PRIMEIRA PICADA DE *Aedes aegypti* 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**

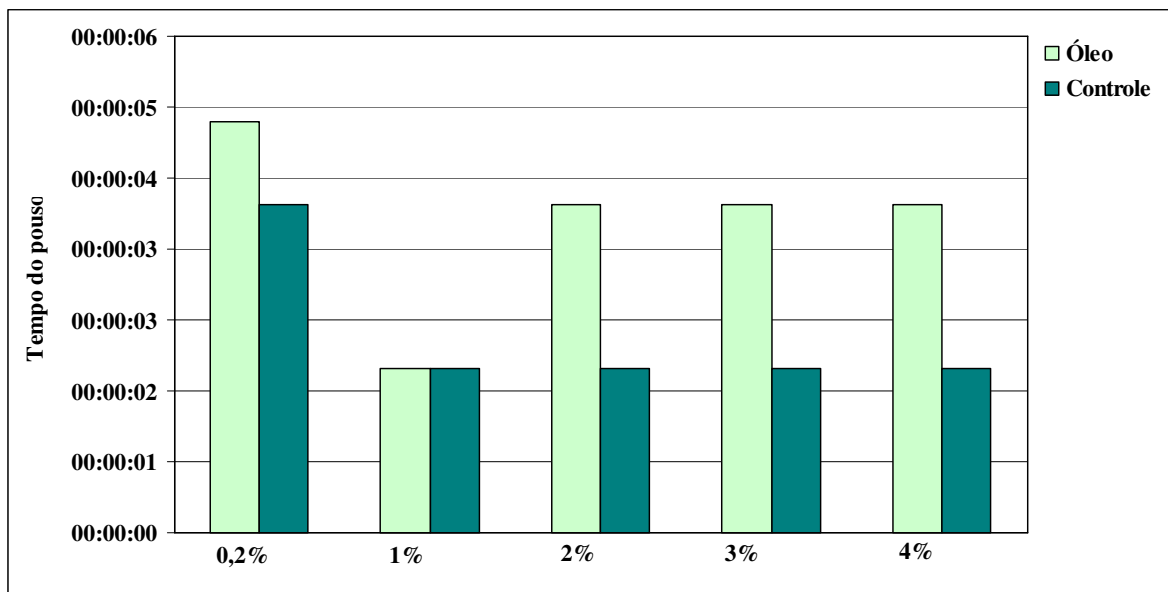
Teste	Médias		Óleo 4%			Controle		
	T. E. (°C)	U. R. (%)	1º Pousos	1º Picada	Total pousos	1º Pousos	1º Picada	Total pousos
1	24,4	60	00:00:01	00:00:56	11	00:00:05	00:00:27	12
2	23,4	64	00:00:04	00:00:24	8	00:00:02	00:00:10	7
3	25,4	68	00:00:03	00:00:12	6	00:00:05	00:00:14	9
4	23,0	57	00:00:02	00:00:17	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

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 é o potencial do efeito repelente do óleo.

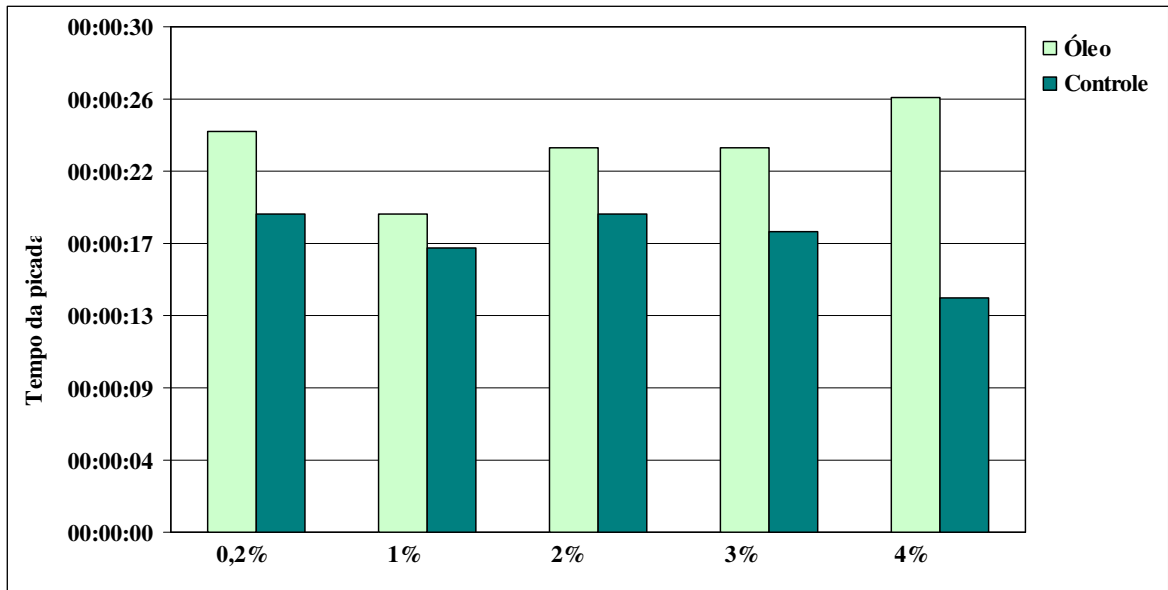
MIOT *et. al.* (2004) avaliaram, pelo método convencional, a eficácia do óleo de andiroba comparado com DEET 50%, como repelente de *Aedes sp.* Voluntários submeteram seus antebraços recobertos com óleo de andiroba a 100%, DEET 50% como controle positivo, óleo de soja refinado, óleo de andiroba 15% e ausência de produtos como controle negativo. Os tempos da primeira e terceira picadas foram registrados em segundos e os resultados mostraram que a primeira picada no antebraço sem produto ocorreu em 17,5 segundos e a terceira picada em 40,0 segundos. As picadas na pele com óleo de soja ocorreram em 60,0 segundos e

101,5 segundos, no óleo de andiroba a 100%, em 56,0 segundos e 142,5 segundos, e a 15% em 63,0 segundos e 97,5 segundos e o DEET 50% não houve picadas após 3600 segundos. A comparação do óleo de andiroba 100%, com óleo de soja, ausência de produto e óleo de andiroba 15%, mostrou discreta superioridade com  $p < 0,001$  para teste de Wilcoxon. O óleo puro de andiroba apresentou efeito repelente discreto contra picada de *Aedes* sp., sendo significativamente inferior ao DEET 50%.

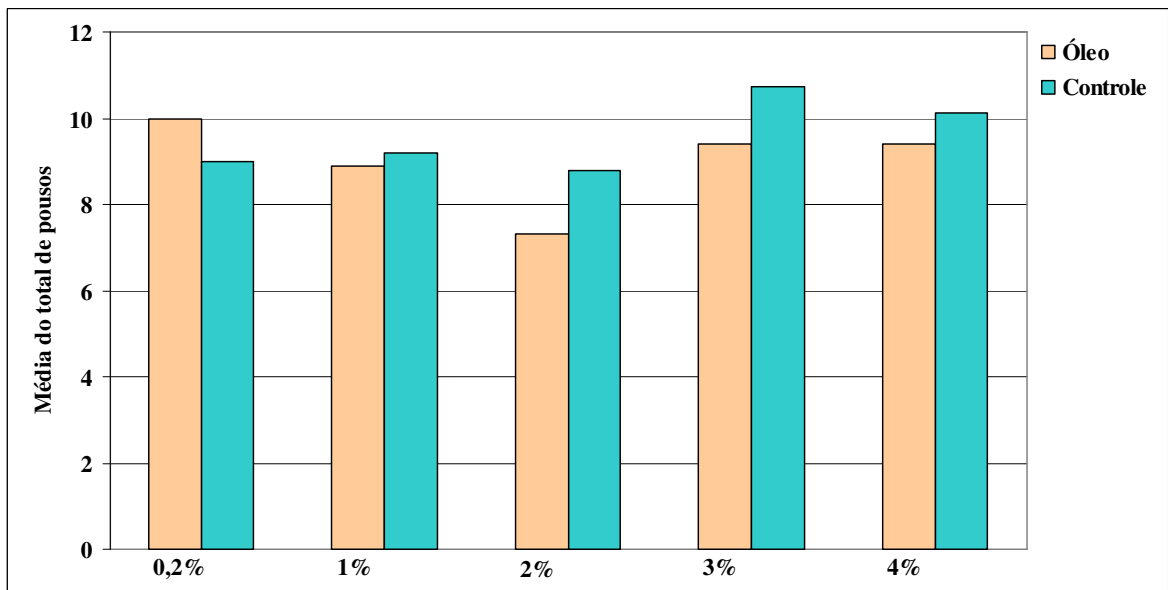


**FIGURA 33 - MÉDIA DO TEMPO, EM SEGUNDOS, PARA ATRAÇÃO E POUSO DA PRIMEIRA FÊMEA NA MÃO COM ÓLEO E NA MÃO CONTROLE, NO TESTE REALIZADO ATRAVÉS DO MÉTODO CONVENCIONAL, EM CONDIÇÕES MONITORADAS DE TEMPERATURA E UMIDADE RELATIVA DO AR (n=1.500)**

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 observado maior atração pelo controle, com exceção da concentração do óleo de *T. pallida* 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 (Figura 35).



**FIGURA 34 - MÉDIA DO TEMPO, EM SEGUNDOS, DA PRIMEIRA PICADA DE UMA DAS FÊMEAS NA MÃO COM ÓLEO E NA MÃO CONTROLE, NO TESTE REALIZADO ATRAVÉS DO MÉTODO CONVENCIONAL (n=1.500)**



**FIGURA 35 - 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 (n=1.500)**

ODALO *et al.* (2005) testando o efeito repelente do óleo essencial das plantas *Croton pseudopulchellus* Pax, *Mkilua fragrans* Verdc. (Annonaceae), *Endostemon tereticaulis* (poir.) Ashby, *Ocimum forskolei* Benth., *Ocimum fischeri* Guerke, *Plectranthus longipes* Baker (Labiatae) contra fêmeas de *Anopheles gambiae* s.s. obtiveram resultado significativo em todos os testes, sendo que as

espécies vegetais *C. pseudopulchellus* e *P. longipes* exibiram alta atividade repelente, seguidos de *M. fragrans* e *E. tereticaulis*, e com menor atividade *O. fischeri* e *O. forskolei*.

As fêmeas de *Ae. aegypti* utilizadas nos experimentos foram consideradas aptas à ingestão de sangue por estarem com idade entre 5 a 7 dias e possivelmente copuladas, pois durante o período de amadurecimento fisiológico permaneceram junto aos machos nas gaiolas de criação. Porém o controle da necessidade da fêmea em buscar sangue para sua alimentação não pôde ser confirmado devido ao número elevado de indivíduos que foram utilizados nos experimentos. Assim, um fator importante seria selecionar fêmeas que estivessem na mesma condição fisiológica no momento do teste, desta forma, as fêmeas estariam em condições de responder com a mesma intensidade aos estímulos ambientais.

### 3.5. Bioensaios com extratos

Extratos de meliáceas, incluindo a *T. pallida*, têm mostrado efeito inseticida em diferentes concentrações, quando testados em grupos variados de insetos. Porém no presente estudo, após 24 horas de exposição nos extratos de *T. pallida*, foi observada a ineficiência do hidrolato, do extrato aquoso, do extrato hexânico, do extrato diclorometano e do extrato metanólico. As larvas resistiram aos extratos, mostrando que para as concentrações testadas (25; 15; 7,5 e 5 mL), *T. pallida* não exerce efeito larvicida.

Ao contrário dos resultados, onde os extratos de *T. pallida* mostraram eficiência como inseticida de larvas, obtidos por RODRÍGUEZ & VENDRAMIM, 1996 com extratos aquosos; TORRECILLAS & VENDRAMIM, 2001 com extratos aquosos de ramos; ROEL & VENDRAMIM, 1999 e ROEL *et al.*, 2000a com extrato acetato de etila e ROEL *et al.*, 2000b, com extratos orgânicos para as lagartas de *S. frugiperda*, THOMAZINI *et al.*, 2000, com extratos aquosos para *Tuta absoluta* (Meyrick) e SOUZA & VENDRAMIM, 2000a, b; 2001, com os ramos da planta, que foi a única estrutura que proporcionou mortalidade de ovos em relação ao córtex e as folha para *Bemisia tabaci* (Genn.).

ROCHA (2004) constatou que o extrato metanólico, dos galhos de *T. pallida*, é tóxico para lagartas de *S. frugiperda*, pois causou 100% de mortalidade, e o extrato em metanol das folhas alongaram a duração das fases e reduziram o peso das pupas, enquanto o extrato hexânico causou no máximo 20% de mortalidade. O extrato diclorometano provocou 84% de mortalidade, sendo submetido à fracionamentos cromatográficos que resultaram no isolamento e identificação de três limonóides.

#### 4. CONCLUSÕES

1. O equipamento desenvolvido e adaptado para testar a repelência de produtos sintéticos comerciais e naturais sobre mosquitos, apresentou eficácia durante a execução dos experimentos com repelentes sintéticos e com o óleo da *T. pallida* e assim pode ser utilizado para avaliação de substâncias que possuem capacidade de repelir fêmeas de Culicidae.

2. Os experimentos realizados com os produtos repelentes comerciais, A, B e C, apresentaram resultados positivos, conferindo a eficácia do novo equipamento com a vantagem de se utilizar uma metodologia menos agressiva e mais ética, sem expor diretamente o hospedeiro às picadas dos mosquitos.

3. Foi extraído o óleo essencial da *T. pallida* e a identificação das substâncias feita através da técnica de cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas revelando 18 compostos, entre eles naftaleno, alfa-cubebeno, alfa-copaeno, beta-elemeno, cariofileno, alfa-humuleno, gama-muuroleno, viridifloreno, alfa-selineno, delta-cadineno, germacreno B, 10-epi-gama-eudesmol e 1-epi-cubenol, cinco dos compostos não foram identificados.

4. Os resultados obtidos através dos experimentos realizados com o óleo essencial da *T. pallida* nas concentrações 0,2%, 1%, 2%, 3% e 4% mostraram discreto efeito repelente, quando comparado com o controle, porém esses resultados não foram considerados significativos estatisticamente, indicando que o óleo nas concentrações testadas não pode ser utilizado como repelente de culicídeos.

4. Os experimentos realizados com hidrolato, extrato aquoso, extrato hexânico, extrato diclorometano e extrato metanólico não apresentaram resultados significativos em nenhuma das concentrações testadas, revelando que os extratos não possuem efeito inseticida sobre as larvas de *Ae. aegypti* de terceiro ínstar.

## 5. SUGESTÕES

1. Os resultados obtidos com os experimentos podem servir de base para futuras pesquisas, utilizando concentrações do óleo de *T. pallida* diferentes das concentrações que foram testadas no presente estudo, até que se obtenha a concentração ideal. Pois as concentrações testadas (0,2%, 1%, 2%, 3% e 4%) apresentaram efeito repelente discreto quando comparado com o controle, porém não foram considerados significativos.

2. Levando-se em consideração os resultados obtidos em pesquisas já realizadas com outros grupos de insetos, utilizando diferentes partes da *T. pallida*, onde folhas e ramos mostraram variação nos resultados, 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 ou inseticida e se essa substância pode ser utilizada para repelir culicídeos.

3. Na fase larval os insetos se alimentam e conseqüentemente estão mais expostos às substâncias tóxicas presentes nas plantas inseticidas. Contrário aos resultados de pesquisas utilizando extratos de *T. pallida* para interromper a fase larval dos insetos, os resultados obtidos no presente estudo não foram satisfatórios, necessitando de uma busca com os extratos fracionados em concentrações menores e maiores, para que seja possível avaliar se realmente a planta não tem efeito sobre as larvas de *Ae. aegypti*, bem como de outras espécies de culicídeos, ou se existe uma concentração ideal para que os extratos sejam eficientes como inseticidas.

## REFERÊNCIAS

- ABDELKRIM, A.; MEHLHORN, H. 2006. Larvicidal effects of various essential oils against *Aedes*, *Anopheles*, and *Culex* larvae (Diptera, Culicidae). **Parasitology Research** 99:466-472.
- ADAMS, R.P. 1995. Identification of Essential Oil by Ion Trap Mass Spectroscopy. **Academic Press** San Diego, CA.
- ANDRADE, C.F.S. & BUENO, V.S. 2001a. Evaluation of three laboratory methods for the comparative test of mosquito repellents using *Aedes albopictus* Skuse, 1894 (Diptera: Culicidae) in Brazil. **Annals of Medical Entomology** 10(2):34-40.
- ANDRADE, C.F.S. & BUENO, V.S. 2001b. Evaluation of electronic mosquito-repelling devices using *Aedes albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae). **Neotropical Entomology** 30(3):497-499.
- ANSARI, M.A.; VASUDEVAN, P.; TANDON, M. & RAZDAN, R.K. 2000. Larvicidal and mosquito repellent action of peppermint (*Mentha piperita*) oil. **Bioresource Technology** 71:267-271.
- ARAÚJO, E.C.C.; SILVEIRA, E.R.; LIMA, M.A.S.; ANDRADE NETO, M.; ANDRADE, I.L. & LIMA, M.A.A. 2003. Insecticidal Activity and Chemical Composition of Volatile Oils from *Hyptis martiusii* Benth. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 51(13):3760 -3762.
- BALANDRIN, M.F.; MARK-LEE, S. & KLOCKE, J.A. 1988. Biologically active volatile organosulfur compounds from seeds of the neem tree, *Azadirachta indica* (Melaiceae). **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 36:1048-1054.
- 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.
- BIDLINGMAYER, W.L. 1994. How Mosquitoes see traps: role of visual responses. **Journal of the American Mosquito Control Association** 10 Suppl. 2:272-279.
- BOGORNÍ, P.C. & VENDRAMIM, J.D. 2003. Bioatividade de extratos aquosos de *Trichilia* spp. sobre *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera:Noctuidae) em milho. **Neotropical Entomology** 32(4):665-669.
- 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.
- CARDOSO, M.G.; GAVILANES, M.L.; MARQUES, M.C.S.; SHAN, A.Y.K.V.; SANTOS, B.R.; OLIVEIRA, A.C.B.; BERTOLUCCI, S.K.V & PINTO, A.P.S. Óleos essenciais. **Boletim de Extensão** 62. Editora da Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais. 42p.
- CASTIGLIONI, E.; VENDRAMIM, J.D. & TAMAI, M.A. 2002. Evaluación del efecto tóxico de extractos acuosos y derivados de meliáceas sobre *Tetranychus urticae* (Koch) (Acari, Tetranychidae). **Agrociencia** 6(2):75-82.
- CONSOLI, R.A.G.B. & OLIVEIRA, R.L. 1998. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil** Rio de Janeiro: Fiocruz .
- 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.
- CONSTANTINI, C.; BIRKETT, M.A.; GIBSON, G.; ZIESMANN, J.; SAGNON, N.F.; MOHAMMED, H.A.; COLUZZI, M. & PICKETT, J.A. 2001. Electroantennogram an

- behavioural responses of the malaria vector *Anopheles gambiae* to human-specific sweat components. **Medical and Veterinary Entomology** 15(3):259-266.
- DEJONG, R. & KNOLS, B.G.J. 1995. Olfactory responses of host-seeking *Anopheles gambiae* s.s. Giles (Diptera:Culicidae). **Acta Tropica** 59:333-335.
- DITZEN, M.; PELLEGRINO, M. & VOSSHALL, L.B. 2008. Insect Odorant Receptors Are Molecular Targets of the Insect Repellent DEET. **Science** 319(5869):1471p.
- DOGAN, E.B.; AYRES, J.W. & ROSSIGNOL, P.A. 1999. Behavioural mode of action of deet: inhibition of lactic acid attraction. **Medical and Veterinary Entomology** 13:97-100.
- DUA, V.K.; NAGPAL, B.N. & SHARMA, V.P. 1995. Repellent action of neem cream against mosquitoes. **Indian Journal of Malariology** 32:47-53.
- DURRHEIM, D.N. & GOVERE, J.M. 2002. Malaria outbreak control in an African village by community application of "deet" mosquito repellent to ankles and feet. **Medical and Veterinary Entomology** 16:112-115.
- EDMAN, J.D. 1979. Orientation of some Florida mosquitoes (Diptera:Culicidae) toward small vertebrates and carbon dioxide in the field. **Journal of Medical Entomology** 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.
- EIRAS, A.E. & JEPSON, P.C. 1994. Responses of female *Aedes aegypti* (Diptera:Culicidae) to host odours and convection currents using an olfactometer bioassay. **Bulletin of Entomological Research** 84:207-211.
- FAZOLIN, M.; ESTRELA, J.L.V.; LIMA, A.P. & ARGOLO, V.M. 2002. Avaliação de plantas com potencial inseticida no controle da vaquinha-do-feijoeiro (*Ceratomyxa tingomarianus* Bechyné). **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento** Rio Branco: Embrapa Acre. 42p. nº37.

- FAZOLIN, M.; ESTRELA, J.L.V.; CATANI, V.; LIMA, M.S. & ALÉCIO, M.R. 2005. Toxicidade do Óleo de *Piper aduncum* L. a adultos de *Cerotoma tingomarianus* Bechyné (Coleoptera: Chrysomelidae). **Neotropical Entomology** 34(3):485-489.
- FEINSOD, F.M. & SPIELMAN, A. 1979. An olfactometer for measuring host-seeking behavior of female *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology** 15:282-285.
- 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.
- FORATTINI, O.P. 1996. **Culicidologia Médica: Princípios gerais, Morfologia, Glossário Taxonômico**. São Paulo: Editora Edusp; vol.1.
- FORATTINI, O.P. 2002. **Culicidologia Médica: Identificação, Biologia, Epidemiologia**. São Paulo, vol.2.
- FURTADO, R.F.; LIMA, M.G.A.; NETO, M.A.; BEZERRA, J.N.S. & SILVA, M.G.V. 2005. Atividade larvicida de óleos essenciais contra *Aedes aegypti* L. (Diptera:Culicidae). **Neotropical Entomology** 34(5):843-847.
- GEIER, M.; BOSCH, O.J. & BOECKH, J. 1999. Influence of odour plume structure on upwind flight of mosquitoes towards hosts. **The Journal of Experimental Biology** 202:1639-1648.
- GEIER, M. & BOECKH, J. 1999. A new Y-tube olfactometer for mosquitoes to measure the attractiveness of host odours. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 92:9-19.
- GILLIES, M.T. 1980. The role of carbon dioxide in host-finding by mosquitoes (Diptera:Culicidae): a review. **Bulletin of the Entomology Research** 70:525-532.
- GLEISER R.M. & ZYGADLO, J.A. 2007. Insecticidal properties of essential oils from *Lippia turbinata* and *Lippia polystachya* (Verbenaceae) against *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **Parasitology Research** 101(5):1349-1354.

- GOVERE J.; DURRHEIM, D.N.; BAKER, L.; HUNT, R. & COETZEE, M. 2000. Efficacy of three insect repellents against the malaria vector *Anopheles arabiensis*. **Medical and Veterinary Entomology** 14:441-444.
- GOVERE J.; BRAACK, L.E.O.; DURRHEIM, D.N.; BAKER, L.; HUNT, R.H. & COETZEE, M. 2001. Repellent effects on *Anopheles arabiensis* biting humans in Kruger Park, South Africa. 2001. **Medical and Veterinary Entomology** 15:287-292.
- HARRY, L. 1998. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 2. ed. Nova Odessa, São Paulo: Editora Plantarum.
- HEALY, T.P. & COPLAND, M.J.W. 2000. Human sweat and 2-oxopentanoic acid elicit a landing response from *Anopheles gambiae*. **Medical and Veterinary Entomology** 14:195-200.
- HEALY, T.P.; COPLAND, M.J.W.; CORK, A.; PRZYBOROWSKA, A. & HALKET, J.M. 2002. Landing responses of *Anopheles gambiae* elicited by oxocarboxylic acids. **Medical and Veterinary Entomology** 16:126-132.
- HOWSE, P.E.; STEVENS, I.D.R.; JONES, O.T. 1998. **Insect pheromones and their use in pest management** London: Editora Chapman & Hall.
- JENNINGS W. & SHIBAMOTO, T. 1980. *Qualitative Analysis of Flavor and Fragrance Volatiles by glass Capillary Gas Chromatography*. **Academic Press** New York, NY.
- KAUR S.; VARSHNEY, V.K. & DAYA, R. 2003. GC-MS analysis of essential oil of *Shorea robusta* bast. **Journal of Asian Natural Products Research** 5(3):231-234.
- KEMME, J.A.; VAN ESSEN, P.H.A.; RITCHIE, S.A. & KAY, B.H. 1993. Response of mosquitoes to carbon dioxide and 1-octen-3-ol in southeast Queensland, Australia. **J Journal of the American Mosquito Control Association** 9(4):431-435.
- KLINE, D.L.; TAKKEN, W.; WOOD, J.R. & CARLSON, D.A. 1990. Field studies on the potential of butanone, carbon dioxide, honey extract, 1-octen-3-ol, L-lactic

acid and phenols as attractants for mosquitos. **Medicl and Veterinary Entomology** 4:383-391.

KLOCKE, J.A. 1987. Natural plant compounds useful in insect control. In: Waller, G.R., Allelochemicals: Role in Agriculture and Forestry. ACS Symposium Series No. 330. **American Chemical Society**, Washington, DC. 396 - 415.

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.

LAGO, J.H.G.; SOARES, M.G.; BATISTA-PEREIRA, L.G.; SILVA, M.F.G.F.; CORRÊA, A.G.; FERNANDES, J.B.; VIEIRA, P.C. & ROQUE, N.F. 2006. Volatile oil from *Guarea macrophylla* ssp. *tuberculata*: seasonal variation and electroantennographic detection by *Hypsipyla grandella*. **Phytochemistry** 67(6):589-94.

LICCIARDI, S.; HERVE, J.P.; DARRIET, F.; HOUGARD, J.M. & CORBEL, V. 2006. Lethal and behavioural effects of three synthetic repellents (DEET, IR3535 and KBR 3023) on *Aedes aegypti* mosquitoes in laboratory assays. **Medical and Veterinary Entomology** 20:288-293.

MARTINEZ, S.S. 2002. O NIM – *Azadirachta indica*: natureza, usos múltiplos, produção. **Instituto Agronômico do Paraná**, Londrina. 142p.

MBOERA, L.E.G.; KNOLS, B.G.J.; TAKKEN, W.; HUISMAN, W.T. 1998. Olfactory responses of female *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera:Culicidae) in a dual-choice olfactometer. **Journal of Vector Ecology** 23 Suppl. 2:107-113.

McIVER, S.B.1968. Host preferences and discrimination by the mosquitoes *Aedes aegypti* and *Culex tarsalis* (Diptera:Culicidae). **Journal of Medical Entomological** 5(4):422-428.

MIOT, H.A.; BATISTELLA, R.F.; BATISTA, K.A.; VOLPATO, D.E.C.; AUGUSTO, L.S.T.; MADEIRA, N.G.; HADDAD JUNIOR, V. & MIOT, L.D.B. 2004. Comparative study of the topical effectiveness of the andiroba oil (*Carapa guianensis*) and deet 50% as repellent for *Aedes* sp. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo** 46(5):253-256.

- MORAIS S.M.; CAVALCANTI, E.S.; BERTINI, L.M.; OLIVEIRA, C.L.; RODRIGUES, J.R. & CARDOSO, J.H. 2006. Larvicidal activity of essential oils from Brazilian *Croton* species against *Aedes aegypti* L. **Journal of the American Mosquito Control Association** 22(1):161-164.
- MORELLATO, L.P. 2004. Phenology, sex ratio, and spatial distribution among dioecious species of *Trichilia* (Meliaceae). **Plant Biology** 6:491-497.
- MUKABANA, W.R.; TAKKEN, W.; COE, R. & KNOLS, B.G.J. 2002. Host-specific cues cause differential attractiveness of Kenyan men to the African malaria vector *Anopheles gambiae*. **Malaria Journal** 1:1-8.
- 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.
- MURPHY, M.W.; DUNTON, R.F.; PERICH, M.J. & ROWLEY, W.A. 2001. Attraction of *Anopheles* (Diptera:Culicidae) to volatile chemicals in western Kenya. **Journal of Medical Entomology** 38(2):242-244.
- NAVARRO, D.M.A.F.; OLIVEIRA, P.E.S.; POTTING, R.P.J.; BRITO, A.C.; FITAL, S.J.F. & SANT 'ANA, A.E.G. 2003. The potential attractant or repellent effects of different water types on oviposition in *Aedes aegypti* L. (Dipt., Culicidae). **Journal of Applied Entomology** 127:46-50.
- ODALO, J.O.; OMOLO, M.O.; MALEBO, H.; ANGIRA, J.; NJERU, P.M.; NDIEGE, I.O. & HASSANALI, A. 2005. Repellency of essential oils of some plants from the Kenyan coast against *Anopheles gambiae*. **Acta Tropica** 95:210-218.
- ORTEGO, F.; LÓPEZ-OLGUÍN J.; RUÍZ M. & CASTAÑERA P. 1999. Effects of Toxic and Deterrent Terpenoids on Digestive Protease and Detoxication Enzyme Activities of Colorado Potato Beetle Larvae. **Academic Press** 63(2):76-84.
- PAIVA, M.R. & PEDROSA-MACEDO, J.H. 1985. **Feromonas de insetos**. Curitiba-Paraná: Editora GTZ.
- PATES, H.V.; TAKKEN, W.; STUKE, K. & CURTIS, C.F. 2001. Differential behaviour of *Anopheles gambiae sensu strictu* (Diptera:Culicidae) to human and cow odours in the laboratory. **Bulletin of Entomological Research** 91:289-296.

- PATES, H.V.; LINES, J.D.; KETO, A J. & MILLER, J.E. 2002. Personal protection against mosquitoes in Dar es Salaam, Tanzania, by using a kerosene oil lamp to vaporize transfluthrin. **Medical and Veterinary Entomology** 16:277-284.
- PATRÍCIO, P.C. & CERVI, A.C. 2005. O gênero *Trichilia* P. Browne (Meliácea) no Estado do Paraná, Brasil. **Acta Biologia Paraná** 34(1 /4):27-71.
- PINTO, M.C. 2001. **Atratividade de flebotomíneos (Diptera:Psychodidae, Phlebotominae) pelos odores humanos, gás carbônico e ácido láctico, Paraná, Brasil** [Tese de Doutorado]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná.
- PURI, S.N.; MENDKI, M.J.; SUKUMARAN, D.; GANESAN, K.; PRAKASH, S.; SEKHAR, K. 2006. Eletroantennogram and behavioural responses of *Culex quinquefasciatus* (Diptera:Culicidae) females to chemicals found in human skin emanations. **Journal of Medical Entomology** 43 Suppl. 2:207-213.
- 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.
- ROBBINS, P.J. & CHERNIACK, M.G. 1986. Review of the biodistribution and toxicity of the insect repellent N,N-diethyl-m-toluamide (DEET). **Journal of Toxicology and Environmental Health** 18(4):503-25.
- ROCHA, W.C. 2004. **Busca de substâncias bioativas em plantas amazônicas: *Adiscanthus fusciflorus* (Rutaceae), *Trichilia pallida* e *T.rubra* (Meliaceae)**. [Tese de Doutorado]. São Carlos - São Paulo: Universidade Federal de São Carlos.
- RODRIGUEZ H. & VENDRAMIM, J.D. 1996. Toxicidad de extractos acuosos de Meliaceae en *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera:Noctuidae). **Manejo Integrado de Plagas** 42:14-22.
- RODRIGUEZ H. & VENDRAMIM, J.D. 1997. Avaliação da bioatividade de extratos aquosos de Meliaceae sobre *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). **Revista de Agricultura (Piracicaba)** 72:305-318.

- ROEL, AR. & VENDRAMIM, J.D. 1999. Desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) em genótipos de milho tratados com extrato acetato de etila de *Trichilia pallida* (Swartz). **Scientia Agricola** 56:581-586.
- ROEL, AR.; VENDRAMIM, J.D.; FRIGHETTO, R.T.S. & FRIGHETTO, N. 2000a. Atividade tóxica de extratos orgânicos de *Trichilia pallida* Swartz (Meliaceae) sobre *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil** 29:799-808.
- ROEL, AR.; VENDRAMIM, J.D.; FRIGHETTO, R.T.S. & FRIGHETTO, N. 2000b. Efeito do extrato acetato de etila de *Trichilia pallida* Swartz (Meliaceae) no desenvolvimento e sobrevivência da lagarta-do-cartucho. **Bragantia** 59:53-58.
- ROEL, AR. 2001. Utilização de plantas com propriedades inseticidas: uma contribuição para o Desenvolvimento Rural Sustentável. **Revista Internacional de Desenvolvimento Local** 1(2):43-50.
- 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.
- SAMAE - Serviço autônomo de água e esgoto. Município de Ibiporã – Paraná. **Aspectos físicos e geográficos**. 2003. Disponível em: <<http://www.samaeibi.com.br/munic%EDpio.htm>>. Acesso em: 14 nov. 2007.
- 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.
- 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.

- SHARMA S.K.; DUA, V.K. & SHARMA, V.P. 1995. Field studies on the mosquito repellent action of neem oil. **Southeast Asian Journal Trop. Med. Public Health** 26(1).
- SILVA, M.F.G.F.; GOTTLIEB, O.R. & DREYER, D.L. 1984. Evolution of limonoids in the Meliaceae. **Biochemical Systematics and Ecology** 12: 299–310.
- SILVA, O.S.; PROPHIRO, J.S.; NOGARED, J.C.; KANIS, L.; EMERICK, S.; BLAZIUS, R.D. & ROMÃO, P.R.T. 2006. Larvicidal effect of andiroba oil, *Carapa Guianensis* (Meliaceae), against *Aedes aegypti*. **Journal of the American Mosquito Control Association** 22(4):699-701.
- SIMAS, N.K.; LIMA, E.C.; CONCEIÇÃO, S.R.; KUSTER, R.M. & FILHO, A.M.O. 2004. Produtos naturais para o controle da transmissão da dengue – atividade larvicida de *Myroxylon balsamum* (óleo vermelho) e de terpenóides e fenilpropanóides. **Química Nova** 27(1):46-49.
- SIMMONDS, M.S.J.; STEVENSON, P.C.; PORTER, E.A. & VEITCH, N.C. 2001. Insect antifeedant activity of three new tetranortriterpenoids from *Trichilia pallida*. **Journal of Natural Products** 64:1117-1120, abril.
- 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.
- SOUZA, L.A.; MOSCHETA, I.S.; MOURÃO, K.S.M. & SILVÉRIO, A. 2001. Morphology and anatomy of the flowers of *Trichilia catigua* A. Juss., *T. elegans* A. Juss. and *T. pallida* Sw. (Meliaceae). **Brazilian Archives of Biology and Technology** 44(4):383 – 394.
- SOUZA, A.P. & VENDRAMIM, J.D. 2000a. Efeito de extratos aquosos de meliáceas sobre *Bemisia tabaci* biótipo B em tomateiro. **Bragantia** 59:173-179.
- SOUZA, A.P. & VENDRAMIM, J.D. 2000b. Atividade ovicida de extratos aquosos de meliáceas sobre a mosca branca *Bemisia tabaci* (Gennadius) biótipo B em tomateiro. **Scientia Agrícola** 57:403-406.

- SOUZA, A.P. & VENDRAMIM, J.D. 2001. Atividade inseticida de extratos aquosos de meliáceas sobre a mosca-branca *Bemisia tabaci* (Genn.) biótipo B (Hemiptera: Aleyroidae). **Neotropical Entomology** 30(1):133-137.
- STEIB, B.M.; GEIER, M. & BOECKH, J. 2001. The effect of lactic acid on odour-related host preference of yellow fever mosquitoes. **Chemical Senses** 26:523-528.
- TAKKEN, W. & KNOLS, B.G. 1999. Odor-mediated behaviour of afrotropical malarial mosquitoes. **Annual Review of Entomology** 44:131-157
- THOMAZINI, A.P.B.W.; VENDRAMIM, J.D. & LOPES, M.T.R.L. 2000. Extratos aquosos de *Trichilia pallida* e a traça-do-tomateiro. **Scientia Agrícola** 57:13-17.
- TISSOT, A.C. & NAVARRO-SILVA, M.A. 2004. Preferência por hospedeiro e estratificação de Culicidae (Diptera) em área de remanescente florestal do Parque Regional do Iguaçu, Curitiba, Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia** 21(4):877-886.
- TORRECILLAS S.M. & VENDRAMIM, J.D. 2001. Extratos aquosos de ramos de *Trichilia pallida* e o desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* em genótipos de milho. **Scientia Agrícola** 58(1):27-31.
- 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.
- TORRES-ESTRADA J.L.; RODRIGUEZ, M.H.; CRUZ-LÓPEZ, L. & ARREDONDO-JIMENEZ, J.I. 2007. Selective oviposition by *Aedes aegypti* (Diptera: culicidae) in response to *Mesocyclops longisetus* (Copepoda: Cyclopoidea) under laboratory and field conditions. **Journal of Medical Entomology** 38(2):188-192.
- VENDRAMIM, J.D. & TORRECILLAS, S.M. 1998. Efecto de extractos aquosos de *Trichilia pallida* (Meliaceae) y genótipos resistentes de maiz sobre *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). In: Simpósio Internacional sobre substâncias vegetales y minerales em el combate de plagas, 1., Acapulco. **Memorias**. Puebla: Colégio de Postgraduados. 133-144.

- VENDRAMIM, J.D. & THOMAZINI, A.P.B.W. 2001. Traça *Tuta absoluta* (Meyrick) em cultivares de tomateiro tratadas com extratos aquosos de *Trichilia pallida* wartz. **Scientia Agrícola** 58(3):607-611.
- VIEGAS JÚNIOR, C. 2003. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. **Química Nova** 26(3):390-400.
- WHEELER, D.A. & ISMAN, M.B. 2001. Antifeedant and toxic activity of *Trichilia Americana* extract against the larvae of *Spodoptera litura*. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 98(1):9-16.
- WHEELER, D.A.; ISMAN, M.B.; SANCHEZ-VINDAS, P.E. & ARNASON, J.T. 2001. Screening of Costa Rican *Trichilia* species for biological activity against the larvae of *Spodoptera litura* (Lepidoptera:Noctuidae). **Biochemical Systematics and Ecology** 29(4):347-358.
- XIE, Y.S.; ISMAN, M.B.; GUNNING, P.; MACKINNON, S.; ARNASON, J.T.; TAYLOR, D.R.; SANCHEZ, P.; HASBUN, C. & TOWERS, G.H.N. 1994. Biological – activity of extracts of *Trichilia* species and the limonoid hirtin against lepidopteran larvae. **Biochemical Systematics and Ecology** 22(2):129-136.
- ZIMBACK, L.; MORI, E.S.; KAGEYAMA, P.Y.; VEIGA, R.F.A. & MELLO JUNIOR, J.R.S. 2004. Estrutura genética de populações de *Trichilia pallida* Swartz (Meliaceae) por marcadores RAPD. **Scientia Forestalis** 65:114-119.
- ZWIEBEL, L.J. & TAKKEN, W. 2004. Olfactory regulation of mosquito-host interactions. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** 34:645-652.