



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA - UFPB
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA – CBIOTEC
CURSO DE BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

GABRIEL JOVENTINO DO NASCIMENTO

ESTUDO DA ATIVIDADE INSETICIDA E REPELENTE DO TIMOL
SOBRE AS FASES DE VIDA DO *Aedes aegypti*

JOÃO PESSOA – PB

2017

GABRIEL JOVENTINO DO NASCIMENTO

**ESTUDO DA ATIVIDADE INSETICIDA E REPELENTE DO TIMOL
SOBRE AS FASES DE VIDA DO *Aedes Aegypti***

Trabalho de conclusão de curso apresentado à
Coordenação do Curso de Biotecnologia do
Centro de Biotecnologia da Universidade
Federal da Paraíba – UFPB, em cumprimento
às exigências para obtenção do título de
Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora: PROF^a. DR^a. FABÍOLA DA CRUZ NUNES

JOÃO PESSOA – PB

2017

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

N244e Nascimento, Gabriel Joventino do.

Estudo da atividade inseticida e repelente do timol sobre as fases de vida do aedes aegypti / Gabriel Joventino do Nascimento. - João Pessoa, 2017.

48 f. : il.

Orientação: Nunes, Fabíola da Cruz.
Monografia (Graduação) - UFPB/CBIOTEC.

1. Mosquito aedes aegypti. 2. Monoterpeno. 3. Inseticida - Timol. 4. Óleos essenciais. I. Nunes, Fabíola da Cruz. II. Título.

UFPB/BC



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA (UFPB)
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA (CBiotec)
CAMPUS I – JOÃO PESSOA/PB
Coordenação do Curso de Bacharelado em
Biotecnologia



ATA DE DEFESA PÚBLICA DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Aos vinte e três dias do mês de novembro de 2017, às 10:00 h, em sessão pública no auditório do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM) deste Campus Universitário, na presença da Banca Examinadora presidida pela Professora Fabíola da Cruz Nunes e composta pelos avaliadores 1. Prof. Dr. Valdir de Andrade Braga (CBIOTEC/UFPB); 2. Ms. Diégina Araújo Fernandes (PPgPNSB/CCS/UPB), o discente Gabriel Joventino do Nascimento, matrícula 11312729, apresentou o Trabalho de Conclusão de Curso intitulado: **Estudo da atividade inseticida e repelente do timol sobre as fases de vida do *Aedes aegypti***, como requisito curricular indispensável para a integralização do Curso de Graduação em Biotecnologia. Após reunião em sessão reservada, a Banca Examinadora deliberou e decidiu pela aprovação do referido trabalho, divulgando o resultado formalmente a discente e demais presentes e eu, Fabíola da Cruz Nunes, na qualidade de Presidente da Banca, lavrei a presente ata que será assinada por mim, pelos demais avaliadores e pela discente.

Fabíola da Cruz Nunes Presidente da Banca Examinadora
Valdir de A. Braga Avaliador 1

Gabriel J. do Nascimento Discente
Diégina Araújo Fernandes Avaliador 2

João Pessoa/PB, 23 de novembro de 2017.

Dedico esse trabalho a todos que amo, em especial aos meus pais, só cheguei até aqui devido a todo esforço que fizeram por mim e a todo cuidado que tiveram comigo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela permissão do acontecimento de todo esse caminho que trilhei até aqui.

Agradeço aos meus pais por todo apoio e suporte durante toda a minha graduação, só eu sei o quanto eles foram importantes para a conclusão deste trabalho.

Agradeço a todos os meus amigos da nossa eterna sala 10: Aline Dantas, Alex Rique, Andrwey Viana, Caroline Targino, Débora Lacerda, Fabrine Hilário, Karolyne Estrela, Melina Lins, Rafael Goulart, Ray Arruda e Tarcísio Bonifácio por todos os momentos de companheirismo e por tornar essa jornada mais leve.

Agradeço as minhas companheiras de laboratório Louise Helena e Patrícia Alexandria, e a todos que passaram pelo LAPAVET por tornarem a rotina no laboratório mais prazerosa.

Agradeço em especial aos meus amigos Aline Dantas, Andrwey Viana e Caroline Targino por me ajudarem em situações específicas, me incentivando a nunca desistir dos meus objetivos.

Agradeço aos meus amigos André Tork, Thaynara Viegas e Amanda Freire, não importa onde eu esteja, sempre sentirei saudades de vocês.

Agradeço a minha amiga Edna Alves, que dividiu comigo os melhores momentos em casa ao longo de todos os anos da minha graduação.

Agradeço a minha amiga Joyce Ferreira e ao meu primo Jhonny Rafael por me apoiarem mesmo estando longes.

Agradeço a Fabíola Nunes, por todos os seus ensinamentos não só como orientadora, mas também como amiga. Obrigado pela paciência e por contribuir com meu crescimento pessoal e profissional.

Ao **Centro de Biotecnologia** – Cbiotec e a **Universidade Federal da Paraíba** - UFPB por proporcionarem as condições, espaço e estrutura necessários para a minha formação acadêmica e social.

Agradeço a Banca Examinadora, composta por Diégina Fernandes e Valdir Braga por aceitarem fazer parte desse momento tão especial da minha vida acadêmica.

Agradeço a todo corpo docente do centro de Biotecnologia, por me guiarem nessa jornada de aprendizado e incríveis experiências.

Agradeço a todos que contribuíram de forma indireta ou do jeito mais simples possível, as coisas mais simples da vida tornam-se extremamente importantes quando passamos ao lado de pessoas agradáveis.

RESUMO

O *Aedes aegypti* é um mosquito que causa grande impacto na saúde pública. Responsável pela transmissão de doenças como a dengue, chikungunya e zika, o *Ae. aegypti* é de difícil controle pois é um inseto de hábito antropofílico, altamente adaptado à ambientes urbanos, presente em todos os estados do Brasil e em outros países de clima tropical. As fêmeas do mosquito *Ae. aegypti* são as únicas que se alimentam de sangue, e quando contaminadas, transmitem os vírus no momento do repasto sanguíneo. A principal forma de combater essas arboviroses ainda é realizar o controle do vetor, seja destruindo seus criadouros ou com o uso de inseticidas. Os inseticidas químicos são os mais utilizados no controle, porém, desde as últimas décadas, há relatos do desenvolvimento de resistência por parte desses insetos. Além disso, maioria deles apresenta um alto poder residual, que com o uso contínuo pode causar danos a saúde humana direta ou indiretamente. Com isso, começou-se a busca por novas alternativas de inseticidas e repelentes naturais, principalmente pelo fato já comprovado de que o DEET, repelente mais utilizado no mundo, pode causar graves danos no sistema nervoso, principalmente em crianças, quando expostas excessivamente ao produto. O timol é uma substância química que pertence à classe dos monoterpenos e está presente na composição de vários óleos essenciais, como no do tomilho, orégano e alecrim. Os óleos essenciais são conhecidos por suas propriedades como anti-inflamatórios, antibióticos e inseticidas. Como o Timol é encontrado em grandes quantidades na composição de diversos óleos essenciais, o objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade inseticida e repelente do timol em mosquitos *Ae. aegypti*. Foram realizados bioensaios avaliando a atividade inseticida do timol em todas as fases do ciclo de vida do mosquito. Os resultados demonstraram que o Timol possui ação inseticida e repelente. Destaca-se a alta atividade larvicida do timol, que mesmo em baixas concentrações (0,1mg/mL) causou a morte de 100% das larvas do mosquito, além de demonstrar inibição na eclodibilidade dos ovos, atividade adulticida e repelente. Dessa forma, conclui-se que o timol pode ser utilizado como princípio ativo na composição de inseticidas e repelentes contra o mosquito *Ae. aegypti*.

Palavras-chave: Mosquito, monoterpeno, óleos essenciais.

ABSTRACT

Aedes aegypti is a mosquito that causes great impact on public health, especially because it is responsible for transmission of diseases such as dengue, chikungunya and zika. The difficulty in controlling *Ae. aegypti* is most because it is an anthropophilic insect, highly adapted to urban environments, and present in all Brazilian states and in other tropical countries. The females of the mosquito are the only ones that feed on blood. When this blood is contaminated, the virus is transmitted at the time of blood repast. The primary way to fight these arboviruses is still to control the vector, either by destroying their breeding grounds or by using insecticides. Chemical insecticides are the most used on vector control; however, since the last decades, development of resistance by these insects has been reported. In addition, most of them have a high residual power, which can cause harm to human health directly or indirectly if used continuously. This fact led us to search for new alternatives insecticides and natural repellents, mainly because DEET (the most widely used insect repellent in the world) can cause serious damage to the nervous system, especially in children exposed continuously to this product. Thymol is a chemical that belongs to a class of monoterpenes and is present in the composition of several essential oils, such as thyme, oregano and rosemary. Essential oils are known for their function as anti-inflammatories, antibiotics and insecticides. As Thymol is found in large amounts on several essential oils, the objective of this work was to evaluate the insecticidal and repellent activity of thymol on *Ae. aegypti*. Bioassays were performed evaluating the insecticidal activity of thymol in every phase of the mosquito life cycle. The results showed that thymol presents insecticidal and repellent action since the high thymol larvicide activity caused the death of 100% of the *Ae. aegypti* larvae even at low concentrations (0,1 mg / mL), besides demonstrating inhibition in egg hatchability, adulticidal activity and repellent. Therefore, it can be concluded that thymol can be used as an active compound in the composition of insecticides and *Ae. aegypti* repellents.

Keywords: Mosquito, monoterpene, essential oils.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Distribuição do <i>Aedes aegypti</i> . Brasil, 2016.....	14
Figura 2 Larva de <i>Aedes aegypti</i> em terceiro estágio (L3).....	15
Figura 3 Fase de pupa do <i>Aedes aegypti</i>	17
Figura 4 Mosquito fêmea do <i>Aedes aegypti</i> em posição de repouso.....	19
Figura 5 Mosquitos <i>Aedes aegypti</i> macho e fêmea	20
Figura 6 Ciclo de vida do <i>Aedes aegypti</i>	20
Figura 7 Aspecto macroscópico e molecular do timol	23
Figura 8 Ovos do <i>Aedes aegypti</i> durante realização de teste de eclodibilidade	25
Figura 9 Grupo controle negativo de teste larvicida preeliminar, após 24h com observação de presença de pupas.	26
Figura 10 Taxa de eclosão de ovos de <i>Ae. aegypti</i> expostos ao timol durante o período de 24 horas	30
Figura 11 Taxa de mortalidade de larvas de <i>Ae. aegypti</i> expostas a diferentes concentrações do timol durante o período de 24 horas	31
Figura 12 Larvas mortas após 24 h em solução de timol a 0,1mg/mL	32
Figura 13 Mortalidade de pupas de <i>Ae. aegypti</i> expostas ao timol na concentração de 0,05mg/mL durante 24 horas	33
Figura 14 Taxa de mortalidade de mosquitos de <i>Ae. aegypti</i> após teste de contato corporal em dose de 0,1mg/mL do timol	34
Figura 15 Produção de NO em cultura de hemócitos expostos ao timol.....	35
Figura 16 Ocorrência de necrose celular em cultura de hemócitos expostos ao timol	36
Figura 17 Potencial repelente do timol comparado a outras substâncias	37

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 Histórico do <i>Aedes aegypti</i> no Brasil.....	13
2.2 Biologia do <i>Aedes aegypti</i>	14
2.2.1 Ovo	14
2.2.2 Larva	15
2.2.3 Pupa	16
2.2.4 Adultos.....	17
2.3 Métodos de controle do <i>Aedes aegypti</i>	21
2.3.1 Inseticidas	21
2.3.2 Repelentes.....	21
2.3.3 Timol.....	22
3 OBJETIVOS	24
3.1 Geral.....	24
3.2 Específicos	24
4 METODOLOGIA.....	25
4.1 Ensaio de inibição de eclodibilidade do timol em ovos de <i>Ae. aegypti</i>	25
4.2 Ensaio de atividade Larvicida do timol contra o <i>Ae. aegypti</i>	26
4.3 Ensaio de atividade pupicida do timol contra o <i>Ae. aegypti</i>	27
4.4 Ensaio de atividade adulticida do timol contra o <i>Ae. aegypti</i>	27
4.5 Avaliação da ocorrência de morte celular de hemócitos de <i>Ae. aegypti</i> expostos ao timol	27
4.5.1 Cultura celular primária de hemócitos de <i>Ae. aegypti</i>	27
4.6 Dosagem de óxido nítrico na cultura celular	28
4.7 Avaliação da atividade repelente do Timol contra o <i>Ae. aegypti</i>	28
4.8 Análise Estatística.....	29
5 RESULTADOS	30
6 DISCUSSÃO	38
7 CONCLUSÕES.....	41
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos a saúde pública tem enfrentado um importante desafio de conter o inseto *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762), uma vez que é considerado o principal vetor dos vírus da dengue, chikungunya e zika (Terra *et al*, 2017).

As evidências existentes apontam que o *Ae. aegypti* se originou na África tropical, habitando ambientes silvestres, como escavações em rochas e troncos de árvores. Com o passar do tempo essa espécie adaptou-se aos centros urbanos, onde as alterações provocadas pelo homem propiciam sua proliferação. No continente americano, acredita-se que tenha sido transportada em barris que vinham dos navios de exploradores e colonizadores (Dive, 2007).

Nas terras brasileiras, as primeiras suspeitas ligadas ao mosquito apareceram em meados do século XVIII, época em que havia o comércio de escravos negros vindos da África. Porém, somente no final do século XIX que cientistas passaram a estudar detalhadamente o inseto, vindo então a descobrir as doenças que estes eram capazes de provocar, além de descobrir formas de combatê-los. O *Ae. aegypti* apresenta grande capacidade de adaptação a criadouros artificiais, o que possibilita o aumento de sua população e, por conseguinte, o aparecimento de epidemias devido ao seu hábito antropofílico (Consoli & Oliveira, 1994).

Controlar o *Ae. aegypti* tem sido um grande e importante desafio, principalmente em países emergentes. Até em situações onde recursos são liberados especificamente para a aplicação de programas de combate ao vetor, na maioria das vezes não se tem alcançado sucesso. Os problemas de infraestrutura das cidades, como baixas coberturas na coleta de lixo e intermitência no abastecimento de água, são fatores que comprometem a efetividade dos métodos tradicionais de controle do *Aedes sp.* (Zara *et al.*, 2016; Coelho, 2008).

Atualmente o território brasileiro passa por um momento com alta incidência de arboviroses (dengue, chikungunya e zika), mas além disto, alguns dados epidemiológicos apontam números preocupantes de casos graves e muitos óbitos. Outro problema atual é a associação do zika vírus com a síndrome de Guillain-Barré e, principalmente, com a transmissão vertical, resultando em casos de microcefalia, que têm sido motivo de alarme nacional e internacional (Terra *et al*, 2017).

Para a redução da densidade populacional do *Ae. aegypti*, recomenda-se o controle integrado. O controle integrado é um conjunto de ações preventivas e corretivas, para impedir a atração, abrigo, acesso ou proliferação de vetores e pragas urbanas e, como parte deste controle, o uso de inseticidas e repelentes ambientais. No entanto, tal prática tem levado à seleção de populações de insetos resistentes. Dessa forma, faz-se necessário buscar métodos alternativos que sejam mais seguros, eficazes, com preços acessíveis e biodegradáveis (Silva *et al.*, 2014; Brasil, 2016b).

Os óleos essenciais são misturas complexas de compostos lipofílicos, de baixo peso molecular, e geralmente odoríferos. São obtidos por meio da destilação por arraste a vapor d'água de diversas partes dos vegetais. As análises físico-químicas dos óleos essenciais demonstram que estes são constituídos por diferentes compostos, como hidrocarbonetos, álcoois, aldeídos, cetonas, entre outros, os quais são responsáveis por suas propriedades físico-químicas e biológicas (Simões *et al.*, 2004). Os terpenóides constituem a maior classe encontrada em produtos naturais de plantas, sendo classificados pelo número de carbonos, o qual é resultado do número de moléculas de isopreno (2-metil-1,3-butadieno) presentes em sua estrutura. Nos óleos essenciais os compostos terpênicos mais encontrados são monoterpenos (C10) e sequiterpenos (C15), que cada vez são mais estudados devido às diversas propriedades biológicas apresentadas por estes compostos (Dubey *et al.*, 2003).

Dentre os milhares de compostos que podem estar presentes na composição dos óleos essenciais, o timol se destaca devido a sua atividade antimicrobiana. Este monoterpeno aromático é um dos principais constituintes dos óleos essenciais de várias plantas aromáticas, tais como o Tomilho (*Lamiaceae*), Orégano (*Labiatae*) e alecrim (*Verbenaceae*) (Peixoto-Neves *et al.*, 2010).

Dessa forma, este estudo tem como objetivo avaliar as atividades inseticida e repelente do Timol sobre o mosquito *Aedes aegypti*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Histórico do *Aedes aegypti* no Brasil

Os primeiros relatos sobre a presença do *Aedes aegypti* no Brasil, aconteceram a partir do século XVIII, período colonial onde existia o tráfico de escravos, fator que deve ter ocasionado a introdução da espécie no país (Teixeira et al., 2007).

No ano de 1955, o *Ae. aegypti* foi amplamente combatido e erradicado, devido ao fato de ser o vetor da febre amarela urbana. A espécie foi reintroduzida no Brasil no final da década de 60, possivelmente pela não erradicação do mosquito nos países vizinhos. Além disso, o crescimento da população na década de 70, a urbanização e falhas na vigilância epidemiológica fizeram com que o vetor fosse reintroduzido permanentemente no país (Terra et al., 2017).

O combate ao *Ae. aegypti* foi institucionalizado no Brasil, de forma sistematizada, a partir do século XX. Diversas epidemias de febre amarela urbana ocorriam no País, levando à morte milhares de pessoas (WHO,1997). A primeira campanha pública contra a febre amarela urbana, iniciada por Oswaldo Cruz no Rio de Janeiro (1902-1907), instituiu as brigadas sanitárias, cuja função era detectar casos de febre amarela e eliminar os focos de *Ae. aegypti* (Löwy, 1990; Donalísio, 1999). Nos anos entre 1930 e 1940, a Fundação Rockefeller incentivou a execução de intensas campanhas de erradicação de *Ae. aegypti* nas Américas. Entre os anos de 1923 e 1940, essa Fundação atuou contra a febre amarela nas cidades litorâneas do nordeste, da mesma forma como vinha executando em outros países (Löwy, 1990). A partir de um acordo com o Departamento Nacional de Saúde Pública (DNSP), essa campanha conferia àquela organização norte-americana a responsabilidade exclusiva pela eliminação do *Ae. aegypti*. A falta de controle da febre amarela nas regiões norte e nordeste foi o principal argumento usado pela Fundação Rockefeller para a celebração do acordo, sob essa condição (Braga, 2007; Löwy, 1990). Desde o ano de 2006 até os dias atuais o *Ae. aegypti* pode ser encontrado nos 26 estados e no Distrito Federal (Figura 1).

Figura 1: Distribuição do *Aedes aegypti*. Brasil, 2006



Fonte: Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Diretoria Técnica de Gestão, Programa Nacional de Controle da Dengue.

2.2 Biologia do *Aedes aegypti*

2.2.1 Ovo

Os ovos de *Aedes aegypti* são elípticos, alongados, e dotados de simetria bilateral. Têm cor pálida no momento da oviposição, tornando-se escuros após alguns minutos, sendo que os inférteis geralmente não alcançam a tonalidade escura dos férteis. A "casca" dos ovos dos mosquitos é conhecida como cório, caracteristicamente impermeável. O exocório geralmente apresenta ornamentações que auxiliam na identificação específica (Consoli & Oliveira, 1994). As fêmeas de *Aedes aegypti* colocam seus ovos fixando-os em paredes úmidas, próximas ao nível da água. O tamanho dos ovos varia entre 0,6 a 0,7mm. A fecundação acontece durante a postura e o embrião se desenvolve completamente em 48h, em condições favoráveis de umidade e temperatura. Estes ovos suportam grandes períodos de seca após o desenvolvimento embrionário (podendo persistir na natureza por aproximadamente 450 dias), sem sofrer nenhum dano. Com a umidade as larvas eclodem (Dive, 2007).

2.2.2 Larva

O aspecto das larvas é alongado e vermiforme. O corpo divide-se em cabeça, tórax e abdômen, sendo que a cabeça e tórax possuem aspecto globoso, enquanto o abdômen é alongado e constituído de nove segmentos (Forattini,1962) (Figura 2). No oitavo segmento da larva é encontrado o sifão respiratório ou tubo respiratório, assim, apenas a extremidade desse órgão é necessária estar na superfície da água para a larva respirar. (Forattini,1962). As larvas vivem na água se alimentando e vindo à superfície para respirar. Mudam de tamanho 4 vezes, chamados de estádios ou estágios (Dive 2007).

Figura 2: Larva de *Aedes aegypti* em terceiro estágio (L3)



Fonte: Autor (2017)

A atividade alimentar é intensa e rápida e sua alimentação é a base de algas e partículas orgânicas dissolvidas na água. Não resistem a longos períodos sem alimentação, não tolerando águas muito poluídas e luz intensa. Quando há movimentos bruscos na água e sob feixe de luz deslocam-se com rapidez para o fundo do depósito demorando a retornar à superfície. Após o 4º estágio as larvas se transformam em pupas (3 a 4 dias) (Gullan, 2017).

2.2.3 Pupa

As pupas, fase evolutiva que resulta da quarta ecdise, apresentam caracteres morfológicos e biológicos bastante afastados dos das larvas. A forma geral das pupas lembra uma vírgula, com um cefalotórax desprovido de apêndices e o abdome com oito segmentos aparentes e um outro rudimentar; este último, sob um par de paletas natatórias (Rey, 2010) (Figura 3). Durante esta fase não se alimentam e utilizam a energia armazenada na fase de larva. Tem um par de tubos respiratórios ou trombetas, que atravessam a água e permitem a respiração. Nesta etapa, sofrem as últimas transformações para a formação da fase adulta. Após 2 a 3 dias, emerge o adulto. O tempo total de ovo até a fase adulta leva em média 7 a 8 dias. A temperatura pode influenciar no tempo de cada fase. Por exemplo, abaixo de 20°C este período de desenvolvimento pode ser mais longo (Dive, 2007). As pupas apresentam comportamento muito móvel e ativo, com rápidos movimentos de extensão do abdome e de suas paletas natatórias, foge para o fundo, quando qualquer estímulo a excite. Uma reserva de ar, acumulada entre os esboços das futuras asas, ajuda a flutuação (Gullan, 2017).

Figura 3: Fase de pupa do mosquito *Ae. aegypti*



Fonte: Autor (2017)

2.2.4 Adultos

Apresenta-se como um mosquito rajado, de cor escura em geral, com manchas brancas pelo corpo. Sua identificação é facilitada pela presença de um desenho na forma de lira em seu dorso, que pode ser distinguido mesmo a olho nu. Escamas brancas, alternando-se com manchas escuras, são encontradas na região posterior da cabeça. Nas pernas, apresentam anéis brancos contrastando com sua cor escura (Rey, 2010). A aparência geral é de pequenos insetos, medindo em média 0,5 cm de envergadura, de porte delgado e pernas longas, sendo os machos geralmente menores que as fêmeas. A cabeça apresenta formato globular, o tórax é achatado lateralmente e o abdômen é cilíndrico. Suas asas são estreitas, alongadas e permanecem postas sobre o abdômen quando em repouso (Forattini, 1962) (Figura 4).

As antenas apresentam dimorfismo sexual evidente, sendo que nos machos possuem o tóro maior e com pelos mais numerosos e alongados que as fêmeas. Assim, as antenas dos machos apresentam um aspecto plumoso, enquanto nas fêmeas, apresentam o aspecto piloso (Forattini, 1962) (Figura 5). Após a emergência do mosquito, é necessário um período de muitos minutos ou até horas para que haja o endurecimento do esqueleto externo e das asas. No

período de no máximo 24 horas eles estão totalmente prontos para voar e acasalar. Seu tamanho é de aproximadamente 3 mm. Apenas as fêmeas se alimentam de sangue, de preferência humano. Na falta de sangue humano, podem se alimentar de sangue de outros animais. Machos, e também fêmeas, alimentam-se de sucos vegetais, fontes de carboidratos para os processos metabólicos para a manutenção básica da vida (Dive, 2007). O repasto sanguíneo das fêmeas fornece proteína para maturação dos ovos e acontecendo geralmente durante o dia, com picos de maior atividade ao amanhecer e pouco antes do entardecer (Rey, 2010).

A fêmea grávida é atraída para recipientes escuros, sombreados, úmidos ou com água, com superfícies ásperas nas quais depositam os ovos, ao contato contínuo com a água os ovos eclodem dando origem a um novo ciclo (Figura 6). Preferem água limpa (ambiente ideal para o desenvolvimento das larvas) ao invés de água poluída ou com muita matéria orgânica. Costumam invadir caixas d'água e cisternas mal vedadas, piscinas, vasos com água no interior de residências e nos cemitérios (Neves, 2011; Dive, 2007).

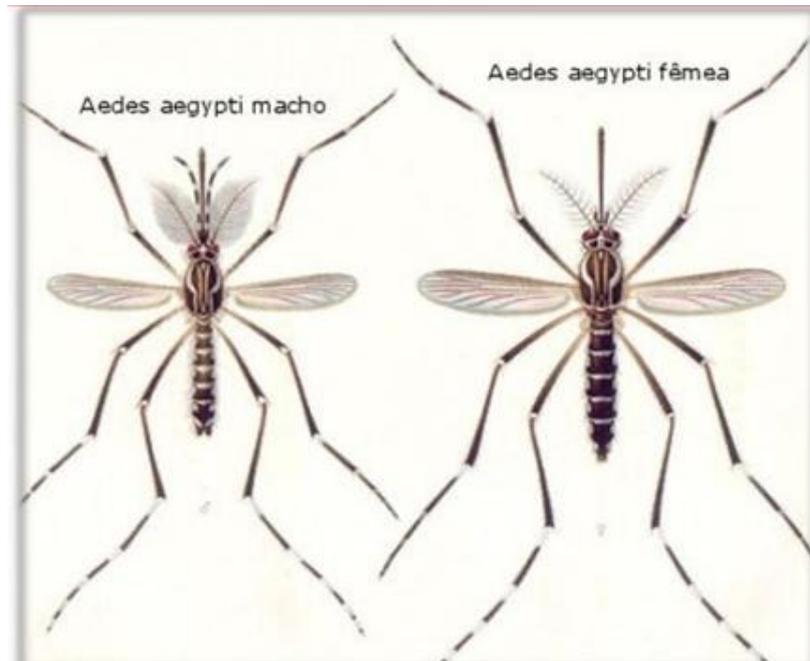
A tendência do *Aedes aegypti* é permanecer onde nasceu abrigoando-se dentro das habitações. Quando a quantidade de mosquito é muito grande, ele se espalha para diversos pontos, voando num raio em torno de 100 metros. A fêmea grávida, quando não encontra depósitos para oviposição, pode se deslocar através do voo até 1.000 metros. O mosquito adulto vive em média 30 a 35 dias na natureza, podendo este período ser maior em condições de laboratório. Deposita em média 400 a 600 ovos durante a vida (Dive, 2007).

Figura 4: Mosquito fêmea *Ae. aegypti* em posição de repouso



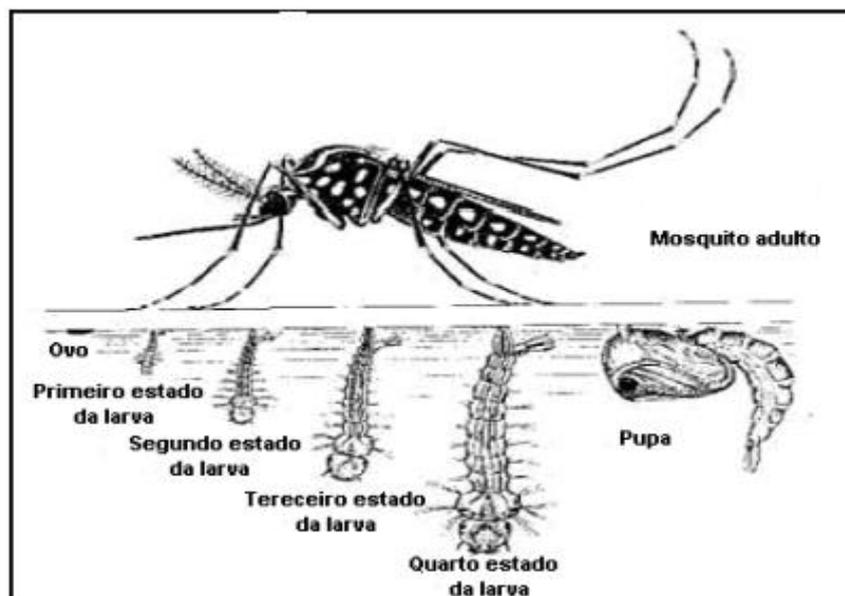
Fonte: Autor (2017)

Figura 5: Mosquitos *Ae. aegypti* macho e fêmea



Fonte: Reconheça o *Aedes aegypti*; <http://www.mdsaude.com>

Figura 6: Ciclo de vida do mosquito *Ae. aegypti*



Fonte: DIVE (2007)

2.3 Métodos de controle do *Aedes aegypti*

2.3.1 Inseticidas

Os óleos minerais, produtos inorgânicos e extratos de plantas (piretro, nicotina, rotenona etc.) foram os primeiros inseticidas a serem utilizados e tiveram largo emprego até 1945, quando surgiram os primeiros inseticidas organoclorados, o DDT (diclorodifeniltricloroetano) e BHC (hexaclorobenzeno). Sintetizado em 1874, mas com sua ação inseticida só descoberta por Muller, em 1938, o DDT se tornou o mais largamente inseticida utilizado em todo mundo devido ao seu grande poder inseticida, sua estabilidade elevada e o seu baixo custo (Neves, 2011). O BHC foi isolado e descrito em 1912 por Linden, seu potencial inseticida só foi descoberto durante a Segunda Guerra Mundial, por volta dos anos 1941 à 1943 (Neves, 2011). Os inseticidas clorados têm como característica uma ação letal não muito rápida e um efeito residual muito longo de três meses até acima de um ano, atuando diretamente nos receptores de GABA dos insetos. Os organoclorados são insolúveis em água, solúveis em líquidos apolares, e, conseqüentemente, em óleos e gorduras, o que ocasiona o seu acúmulo no tecido adiposo dos organismos vivos (Braibante e Zappe, 2012).

Os inseticidas fosforados também começaram a ser produzidos a partir de 1945 e diferente dos organoclorados, os organofosforados são biodegradáveis e não acumulam nos tecidos. Por volta de 1960, entraram no comércio os carbamatos. Os inseticidas dos grupos fosforados e carbamatos, possuem como característica, ação letal rápida sobre o inseto e um poder residual mais curto, de 5 a 30 dias aproximadamente. Atuam inibindo acetilcolinesterase através da atuação na reação de carbamilação (Waliszewski, 2003; Palchick, 1996; Neves, 2011; Ware, 2000).

2.3.2 Repelentes

Os repelentes de mosquitos são amplamente utilizados para evitar a exposição a doenças. Eles são especialmente úteis quando usados onde a atividade humana corresponde aos padrões de atividade diurna dos mosquitos, por exemplo, atividades ao ar livre que ocorrem ao entardecer e amanhecer (Rodriguez et al., 2015). O cheiro é um dos sentidos mais importantes que os mosquitos usam para a busca de hospedeiros de longo alcance (Potter 2014). O olfato dos insetos envolve um sistema complexo composto por receptores odorantes,

co-receptores de receptores odorantes, receptores gustativos e proteínas de ligação odorante (Kaupp 2010, Suh et al., 2014). Diversos atrativos e repelentes de mosquitos foram identificados, muitos dos quais são produzidos pelo metabolismo humano ou pela degradação bacteriana dos componentes do suor, como o ácido láctico por exemplo (Zwiebel e Takken 2004). Estudos demonstraram que diferentes repelentes de insetos usam um modo de ação similar. Cada repelente se liga e interage com receptores específicos odorantes e gustativos, alterando sua atividade e exercendo os seus efeitos dissuasivos (Kwon et al., 2010; Dickens e Bohbot 2013; Xu et al., 2014).

O repelente de insetos mais utilizado atualmente é o N, N-dietil-metanol, mais conhecido como DEET. No entanto, efeitos adversos ao uso do DEET tem sido relatados, sendo alguns graves o suficiente para causar distúrbios sensoriais e afetar a capacidade motora, a memória e a capacidade de aprendizagem (Rahman et al., 2004; DeGennaro, 2015). Além disto, o DEET não é recomendado para crianças, pois em altas concentrações pode causar encefalopatia e outros efeitos deletérios (Rahman et al., 2001). Devido a esses possíveis efeitos colaterais do DEET foram desenvolvidos uma grande quantidade de repelentes de mosquitos "livres de DEET" com uma variedade de ingredientes ativos. Os repelentes à base de plantas geralmente contêm óleos vegetais essenciais como ingredientes ativos.

2.3.3 Timol

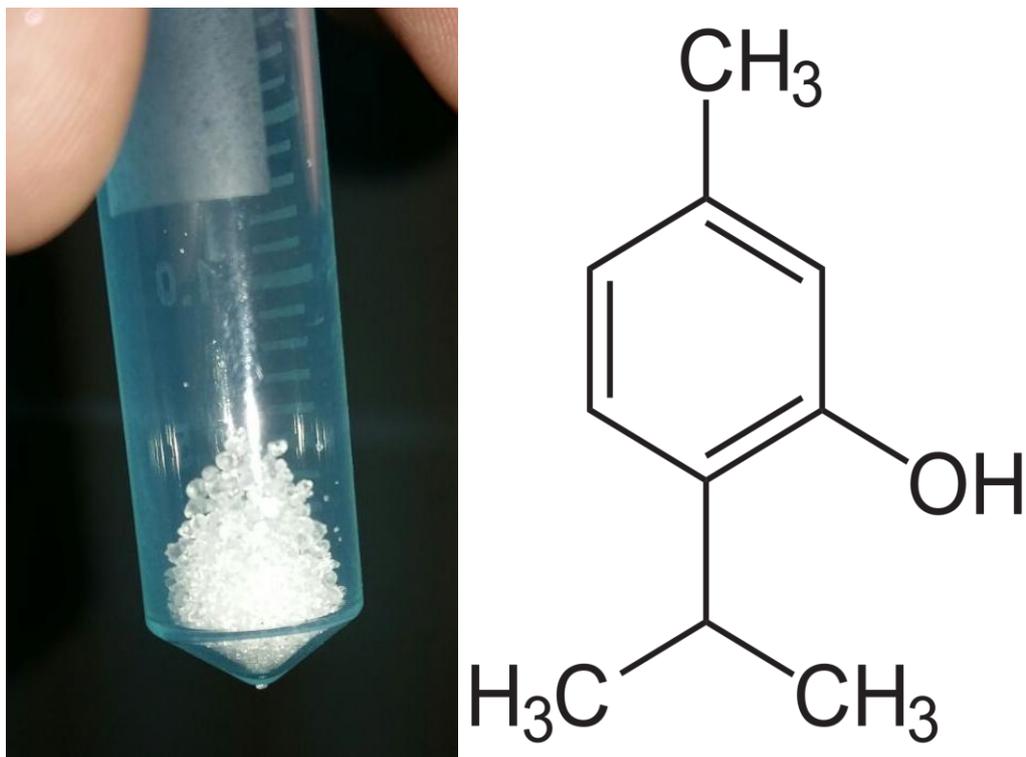
Os terpenóides compõem a maior classe encontrada em produtos naturais de plantas, sendo classificados pelo número de carbonos, o qual é resultado do número de moléculas de isopreno (2-metil-1,3-butadieno) presentes em sua estrutura. Nos óleos essenciais os compostos terpênicos mais encontrados são monoterpenos (C10) e sequiterpenos (C15), que cada vez são mais estudados devido às diversas propriedades biológicas apresentadas por estes compostos (Dubey et al., 2003).

Dentre os milhares de compostos presentes nos óleos essenciais, o timol se destaca devido suas atividades antibacteriana, antifúngica, anti-inflamatória, sobre o sistema nervoso, anticancerígena e inseticida (Helander et al. 1998; Braga et al. 2008; Guimarães et al. 2012; Melo et al. 2010; Yin et al. 2012; Linnaeus, 1758). O timol (2-iso-propil-5-metilfenol) é uma substância cristalina incolor com um odor característico presente na natureza principalmente nos óleos essenciais de tomilho e orégano (Figura 7) (Budavari, 1989).

O orégano e tomilho são condimentos muito apreciados na culinária mediterrânea, e possuem o timol em quantidades abundantes. O timol também é usado em cosméticos e perfumaria (Pozzo et al. 2011).

O timol é usado oralmente no tratamento de bronquite, tosse convulsa, dor na garganta, diarreia, dispepsia, gastrite, distúrbios da pele, desinfetante urinário e anti-helmíntico. Topicamente, ele é usado em bochechos para evitar cáries e para combater a halitose e também é a base de muitos linimentos anti-inflamatórios. Por suas propriedades antibacterianas e antifúngicas, também é utilizado em colírios (Silva et al., 2016)

Figura 7: Aspecto macroscópico e estrutura química do timol



Fonte: Autor (2017)

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar a atividade inseticida e repelente do timol sobre o mosquito *Aedes aegypti*.

3.2 Específicos

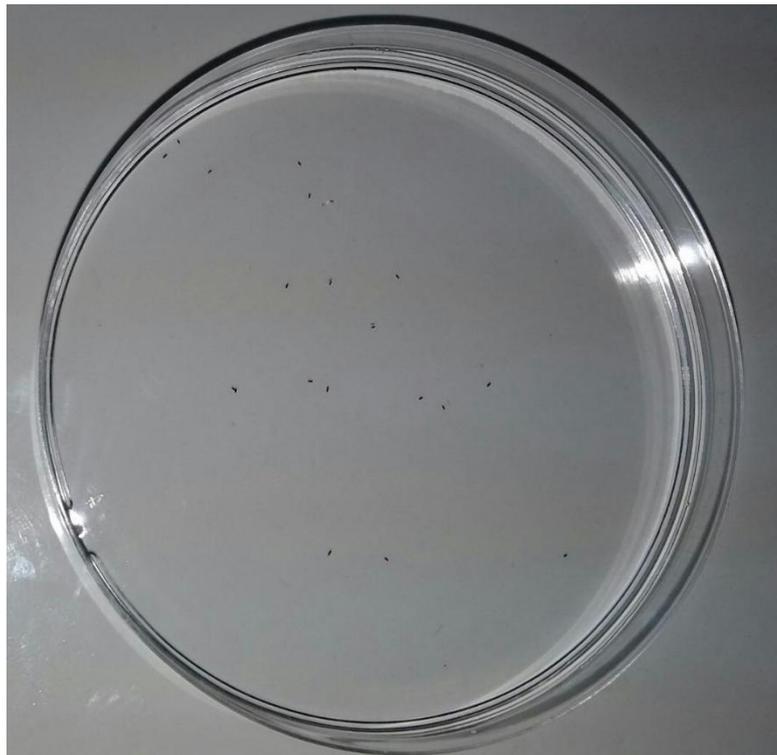
- Avaliar a atividade do timol sobre a eclosão de ovos;
- Avaliar a atividade do timol sobre as larvas;
- Avaliar a atividade do timol sobre as pupas;
- Avaliar a atividade do timol sobre mosquitos adultos;
- Dosar a concentração de óxido nítrico em células;
- Avaliar a ocorrência de necrose celular;
- Avaliar a atividade repelente do timol sobre mosquitos *Ae. aegypti*.

4 METODOLOGIA

4.1 Ensaio de inibição de eclodibilidade do timol contra ovos de *Ae. aegypti*

O efeito inibitório do timol sobre a eclodibilidade de ovos de *Ae. aegypti* foi avaliado a partir da menor concentração capaz de matar 100% das larvas de mosquito (0,1mg/mL). Discos de papel filtro contendo 25 ovos foram imersos em placas de Petri (15,0 cm de diâmetro x 2,0 cm de profundidade), contendo 25mL da solução teste, o suficiente para encobrir os ovos (Figura 8). Após um período de 24 horas foi avaliada a taxa de eclosão dos ovos. Nos grupos controle os ovos foram expostos à água e DMSO (Dimetilsulfóxido) na proporção utilizada para solubilizar o timol. Os testes foram realizados em triplicata.

Figura 8: Ovos de *Ae. aegypti* durante a realização de teste de eclodibilidade.



Fonte: Autor (2017)

4.2 Ensaio de atividade Larvicida do timol contra o *Ae. aegypti*

A atividade larvicida foi avaliada seguindo as recomendações da WHO (1970). As larvas de mosquito *Ae. aegypti* foram provenientes do insetário do Laboratório de Biotecnologia Aplicada a Parasitas e vetores do Centro de Biotecnologia. Quinze larvas saudáveis em estágio L4 foram transferidas para uma placa de Petri contendo 30 mL das concentrações de timol (0,01, 0,025, 0,05 e 0,1 mg/mL) (Figura 9). As larvas foram mantidas a temperatura ambiente, durante um fotoperíodo de 12 horas de claro e escuro. O grupo controle negativo foi composto por 15 larvas L4 expostas a água destilada e DMSO (100µl/50mL). Os experimentos foram realizados em triplicata e a mortalidade das larvas foi verificada após 24 horas.

Figura 9: Grupo controle negativo de teste larvicida preliminar, após 24h com observação de presença de pupas.



Fonte: Autor (2017)

4.3 Ensaio de atividade pupicida do timol contra o *Ae. aegypti*

Para a avaliação da atividade pupicida do timol, 10 pupas foram transferidas para uma placa de Petri contendo 30mL da solução de timol, água e DMSO (100µl/50mL). O controle foi feito utilizando apenas água e DMSO na mesma concentração. Os testes foram realizados em triplicata e a mortalidade das pupas foi verificada após 24 horas.

4.4 Ensaio de atividade adulticida do timol contra o *Ae. aegypti*

A atividade adulticida foi avaliada segundo LUCENA (2011) com o teste de contato corporal. Para tanto, utilizou-se 10 mosquitos anestesiados pelo frio, banhados com 10 µl da solução de timol na concentração de 0,1mg/mL, que foi a menor concentração capaz de matar 100% das larvas no ensaio de atividade larvicida. Após o contato com a substância teste, os mosquitos foram transferidos para um insetário e observados por 24 horas para verificar a mortalidade. Os testes foram realizados em triplicata.

4.5 Avaliação da ocorrência de morte celular de hemócitos de *Ae. aegypti* expostos ao timol

4.5.1 Cultura celular primária de hemócitos de *Ae. aegypti*

Foram utilizadas 200 larvas no quarto estágio de desenvolvimento larvar (L4), as quais foram higienizadas com PBS (Tampão fosfato-salino) e álcool 70% na capela de fluxo laminar. Logo após, extraiu-se a hemolinfa das larvas que foi depositada em uma placa de Petri contendo: 20mL do meio Leibovitz; 0,10g de Fluconazol e 5g de ampicilina, diluídos em PBS. O meio foi suplementado com 10% de soro bovino fetal e a placa foi, então, incubada em estufa durante 5 dias a 28°C.

Após o período de incubação, procedeu-se a centrifugação durante 7 minutos, resultando em células e sobrenadante. O sobrenadante, foi descartado e adicionou-se novo meio Leibovitz (Himedia). As concentrações de 1×10^5 células da cultura primária foram plaqueadas em placas de 12 poços, sendo expostas à concentração de 0.25mg/mL do timol durante 24 horas. Após esse período as células foram expostas a 15µL do fluorocromo iodeto

de propídeo e incubadas por 15 minutos em um ambiente escuro. Com intuito de distinguir as células intactas das células com necrose celular, as células foram contadas em microscópio de fluorescência.

4.6 Dosagem de óxido nítrico na cultura celular

Para avaliar a produção de óxido nítrico pelos hemócitos expostos ao timol, utilizou-se o sobrenadante do ensaio de verificação de necrose celular.

A análise da produção do NO pelas células foi feita de acordo com o método de Griess (Green et al. 1981). Para isto, 50µL do sobrenadante celular foram recolhidos e colocados em placa de 12 poços contendo 50µL e reagente de Griess, incubando-se durante 15 minutos. O grupo controle foi exposto apenas ao PBS. A leitura da absorbância foi realizada em um leitor de microplacas com filtro de 562nm e os ensaios foram realizados em triplicata. O NO foi quantificado utilizando uma curva padrão de NaNO₂ como referência.

4.7 Avaliação da atividade repelente do Timol contra o *Ae. aegypti*

O teste de repelência foi realizado com camundongos neonatos, uma vez que a pele mais fina e com menos odor característico do animal adulto causa menos interferência ao teste. Utilizou-se como substâncias teste o timol na concentração de 0,1mg/mL e o perfume floral/frutal Pear Glace Victoria's Secret. Como controle positivo utilizou-se um repelente comercial a base DEET 10% e como controle negativo utilizou-se água destilada. Dessa forma, em cada ensaio, um camundongo recebeu sobre o dorso 10µL da substância teste ou controle.

Dez mosquitos foram colocados em pequenos insetários, na presença do camundongo, e observados durante 60 minutos para registro de pousos/repastos.

Para o uso dos camundongos, o projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA), protocolo nº 131/2017.

4.8 Análise Estatística

Para comparação entre os grupos tratados, grupos controle e variações de concentração em todos os testes, foi realizada a ANOVA (quando feita comparações entre diferentes grupos) com pós-teste de Tukey, utilizando-se o software GraphPad Prism. Foi adotado o nível de significância de 95% ($p < 0,05$).

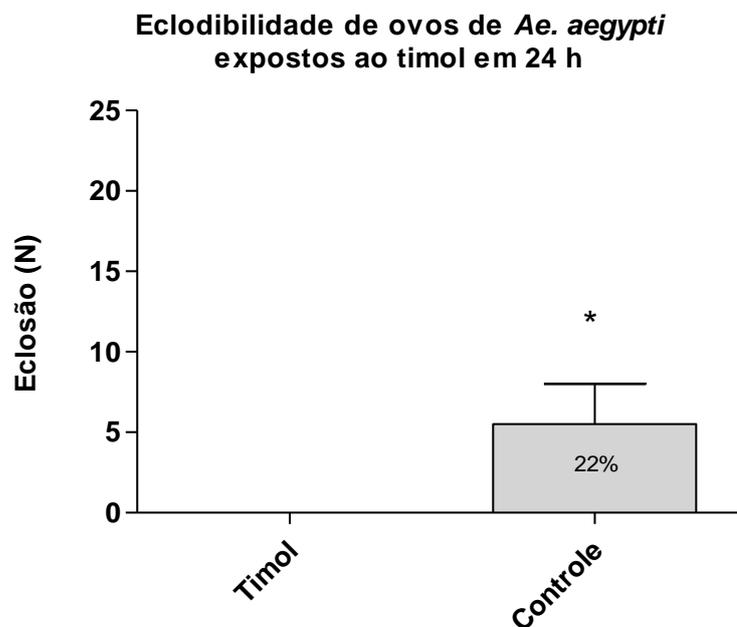
5 RESULTADOS

Para avaliar a atividade inseticida e repelente do timol sobre *Ae. aegypti*, foram realizados os testes de eclodibilidade, larvicida, teste de viabilidade celular, avaliação da produção de NO e avaliação da atividade repelente.

Com relação a inibição da eclodibilidade, os resultados mostraram que o timol na concentração de 0,1mg/mL inibiu completamente a eclosão de ovos de *Ae. aegypti* em 24 horas de observação, quando comparado ao controle, o qual já havia atingido 22% de eclosão (Figura 10).

Com relação a atividade larvicida, observou-se que as concentrações de 0,025; 0,05 e 0,1mg/mL foram capazes de matar respectivamente 30, 55 e 100% das larvas de *Ae. aegypti* após 24 h (Figura 11).

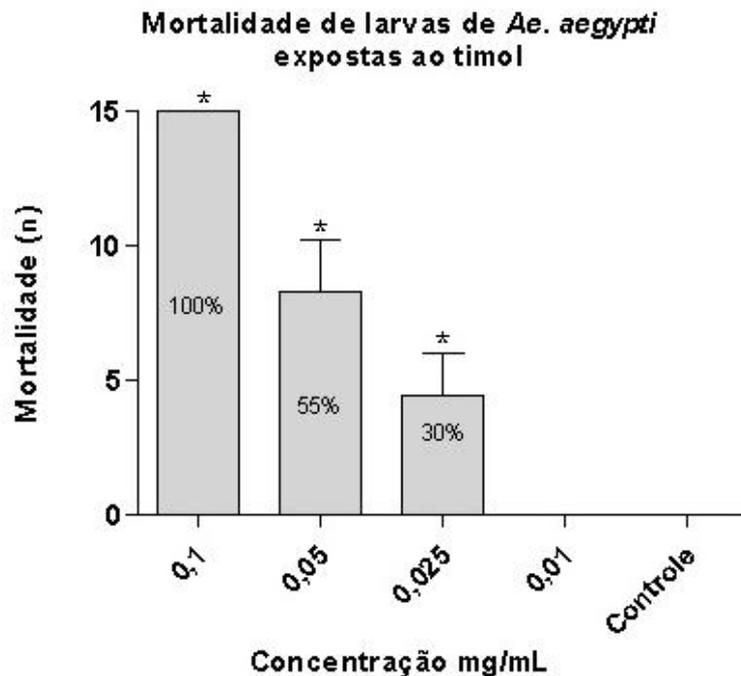
Figura 10: Taxa de eclosão de ovos de *Ae. aegypti* expostos ao timol durante o período de 24 horas.



Fonte: Autor (2017)

A mortalidade média das larvas L4 em cada dose pode ser observada na figura 11:

Figura 11: Taxa de mortalidade de larvas de *Ae. aegypti* expostas a diferentes concentrações do timol durante o período de 24 horas.



Fonte: Autor (2017)

A dose de 0,1mg/mL causou a morte de 100% das larvas (Figura 12), enquanto as doses de 0,05 e 0,025mg/mL causaram a morte de $55 \pm 3,2\%$ e $30 \pm 2,6\%$ respectivamente. Na dose de 0,01mg/mL e no grupo controle a taxa de mortalidade foi de 0%. As doses de 0,1, 0,05 e 0,025mg/mL apresentaram diferença estatística ($P < 0,05$) quando comparadas ao grupo controle.

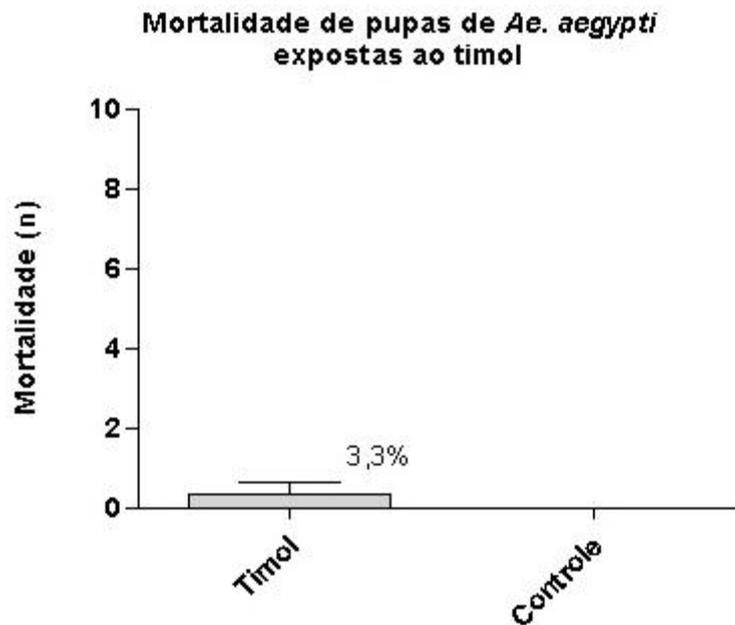
Figura 12: Larvas mortas após 24 h em solução de timol a 0,1mg/mL.



Fonte: Autor (2017)

Os resultados do teste pupicida demonstraram que a dose de 0,05mg/mL resultaram na morte de $3,3 \pm 0,5\%$ das pupas. Não houve diferença estatística entre a dose testada e o grupo controle, como mostra a Figura 13:

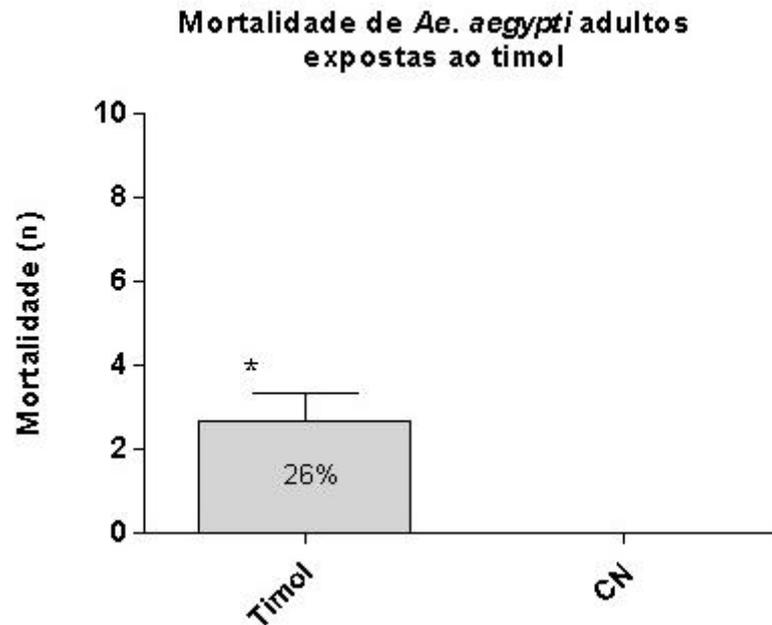
Figura 13: Mortalidade de pupas de *Ae. aegypti* expostas ao timol na concentração de 0,05mg/mL durante 24 horas.



Fonte: Autor (2017)

Em relação a atividade adulticida, o teste de contato corporal utilizando a concentração de 0,1mg/mL de timol, resultou na morte de $26 \pm 1,1\%$ dos mosquitos, comparada ao grupo controle (figura 14).

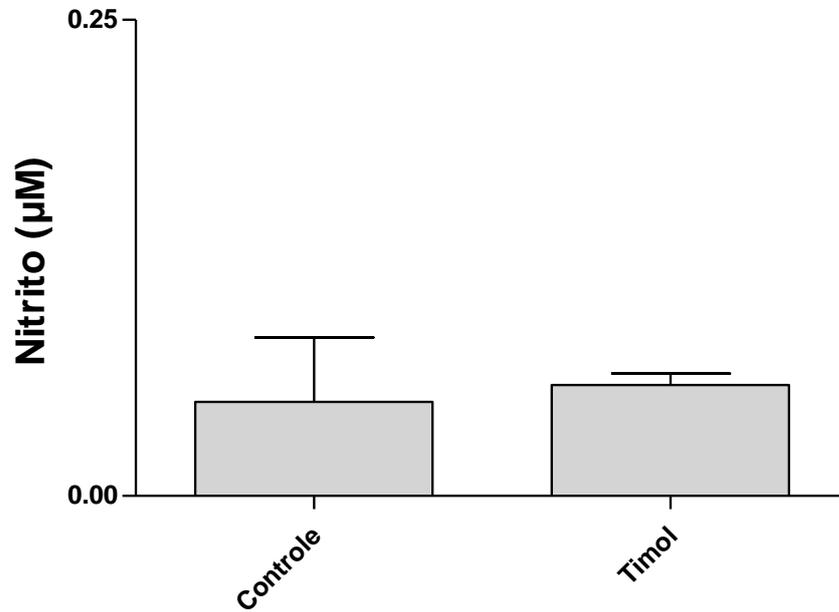
Figura 14: Taxa de mortalidade de mosquitos de *Ae. aegypti* após teste de contato corporal em dose de 0,1mg/mL do timol.



Fonte: Autor (2017)

Com o objetivo de explorar o mecanismo de ação envolvido nos efeitos inseticidas do timol sobre o *Ae. aegypti*, realizamos a avaliação da ocorrência de necrose de hemócitos e produção de NO (óxido nítrico). Os resultados mostram que não houve um aumento significativo na produção de NO por hemócitos do grupo experimental em relação ao grupo controle. A produção de NO pelas células no grupo controle foi de $0,049 + (0,058) \mu\text{M}$ e no grupo experimental foi de $0,058 + (0,010) \mu\text{M}$, conforme observado na figura 15.

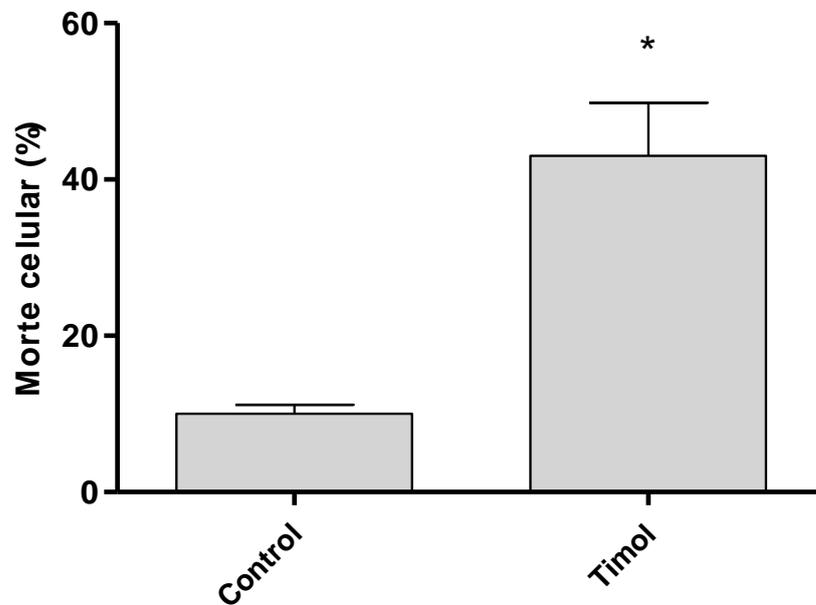
Figura 15: Produção de NO em cultura de hemócitos expostos ao Timol.



Fonte: Autor (2017)

Já com relação a ocorrência de necrose, o grupo experimental apresentou uma média de $43,0 \pm 6,8$ células mortas, enquanto o grupo controle apresentou uma média de $10,00 \pm 1,1$ células mortas. A diferença entre os grupos foi considerada estaticamente significativa a um nível de significância de 95%. Então, de acordo com os resultados mostrados na figura 16, as células expostas ao timol sofreram 4 vezes mais morte celular do que as células do grupo controle.

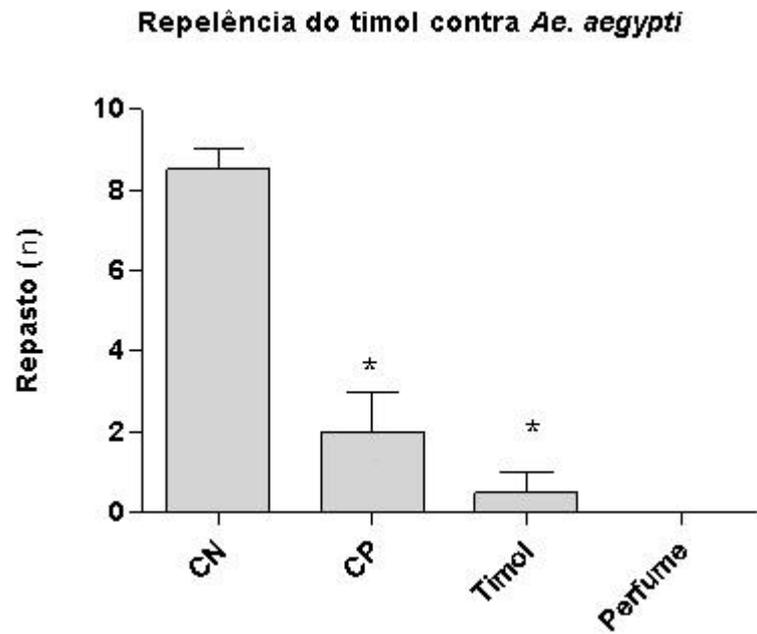
Figura 16: Ocorrência de necrose celular em cultura de hemócitos expostos ao timol



Fonte: Autor (2017)

O teste de repelência demonstrou atividade repelente por parte do timol e do perfume Pear Glace, os dois não apresentaram diferenças estatísticas quando comparados ao controle positivo realizado com repelente comercial DEET a 10%. Quando comparados ao grupo controle negativo, apresentaram grande diferença, demonstrando uma eficiente capacidade repelente. A avaliação da atividade repelente foi feita através da contagem dos repastos sanguíneos, onde os bioensaios realizados com o timol apresentaram apenas 0,5% de repastos ao longo de uma hora. O perfume pear glace da Victoria's Secret quando resultou no total de 0% de repastos, enquanto o controle positivo resultou em 2% e o controle negativo em 85% (Figura 17).

Figura 17: Potencial repelente do timol comparado a outras substâncias



Fonte: Autor (2017)

6 DISCUSSÃO

Os pontos importantes encontrados no presente trabalho, revelam que o timol possui atividade larvicida significativa a partir da concentração de 0,025mg/mL, alcançando a taxa de 100% da atividade larvicida em concentração de 0,1mg/mL. Além disto, foi comprovada a capacidade de retardo ou inviabilização dos ovos de *Ae. aegypti* quando colocados em solução aquosa contendo timol na concentração de 0,1mg/mL durante o período de 24 horas. Os testes de contato corporal demonstraram que o timol também possui efeito inseticida em mosquitos adultos na mesma concentração utilizada no teste de eclodibilidade. Contudo, as pupas não foram afetadas pela dosagem de 0,05mg/mL do timol, concentração responsável por matar em torno de 55% das larvas. Isto pode ser explicado, em parte devido a fase de pupa não se alimentar e possuir um revestimento externo mais espesso que as larvas, dificultando o acesso da substância ao interior do inseto (Rey, 2010).

Para entender melhor os mecanismos de ação do timol, foram realizados bioensaios em cultura primária de hemócitos de larvas de *Ae. aegypti*. O sistema neuroendócrino é essencial para o desenvolvimento dos insetos e está correlacionado com outros sistemas como o de reprodução e imunológico. Muitos estudos apontam que o NO possui um importante papel na resposta imune dos insetos, modulando o sistema imune através de sinalização celular. Portanto, sua produção é aumentada em situações de estresse químico ou biológico (Garcia et. al., 2012; Foley & O`Farel 2003). O NO é uma molécula neutra com 11 elétrons na camada de valência, que possui um elétron não emparelhado (BARRETO, 2005). Sua síntese ocorre durante a transformação do aminoácido semi-essencial L-arginina em L-citrulina, em uma reação mediada pela enzima sintase do óxido nítrico (NOS), devendo estar presentes oxigênio, NADPH, cálcio (dependendo do tipo de NOS), entre várias outras substâncias (CHATKIN et al, 2000).

O óxido nítrico é uma molécula gasosa simples, habitualmente encontrada no ar exalado na respiração humana e de animais em pequenas quantidades, altamente tóxica devido à presença de radical livre (elétron extra) que a torna um agente químico altamente reativo. Quando diluído, o NO tem uma meia vida de mais ou menos 10 segundos devido a sua rápida oxidação a nitrito e nitrato (Flora-Filho & Zilberstein, 2000).

Devido a esses aspectos, foram realizados bioensaios de dosagem de NO, e de acordo com o resultado, foi verificado que a concentração de timol utilizada, não influencia na

produção de NO pelos hemócitos das larvas de *Ae. aegypti*. Uma possível explicação para tal fato seria que o timol causa morte tão rápida no inseto, que não é possível observar o fenômeno da resposta imunológica baseada no aumento da produção de NO. Porém, não podemos descartar a sua participação em concentrações mais elevadas, as quais serão investigadas futuramente. A morte celular pode seguir a via da necrose ou do apoptose, sendo a primeira sempre patológica, enquanto a segunda pode acontecer também em processos fisiológicos normais do organismo.

Os acontecimentos que desencadeados por quaisquer fatores externos que levarão a morte celular, envolve vários processos intracelulares, como o dano à membrana, que afeta a mitocôndria, conseqüentemente levando à diminuição da produção de ATP e morte celular, os lisossomos (causando digestão enzimática dos componentes celulares) e a própria membrana plasmática, culminando na perda do conteúdo celular (Robbins & Cotran, 2016). Há também aumento do cálcio intracelular e das espécies reativas de oxigênio (radicais livres, como o O_2^- , H_2O_2 , OH^-), o que leva a proteólise e dano ao DNA. Desse modo, de acordo com a metodologia realizada por NUNES (2013) para a verificação da viabilidade dos hemócitos de larvas de *Ae. aegypti*, utilizou-se citometria de fluxo com células marcadas por iodeto de propídeo. O iodeto de propídeo se liga às cadeias do DNA, porém não possui a capacidade de atravessar uma membrana plasmática íntegra, corando apenas as células com membrana rompida devido ao processo de necrose celular. De acordo com os resultados obtidos, a mortalidade observada neste estudo parece estar ligada ao fenômeno de necrose celular agudo, onde as células expostas ao timol sofreram 4 vezes mais morte celular do que as células do grupo controle.

Estudos realizados demonstraram que o timol possui propriedades inibitórias da enzima acetilcolinesterase (Jukic, 2007). Quando o impulso nervoso chega na extremidade do neurônio, ele provoca a liberação de uma substância química chamada neurotransmissor. Este se liga temporariamente à proteína associada ao canal de Na^+ na membrana da célula adjacente à célula que liberou o neurotransmissor, promovendo a abertura desse canal e, assim, a passagem do impulso nervoso de uma célula a outra. A acetilcolina é um importante exemplo de neurotransmissor. Após o cumprimento de seu papel, a acetilcolina precisa ser degradada, para que a célula adjacente não fique com os canais de Na^+ constantemente abertos. Para isso, existe na sinapse uma enzima chamada acetilcolinesterase, que prontamente degrada a acetilcolina em colina e ácido acético. Com a inibição da

acetilcolinesterase, ocorre o acúmulo de acetilcolina nas sinapses, provocando assim, uma hiperatividade nervosa e conseqüentemente um colapso do sistema nervoso. Caso esse seja realmente o principal mecanismo de ação do timol como inseticida, se assemelha ao mecanismo de ação dos inseticidas das classes dos organofosforados e carbamatos (Braga, 2007).

Além de todos os resultados citados acima ligados a atividade inseticida, o timol demonstrou ser eficaz como repelente de mosquitos na concentração de 0,1mg/mL durante o período de uma hora. Estudos realizados recentemente mostraram que o repelente orgânico de insetos Ecosmart resultou em uma forte redução de atração a 0 minuto, mas este efeito não persistiu após 30 minutos. O mesmo estudo demonstrou que o perfume Victoria's Secret Bombshell repeliu os mosquitos com bastante eficácia duas horas após a aplicação (Rodriguez et al., 2015). Este estudo comprovou que o timol e o perfume Pear Glace Victorias Secret não apresentaram diferenças estatísticas quando comparados ao repelente comercial com DEET 10% no tempo de uma hora, ambos com poder repelente. Sabe-se que existem vários mecanismos que envolvem uma gama de receptores e proteínas envolvidos no processo de olfação dos insetos. Os odores são detectados por neurônios receptores olfativos que expressam receptores olfativos (RUP) (Hallem et al., 2006; Benton et al., 2009; Touhara & Vosshall, 2009). Na maioria dos casos, esses receptores funcionam em conjunto com outras moléculas. (Silbering & Benton, 2010). Esses neurônios banham seus dendritos em um líquido, que é a linfa sensilar em insetos (Leal, 2013). O corpo humano produz diversos odores atrativos, sendo a chave para a ligação entre os insetos antropofílicos e o ser humano, como o ácido láctico e o próprio CO₂ liberado na respiração (Zwiebel e Takken 2004). Estudos demonstraram que diferentes repelentes de insetos usam um modo de ação similar. Cada repelente se liga e interage com receptores específicos odorantes e gustativos, alterando sua atividade e exercendo os seus efeitos dissuasivos (Kwon et al., 2010; Dickens e Bohbot 2013; Xu et al., 2014). Sendo assim, dependendo da capacidade de uma substância de se ligar a esses receptores no inseto, será descrita seu potencial repelente ou atrativo. Portanto, a ideia de que a utilização de perfumes florais e frutais atraem mosquitos, torna-se meio errônea, do ponto de vista que esses perfumes mascaram o cheiro de algumas substâncias da pele que são atrativos naturais para os mosquitos.

7 CONCLUSÕES

A substância teste, timol, apresentou boa atividade ovicida, larvicida e adulticida na concentração 0,1mg/mL, entretanto não apresentou efeito significativo no teste pupicida com a dose testada 0,05mg/mL.

Quanto ao mecanismo de ação, não foi observado diferença significativa na produção de NO em relação ao controle, por outro lado notou-se maior número de células em necrose quando comparado ao grupo controle.

Já o teste de repelência mostrou resultado semelhante ao controle positivo e ao perfume, sendo todos considerados significativos de maneira positiva em relação ao grupo controle onde não foi utilizada nenhuma substância além da água.

Os resultados deste estudo mostram que o timol apresenta importante efeito inseticida e repelente contra o mosquito *Aedes aegypti*, inseto de grande impacto na saúde pública brasileira. Pode-se concluir que o Timol pode ser usado como princípio ativo de novos produtos inseticidas e repelentes, principalmente por sua baixa toxicidade, alta solubilidade e fácil obtenção, sendo uma alternativa viável para uso em meio aos problemas atuais relacionados ao uso dos inseticidas e repelentes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdel-Rahman, A., Shetty, A. K.; Abou-Donia, M. B., **Subchronic dermal application of N,N-diethyl m-toluamide (DEET) and permethrin to adult rats, alone or in combination, causes diffuse neuronal cell death and cytoskeletal abnormalities in the cerebral cortex and the hippocampus, and purkinje neuron loss in the cerebellum.** *Experimental Neurology*, vol. 172, no. 1, pp. 153–171, 2001.

Abdel-Rahman, A.; Abou-Donia, S. M.; El-Masry, E. M.; Shetty, A. K.; Abou-Donia M. B., **Stress and combined exposure to low doses of pyridostigmine bromide, DEET, and permethrin produce neurochemical and neuropathological alterations in cerebral cortex, hippocampus, and cerebellum.** *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A*, vol. 67, no. 2, pp. 163–192, 2004.

Abdel-Rahman, A.; Ashok K.; M. B. Abou-Donia, **Subchronic Dermal Application of N,N-Diethyl m-Toluamide (DEET) and Permethrin to Adult Rats, Alone or in Combination, Causes Diffuse Neuronal Cell Death and Cytoskeletal Abnormalities in the Cerebral Cortex and the Hippocampus, and Purkinje Neuron Loss in the Cerebellum, In Experimental Neurology.** Volume 172, Issue 1, 2001, Pages 153-171, ISSN 0014-4886, <https://doi.org/10.1006/exnr.2001.7807>. (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014488601978070>).

Asbaghian; Shiva ; Shafaghat, Ali ; Zarea, Khalil ; Kasimov, Fakhraddin ; Salimi, Farshid. (2011). **Comparison of Volatile Constituents, and Antioxidant and Antibacterial Activities of the Essential Oils of Thymus caucasicus, T. kotschyanus and T. vulgaris.** *Natural product communications*. 6. 137-40.

BARRETO, R. L.; CORREIA, C. R. D.; MUSCARA, M. N. **Óxido nítrico: propriedades e potenciais usos terapêuticos.** *Quím. Nova*, São Paulo , v. 28, n. 6, p. 1046-1054, Dec. 2005.

Braga, I. A.; Valle D., **Aedes aegypti: histórico do controle no Brasil.** *Epidemiol Serv Saúde*. 2007; 16(2): 113 – 8.

Braga, P.C.; Culici, M.; Alferi, M.; Dal Sasso, M. **Thymol inhibits Candida albicans biofilm formation and mature biofilm.** *Int. J. Antimicrob. Ag.*, 31, 472–477, 2008.

BRAIBANTE, M.E.F.; ZAPPE, J.A. **A química dos agrotóxicos.** *Revista Química Nova na Escola*. Vol. 34, N° 1, p. 10-15, Fevereiro 2012.

Brasil – (2016b). **Recomendações técnicas ao Sistema Nacional de Vigilância Sanitária para colaborar no combate ao *Aedes aegypti* e prevenção e controle da Dengue, Chikungunya e infecção pelo vírus Zika.** Brasília-DF.

Budavari, S. **The Merck index - An encyclopedia of chemicals, drugs and biological.** Rahway, Merck & Co., Inc., 17th ed., 1606p,1989.

CHATKIN, J. M. **Óxido nítrico exalado no diagnóstico e acompanhamento das doenças respiratórias.** J. Pneumologia, São Paulo , v. 26, n. 1, p. 36-43, Feb. 2000. Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-35862000000100008&lng=en&nrm=iso>. Access on 02 Nov. 2017. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-35862000000100008>.

Coelho, G.E. **Dengue: desafios atuais.** Epidemiol Serv Saúde. 2008; 17(3): 231 – 3.

CONSOLI, R.A.G.B; OLIVEIRA, R. L. **Mosquitos de importância sanitária.** 1. Ed. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 1994.

DeGennaro, M. **The mysterious multi-modal repellency of DEET.** Fly. 9; 2015.

Dickens, J.C., and J. D. Bohbot. **Mini review: mode of action of mosquito repellents.** Pestic. Biochem. Physiol. 106: 149–155. 2013.

DIVE-SC - Diretoria de Vigilância Epidemiológica da Secretária de Estado de Saúde de Santa Catarina. **Dengue. Orientações técnicas para pessoal de campo.** 2007.

Donalísio, M.R. **O dengue no espaço habitado.** São Paulo: Hucitec: 1999.

Dubey, V.S.; Bhalla, R.; Luthra, R.; Donalísio M.R. **O dengue no espaço habitado.** São Paulo: Hucitec: 1999. J. Biosci., 28, 637–646, 2003.

FLORA FILHO, R.; ZILBERSTEIN, B. **Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções.** Rev. Assoc. Med. Bras., São Paulo , v. 46, n. 3, p. 265-271, Sept. 2000.

Foley, E.; O’Farrell P.H. **Nitric oxide contributes to induction of innate immune responses to gram-negative bacteria in *Drosophila*.** Genes & Development.;17(1):115-125. doi:10.1101/gad.1018503, 2003.

Galizia, C.G. **Olfactory coding in the insect brain: data and conjectures.** Eur. J. Neurosci. 39: 1784–1795, 2014.

Guimarães, A.G.; Xavier, M.A.; Santana, M.T.; Camargo E.A.; Santos, C.A; Brito, F.A.; Barreto, E.O.; Cavalcanti, S.C.H.; Antonioli, A.R.; Oliveira, R.C.M. Quintans-Júnior, L. J. **Carvacrol attenuates mechanical hypernociception and inflammatory response.** Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., 385, 253–263, 2012.

Gullan, P.J., Cranston P.S. **Insetos. Fundamentos da Entomologia.** 5ª edição, São Paulo: ROCA, 2017. 460 p.

Helander, I.M.; Alakomi, H.L.; Latva-Kala, K.; Mattila-Sandholm, T.; Pol, I.; Smid, E.J.; Gorris, L.G.M.; Von Wright, A. **Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria.** J. Agric. Food. Chem., 46, 3590–3595, 1998.

J. R. Clem, D. F. Havemann, M. A. Raebel, D. R. De Almentero, and C. Guevremont, **Insect repellent (N,N-diethylm-toluamide) cardiovascular toxicity in an adult.** Annals of Pharmacotherapy, vol. 27, no. 3, pp. 289–293, 1993.

Jakiemi, E. A. R.; Scheer, A. P.; De Oliveira, J. S.; Côcco, L. C.; Yamamoto, C. I.; Deschamps, C. - **Estudo da composição e do rendimento do óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris* L.).** Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v. 31, n. 3, p. 683-688, jul./set. 2010.

Jukic, Mila & Politeo, Olivera & Maksimović, Milka & Milos, Mia & Milos, Mladen. **In Vitro acetylcholinesterase inhibitory properties of thymol, carvacrol and their derivatives thymoquinone and thymohydroquinone.** Phytotherapy research: PTR. 21. 259-61. 10.1002/ptr.2063, 2007.

Kaupp, U. B. **Olfactory signalling in vertebrates and insects: differences and commonalities.** Nat. Rev. Neurosci. 11: 188–200, 2010.

Kwon, Y., S. H. Kim, D. S. Ronderos, Y. Lee, B. Akitake, O. M. Woodward, W. B. Guggino, D. P. Smith, and C. Montell. **Drosophila TRPA1 channel is required to avoid the naturally occurring insect repellent citronellal.** Curr. Biol. 20: 1672–1678, 2010.

Löwy I. **Yellow fever in Rio de Janeiro and the Pasteur Institute Mission (1901-1905): the transfer of science to periphery.** History of Medicine; 34:144-163, 1990.

Lucena, I.V.; Trindade, F.T.T.; Calderon, L.A.; Stabeli, R.G.; Silva, A.A. **Atividade adulticida do veneno de *Rhinella marina* (Anura:Bufonidae) sobre *Anopheles darlingi* (Diptera:Culicidae).** *Anais eletrônicos*. Rondônia, RO. 2011. Disponível em: <[http://www.labein.unir.br/downloads/938_resumo___cbparasito_2011_\(final\).pdf](http://www.labein.unir.br/downloads/938_resumo___cbparasito_2011_(final).pdf)>. Acesso em 10 de outubro de 2017.

Melo F.H.C.; Venâncio E.T.; De Sousa D.P.; Fonteles M.M.F.; De Vasconcelos S.M.M.; Viana G.S.B.; De Sousa F.C.F. **Anxiolytic-like effect of carvacrol (5-isopropyl-2-methylphenol) in mice: involvement with GABAergic transmission.** *Fundam. Clin. Pharmacol.*, 24, 437–443, 2010.

Melo, F.H.C.; Moura, B.A.; De Sousa, D.P.; De Vasconcelos, S.M.M.F; Macedo, D.S.; Fonteles M.M.; Viana G.S.B.; De Sousa, F.C.F. **Antidepressant-like effect of carvacrol (5-Isopropyl-2-methylphenol) in mice: involvement of dopaminergic system.** *Fundam Clin Pharmacol* 25, 362–367, 2011.

NEVES, D. P.; MELO, A. L.; LINARDI, P. M. **Parasitologia humana**. 12. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2011.

Nunes, F.C. (2013). *Estudo da atividade larvicida da Agave sisalana contra larvas de Aedes aegypti*. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa- PB.

Palchick S. **Chemical Control of Vectors In: The Biology of Disease Vectors**. Colorado: University Press of Colorado; 1996.

Peixoto-Neves D.; Silva-Alves, K.S.; Gomes, M.D.; Lima, F.C.; Lahlou, S.; Magalhães, P.J.; Ceccatto, V.M.; Coelho-De-Souza, A.N.; Leal-Cardoso, J.H. **Vasorelaxant effects of the monoterpenic phenol isomers, carvacrol and thymol, on rat isolated aorta.** *Fundam. Clin. Pharmacol.*, 24, 341-350, 2010.

Potter, C. J. **Stop the biting: targeting a mosquito's sense of smell.** *Cell* 156: 878–881, 2014.

Pozzo, M. D.; Viégas, J; Santuriol D. F.; Rossatto L.; Soares, I. H.; Alves, S. H.; Costa, M. M. **Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de condimentos frente a *Staphylococcus spp* isolados de mastite caprina.** *Ciência Rural*, Santa Maria, Online, 2011.

Reegan, A.D.; Gandhi, M.R.; Paulraj, M.G.; Ignacimuthu, S. **Ovicidal and Oviposition Deterrent Activities of Medicinal Plant Extracts Against *Aedes aegypti* L. and *Culex***

***quinquefasciatus* Say Mosquitoes (Diptera: Culicidae).** Osong Public Health Res Perspect. Vol. 6, No. 1, pp. 64-69, 2015.

Rodriguez S.D, Drake L.L, Price D.P, Hammond J.I, Hansen I.A. **The Efficacy of Some Commercially Available Insect Repellents for *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae).** *Journal of Insect Science.*;15(1):140. doi:10.1093/jisesa/iev125, 2015.

Silva, S.L.C; Gualberto, S.A.; Carvalho, K.S.; Fries, D.D. **Avaliação da atividade larvicida de extratos obtidos do caule de *Croton linearifolius* Mull. Arg. (Euphorbiaceae) sobre larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae).** *Biotemas*, Vol. 27, No. 2, pp. 79-85, 2014.

Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; Mello, J.C.P; Mentz, L.A.; Petrovick, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 5. ed. Porto Alegre, RS: Ed. da UFSC, 2004.

Suh, E., J. Bohbot, and L. J. Zwiebel. **Peripheral olfactory signaling in insects.** *Curr. Opin. Insect Sci.* 6: 86–92, 2014.

Teixeira MDG, Costa MDCN, Barreto F & Barreto ML. **Dengue: twenty-five years since reemergence in Brazil.** *Cadernos de saúde pública.*; 25: S7 – S18, 2009.

TERRA, M. G.; SILVA, R. S.; PEREIRA, M. G. N.; LIMA, A. F. - ***Aedes aegypti* E AS ARBOVÍROSES EMERGENTES NO BRASIL.** Londrina, Vol.30,n.3,pp.52-60 Abril – Jun, 2017.

Waliszewski S.M; Gomez-Arroyo S.; Infanzon R.M; Villalobos-Pietrini R.; Hart M.M. **Comparison of organochlorine pesticide levels between abdominal and breast adipose tissue.** *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*;71(1):156-162, 2003.

Ware G.W. **An introduction to insecticides** (monografia na Internet). 3rd ed. University of Minnesota; 2000. Disponível em: <http://ipmworld.umn.edu/chapters/ware.html>

WHO (2013) - World Health Organization. **Guidelines for Efficacy testing of Spatial repellents. Control of neglected tropical diseases Who pesticide evaluation scheme.** WHO/CDS/CPC/MAL/13.12., Geneva, 58 pp.

World Health Organization. **Executive committee of the directing council the regional committee Pan American World Health 120th Meeting CE120/21.** Geneva: WHO; 1997.

Xu, P., Y. M.; Choo, A. R.; Leal, W. S. **Mosquito odorant receptor for DEET and methyl jasmonate.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 111: 16592–16597, 2014.

Yin, Q.H.; Yan, F.X.; Zu, X.Y.; Wu, Y.H.; Wu, X.P.; Liao, M.C.; Deng, S.W.; Yin, L.L.; Zhuang, Y.Z. **Anti-proliferative and pro-apoptotic effect of carvacrol on human hepatocellular carcinoma cell line HepG-2.** Cytotechnology, 64: 43–51, 2012.

Zadikoff, C. M., **Toxic encephalopathy associated with use of insect repellent.** The Journal of Pediatrics, vol. 95, no. 1, pp. 140– 142, 1979.

Zara, A.L.D.S.A; Santos, S.M.D; Fernandes-Oliveira, E.S; Carvalho, R.G; Coelho, G.E. **Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão.** Epidemiol Serv Saúde. 25(2): 391 – 404, 2016.

Zwiebel, L. J., and W. Takken. **Olfactory regulation of mosquito-host interactions.** Insect Biochem. Mol. Biol. 34: 645–652, 2004.

GLOSSÁRIO

Eclodibilidade – Ato de desenvolvimento do ovo para a fase de larva

Insetário – Local de criação dos mosquitos

Repasto sanguíneo – Atividade alimentar realizada por insetos hematófagos

Repelência – caráter que causa repugnância aos insetos