



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE – FS/ UNB
CURSO DE FARMÁCIA

Avaliação da Repelência Espacial e Toxicidade de Óleos Essenciais comerciais em
Aedes Aegypti

Estudante: Ana Beatriz Peres Sousa – 17/0005101

Orientadora: Profa. Dra. Lorena Carneiro Albernaz

Co-orientadora: MSc. Natália Mendes Gomes

Magalhães

BRASÍLIA, DF

2021

ANA BEATRIZ PERES SOUSA

**Avaliação da Repelência Espacial e Toxicidade de Óleos Essenciais comerciais em
*Aedes Aegypti***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Farmácia, na Universidade de Brasília, Faculdade de Ciências da Saúde – FS/UNB.

Orientadora: Profa. Dra. Lorena Carneiro Albernaz

Co-orientadora: MSc. Natália Mendes Gomes

Magalhães

BRASÍLIA, DF

2021

“A vida não é fácil para ninguém. Mas é preciso persistir e, acima de tudo,
confiar em nós mesmos.”

- Marie Curie

Dedico este trabalho a todos aqueles que um dia se sentiram incapazes de alcançar seus sonhos, incluindo a mim. Seja corajoso e persista.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Ana Beatriz Peres Sousa

Avaliação da Repelência Espacial e Toxicidade de Óleos Essenciais comerciais em
Aedes Aegypti

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado a Universidade de Brasília como requisito parcial para obtenção de grau Farmacêutico

Profa. Dra. Lorena Carneiro Albernaz
(Universidade de Brasília)

MSc. Natália Mendes Gomes Magalhães
(Universidade de Brasília)

Membro avaliador
(Heidi Luise Schulte)

AGRADECIMENTOS

A Deus e Nossa Senhora, que têm cuidado de mim desde que nasci, e não me desampararam nem nos momentos mais difíceis e aflitos da minha graduação.

A minha mãe, Vilma Peres, e ao meu pai, Josenildo Sousa, que desde sempre me mostraram que posso ser o que eu quiser e me deram força para alcançar até os sonhos mais altos. Quando eu disse que queria ir à lua, eles me deram a mão e me ensinaram a voar. Encontrei em casa os melhores amigos que eu poderia ter nessa vida. Obrigada por me ensinarem a viver intensamente cada momento, e acima de tudo, obrigada por me ensinarem a ser humana e olhar para o outro com respeito e carinho. Amo vocês mais que tudo.

Ao meu namorado, parceiro de todas as horas e melhor amigo, João Lucas Viana, que aguentou essa barra desde o início ao meu lado, sempre mostrando que eu sou sim capaz e me motivando todos os dias a ser melhor. João é sinônimo de porto seguro, respeito e amor. Obrigada por me lembrar que a vida vai muito além de uma conquista acadêmica. Que possamos continuar contribuindo para o crescimento do outro por muitos anos. Te amo muito.

A minha irmã do coração, Maria Carolina Cunha, que sempre acreditou no meu potencial e na minha capacidade, até mesmo quando eu não acreditei. Ela foi irmã, amiga e orientadora ao mesmo tempo nesse período. Obrigada por sempre cuidar de mim com carinho e paciência nos momentos em que tudo que eu queria fazer era desistir. Você é essencial, e que sempre seja nós por nós.

Ao meu irmão do coração, Fausto Fonseca, que me acompanha desde os 9 anos de idade. Já passamos por tanta coisa, e sei da sorte que tenho de poder contar com você nessa

jornada chamada vida. Obrigada por sempre estar ao meu lado me mostrando o quão longe já cheguei com minha determinação e o quão longe ainda vou chegar.

Ao meu primo e irmão, Peterson Eduardo, e a minha prima, Anna Claudia Diniz, que me inspiraram a me jogar de cabeça no mundo incrível das ciências farmacêuticas, profissionais que admiro, tenho orgulho e amo intensamente. Sem o incentivo de vocês eu não estaria aqui hoje. Obrigada por tudo.

A minha amiga e cunhada, Aline dos Santos, que me ajudou em tantos trabalhos durante a escola e me escutou tantas vezes falar da apresentação desse trabalho. Obrigada por todas as risadas que deixaram esse momento mais leve e sobretudo, obrigada pelos conselhos e pelo carinho.

A minha orientadora, Lorena Carneiro Albernaz, que me cativou desde o primeiro dia de aula com seu jeito único de fazer cada aluno se sentir reconhecido e especial. Que sorte eu tive de a ter na minha vida acadêmica. Obrigada por me ajudar a concluir esse trabalho que parecia impossível e por toda a atenção e amor depositados no meu ensino durante os anos que em que a acompanhei.

A minha co-orientadora, Natália Mendes Gomes, que guiou o meu trabalho e a minha escrita, sempre com muita paciência, cuidado e disponibilidade. Obrigada por me ensinar tanto.

As minhas primeiras “chefas” do laboratório que se tornaram muito mais que isso, Sophia Motta e Laís Morais. Vocês marcaram minha vida de um jeito que nem imaginam, obrigada por me mostrarem como a ciência pode ser linda e serem meus exemplos dentro da pesquisa acadêmica.

Ao meu amigo Renato Guedes, que além de tornar possível a realização dos testes, por tantas vezes aliviou a pressão da minha rotina estressante com conversas e risadas sobre música, filmes, livros e Shawn Mendes. Renato, te agradeço imensamente por tudo.

A minha primeira amiga da UnB, Gabrielle Orengo, meu anjo da guarda. Sem nossas conversas tudo teria sido mais difícil. Guardo com carinho todos os nossos abraços, risadas e choros compartilhados. Obrigada por me entender como ninguém, me oferecer seu ombro amigo e ser tão presente.

A minha amiga cheia de luz, Carolina Aguiar, a quem eu sempre recorro em momentos de angústia e desespero, e quem sempre consegue me acalmar. A Carol é aquela pessoa que está sempre pronta para estar com você, seja nos momentos felizes, seja nos momentos de dor. Torço para que nossos cafés se tornem tradição até quando estivermos velhinhas. Obrigada por ser alegria no meu dia a dia.

Ao meu amigo dançarino, Carlos Eduardo Henriques, que com toda sua inteligência e calma me inspiram diariamente. Um verdadeiro pilar de força, que vejo o quão longe vai chegar tanto nas realizações profissionais quanto pessoais. Obrigada por tanto, Cadu, principalmente por me mostrar que a autoconfiança é uma das coisas mais bonitas que podemos ter.

A minha amiga guarda-costas, Letícia Almeida, que desde o primeiro momento de UnB me protege, me acolhe e me ajuda. Me acompanhou cuidando de escorpiões, superou química analítica sendo minha dupla, viveu muitas situações do meu lado e me defendeu quando eu não pude. Você é incrível. Obrigada por ser exatamente quem você é.

A minha amiga inesperada, Marina Dias Marques, que se fez mais que presente nos meus últimos semestres, sempre me acompanhando nos perrengues dos estágios. Chegou

devagarinho e já ocupa um espaço imenso no meu coração. Seu apoio foi fundamental, obrigada por todos os surtos conjuntos e pelas conversas que deixam meus dias leves.

Por fim, dedico este trabalho a minha coragem de seguir em frente, a minha força, e a minha dedicação. Em muitos momentos pensei em desistir e hoje me sinto realizada de ver onde cheguei e do quanto sou capaz. Que seja só o começo de uma linda jornada profissional.

RESUMO

As arboviroses representam uma ameaça à saúde pública nos países tropicais, diante da sua crescente transmissão. O *Aedes aegypti* é um artrópode vetor de doenças endêmicas de regiões tropicais, as quais têm grande impacto, exemplos são a dengue, Zika e chikungunya. Apesar de ser um mosquito de climas tropicais, o inseto vem se adaptando a regiões de clima frio. O aumento dos casos de dengue somado à crescente resistência dos vetores aos inseticidas disponíveis comercialmente enfatiza a necessidade de buscar novas estratégias de controle para minimizar o contato do vetor com o hospedeiro. Repelentes são produtos que têm a capacidade de reduzir o contato do vetor com o indivíduo, podendo ser de aplicação tópica ou espacial. Óleos essenciais são caracterizados como misturas complexas de compostos voláteis, os quais têm sua atividade biológica geralmente associada a seus componentes majoritários. Existem relatos destes sendo usados como repelentes há mais de um século ao redor do mundo, alguns usados até os dias de hoje, como o de citronela. O presente estudo avaliou o potencial de repelência espacial de 19 óleos essenciais adquiridos comercialmente utilizando o aparato *High-throughput Screening System* – HITSS. Nossos resultados mostraram 5 óleos essenciais promissores. ArboS80, ArboS84, ArboS79, ArboS71 e ArboS56, os quais foram testados posteriormente em ensaios adulticidas. Desses, o óleo essencial de maior destaque foi o ArboS80, o qual foi ativo tanto como repelente espacial como adulticida. Estes 5 óleos mostraram-se potenciais para o desenvolvimento de formulações repelentes de ambiente, na busca de produtos que permitam criar áreas-livres de vetor.

Palavras-chave: *Aedes aegypti*, arboviroses, óleos essenciais, repelência espacial, toxicidade

ABSTRACT

Arboviruses represent a threat to public health in tropical countries, given their increasing transmission. *Aedes aegypti* is an arthropod vector of high-impact endemic diseases, such as dengue, Zika and chikungunya. Despite being a tropical climate mosquito, the insect has been adapting to cold climate regions. The growth in number of dengue cases added to the increasing resistance of vectors to commercially available insecticides emphasizes the need to search new control strategies to minimize vector-host contact. Repellents are products that have the ability to reduce the vector's contact with people, and may be applied topically or spatially. Essential oils are characterized as complex mixtures of volatile compounds, which have their biological activity generally associated with their major components. There are reports of these oils being used as repellents for over a century around the world, some being used nowadays, such as citronella. The present study evaluated the spatial repellency potential of 19 essential oils commercially purchased using the High-Throughput Screening System - HITSS apparatus. Our results point to 5 promising essential oils. ArboS80, ArboS84, ArboS79, ArboS71 e ArboS56, which were later tested in adulticidal trials. Among these, the most prominent essential oil was ArboS80, which was active both as a space repellent and an adulticide. These 5 oils were shown to be potential for the development of environmentally repellent formulations, in the search for products that allow the creation of vector-free areas.

Keywords: *Aedes aegypti*, arboviruses, essential oils, spatial repellency, *toxicity*

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.....	33
TABELA 2.....	38
TABELA 3.....	39

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1.....40

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.....	19
FIGURA 2.....	28
FIGURA 3.....	29
FIGURA 4.....	29
FIGURA 5.....	30
FIGURA 6.....	31
FIGURA 7.....	34
FIGURA 8.....	34
FIGURA 9.....	35
FIGURA 10.....	37

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Ae.	<i>Aedes</i>
Cx.	<i>Culex</i>
DENV	Dengue vírus
CHIKV	Chikungunya vírus
ZIKV	Zika vírus
NSO	Neurônios Sensoriais Olfatórios
RI	Receptores ionotrópicos
RG	Receptores gustativos
RO	Receptores de odor
CO ₂	Gás carbônico
BTI	<i>Bacillus thuringiensis israelensis</i>
DEET	N,N-dietil-3-metilbenzamida
K&D	<i>Klun & Debboun</i>
OE	Óleo essencial
HITSS	<i>High-throughput Screening System</i>
COV	Compostos orgânicos voláteis
v/v	Volume/volume
var.	Variedade
SR	<i>Signed-rank</i>
SAI	Índice de repelência espacial
wSAI	Índice de repelência espacial ponderado
Nc	Número de fêmeas no cilindro controle

Nt	Número de fêmeas no cilindro de tratamento
N	Número de fêmeas introduzidas no cilindro central
PERESP	Percentual de resposta dos mosquitos
EP	Erro padrão
CDC	<i>Centers for disease control and prevention</i>
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas
MDE	Mínima dose efetiva

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1 Arboviroses.....	16
1.2 Epidemiologia das arboviroses.....	17
1.3 Comportamento vetorial e biologia do inseto.....	18
1.4 Prevenção da transmissão e controle vetorial.....	22
1.5 Óleos essenciais.....	25
1.6 Repelentes.....	26
2. OBJETIVOS.....	31
2.1 Objetivo geral.....	31
2.2 Objetivos específicos.....	32
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
3.1 Manutenção da colônia.....	32
3.2 Amostras.....	32
3.3 Teste de repelência espacial.....	34
3.4 Teste aduIticida.....	37
4. RESULTADOS.....	38
5. DISCUSSÃO.....	41
6. CONCLUSÃO.....	49
7. REFERÊNCIAS.....	51

1. INTRODUÇÃO

1.1 Arboviroses

As arboviroses são doenças transmitidas por artrópodes em diferentes localizações geográficas, principalmente nos países tropicais, as quais representam uma ameaça à saúde pública (HUANG; HIGGS; VANLANDINGHAM, 2019). Estudos mais recentes têm mostrado que as arboviroses encontram-se em expansão para regiões antes consideradas inóspitas para os mosquitos vetores, como o Canadá (GIORDANO et al., 2020). O *Aedes aegypti* é o principal responsável pela transmissão da dengue, Zika e chikungunya, e o *Culex quinquefasciatus* responsável pela transmissão da filariose linfática, Febre do Vale do Rift, Febre do Oeste do Nilo e possivelmente a Zika, tendo em vista o isolamento do vírus a partir deste vetor (CRUZ et al., 2020; HARI; MATHEW, 2018; GUEDES et al., 2017; BHATTACHARYA; BASU, 2016).

O vírus transmitido pelo *Ae. aegypti* que atualmente causa maior impacto na saúde pública é o vírus da dengue, o qual possui quatro sorotipos (DENV 1- 4) e pode ser caracterizada como uma doença aguda viral sistêmica, apresentando como sintomas febre alta de início súbito, dores musculares, náusea e vômito, podendo evoluir para quadros severos, como a síndrome de choque da dengue. Apesar dos sintomas apresentados, uma parcela da população infectada com o DENV é assintomática. Tais indivíduos representam um problema, tendo em vista que é possível a transmissão do vírus para mosquitos não contaminados. Também existem estudos que relatam a transferência vertical do vírus, casos em que a mãe passa para o feto (BHATT et al., 2013; DUONG et al., 2015; BASURKO et al., 2018).

A chikungunya é transmitida não só pelo *Aedes aegypti*, como também pelo *Ae. albopictus* e pelo *Ae. polynesiensis*, sendo causada pelo Chikungunya vírus (CHIKV).

Casos são reportados em todos os continentes e o ciclo de infecção é similar ao da dengue, os humanos são então infectados através da picada do mosquito. A maioria dos pacientes infectados são sintomáticos e os sinais clínicos são compostos por febre alta de início súbito, artralgia, artrite, erupções cutâneas maculopapulares, náusea, fadiga, dor de cabeça, dor nas costas. Manifestações neurológicas também podem estar presentes, como encefalite e síndrome de Guillain-Barré, doença autoimune associada a inflamação do sistema nervoso periférico que leva a fraqueza e paralisia muscular. Grande parte dos sintomas da chikungunya são similares aos apresentados no quadro clínico da dengue, o que dificulta a obtenção de um diagnóstico preciso. No entanto, a artralgia simétrica provocada pelo CHIKV é descrita como debilitante e persistente, alguns pacientes permanecem sentindo dores por meses após a fase inicial da doença (VU; JUNGKIND; ANGELLE DESIREE LABEAUD, 2017; VAIRO et al., 2019).

O Zika vírus (ZIKV) também tem como vetor o *Ae. aegypti*, no entanto, não é transmitido apenas pela picada do mosquito. A infecção pode ocorrer também via transmissão sexual, perinatal, transfusão sanguínea e até mesmo por meio do aleitamento materno. Esses vários modos de transmissão dificultam o desenvolvimento de métodos para controle da disseminação da doença. Os sintomas da Zika são pouco específicos e pode-se citar febre, erupção cutânea, artralgia e conjuntivite. Além disso, a infecção pelo ZIKV foi associada ao desenvolvimento da Síndrome de Guillain-Barré em adultos e microcefalia em bebês nascidos de mulheres infectadas (SONG et al., 2017; FERRARIS; YSSEL; MISSÉ, 2019).

1.2 Epidemiologia das arboviroses

A dengue continua a impactar negativamente a saúde humana em regiões infestadas pelo *Aedes aegypti*. A incidência desta e de outras arboviroses, como Zika e chikungunya, têm sido crescente, não só no Brasil, mas no mundo. Recentemente, foram detectados mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* em Ontário, no Canadá, o que é preocupante pois mostra a capacidade de adaptação da espécie em países de clima temperado (GIORDANO et al., 2020). Estima-se que ocorram anualmente cerca de 390 milhões de casos de dengue, sendo 96 milhões destes com manifestações clínicas significativas (BISWAL et al., 2020; BHATT et al., 2013; DUONG et al., 2015).

No Brasil, de acordo com o Boletim Epidemiológico 48 de 2020, emitido pelo Ministério da Saúde, a taxa de incidência da dengue foi de 462,1 casos a cada 100 mil habitantes, sendo notificados 971.136 casos prováveis, no período de 29/12/2019 a 14/11/2020 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020). O Boletim epidemiológico 32 de 2021, que abrange o período de 3/1/2021 a 4/9/2021, mostrou uma redução de cerca de 50% do número de casos notificados de dengue em relação ao mesmo período do ano anterior. Houve uma redução na taxa de incidência para 220 casos por 100 mil habitantes, tendo sido notificados 465.897 casos prováveis. Essa queda pode ser explicada por uma subnotificação ou por atraso nas notificações das arboviroses, frente ao enfrentamento da pandemia de COVID-19 por parte das equipes de vigilância somado ao medo da população de buscar atendimento nas unidades de saúde (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021).

Já de acordo com os dados do ECDC, foram notificados 1 316 518 casos no ano de 2021, a maioria do Brasil (845 720), Índia (60 112), Vietnã (53 489), Peru (37 728) e Filipinas (32 555) (“Dengue worldwide overview”, 2021).

1.3 Comportamento vetorial e biologia do inseto

O *Aedes aegypti* é um mosquito com desenvolvimento holometabólico, que passa pelas seguintes fases: ovo, larva, pupa e adulto (Fig. 1). A primeira fase é o ovo, no qual o embrião leva cerca de 48 horas para amadurecer. Em seguida, a fase larvária tem início. Nesta, as larvas passam por quatro estágios até estarem prontas para se transformarem em pupas, o que leva cerca de 5 dias. Dentro de 2 a 3 dias após a transformação em pupas, os organismos alcançam a forma adulta. Após 24 horas na forma adulta, os mosquitos estão prontos para acasalar, sendo necessária apenas uma inseminação para a fecundação de todos os ovos que a fêmea produz durante sua vida (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001).

O *Ae. aegypti* é altamente antropofílico, de hábitos diurnos, climas tropicais e busca reservatórios que acumulam água para realizar a oviposição, como tanques de água, pneus, garrafas e latas (CHAVES et al., 2020; GIORDANO et al., 2020). São mais ativos nas primeiras horas do dia, no entanto ainda são capazes de picar ao anoitecer. Segundo o estudo de Captain-Esoah e colaboradores (2020), os períodos de pico de picadas são entre 06-08 horas e 15-16 horas (CAPTAIN-ESOA et al., 2020).

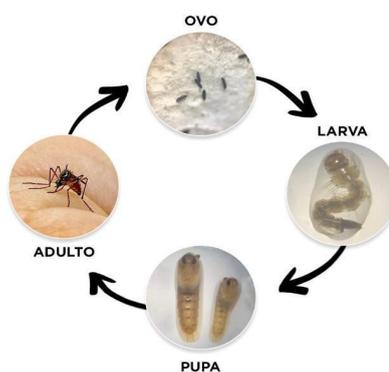


Figura 1. Ciclo de vida do *Aedes aegypti*, do ovo ao mosquito adulto. (Fonte: arquivo do Laboratório de Farmacognosia)

Os mosquitos buscam os hospedeiros com o intuito de se alimentar, desse modo o agente infeccioso entra em contato com o hospedeiro. Para que o vetor passe a infecção

adiante, o vírus precisa completar o período de incubação extrínseca, o qual tem início quando o vírus é ingerido pelo mosquito e é finalizado quando este alcança as glândulas salivares (BISWAL et al., 2020; GOINDIN et al., 2015; REICHERT et al., 2019).

O sistema olfatório desempenha papel crucial no que diz respeito à sobrevivência e à reprodução dos mosquitos. Os neurônios sensoriais olfatórios (NSO) são os responsáveis pela detecção de aromas presentes no ambiente. Existem três receptores principais presentes nas membranas destes neurônios: os receptores ionotrópicos (RI), os receptores gustativos (RG) e os receptores de odor (RO) (HILL; IGNELL, 2021; WHEELWRIGHT; WHITTLE; RIABININA, 2021).

Diante disso, a partir da associação de sinais olfatórios e sensoriais, os mosquitos apresentam um comportamento de busca pelo hospedeiro, o qual é desencadeado frente a inúmeros fatores. Os principais fatores detectados pelo mosquito são a presença de gás carbônico (CO₂) pelos RGs, temperatura corporal e cheiro do hospedeiro pelos receptores RIs e ROs, presença de umidade, e pistas visuais, como a movimentação do hospedeiro e o formato (WHEELWRIGHT; WHITTLE; RIABININA, 2021). No mínimo dois desses estímulos devem ocorrer para que a busca do hospedeiro seja desencadeada. Sendo assim, um ambiente calmo facilita a identificação do hospedeiro, enquanto ambientes complexos confundem os mosquitos (WHEELWRIGHT; WHITTLE; RIABININA, 2021).

O CO₂ tem a capacidade de desencadear a busca pelo hospedeiro há um maior alcance, sendo detectável em uma distância de até 10 metros. Pistas visuais e cheiros são detectáveis até 2 metros, ao passo que a temperatura corporal só é detectável há uma pequena distância, cerca de 15 centímetros. A temperatura seria então um indicativo suficiente da presença do hospedeiro, sendo capaz de atrair o vetor e desencadear o início do pouso sem associação a outros sinais (WHEELWRIGHT; WHITTLE; RIABININA,

2021). De acordo com um estudo realizado por Zermoglio e colaboradores (2017), as fêmeas famintas são capazes de se orientar usando apenas o calor e ainda possuem a capacidade de detectar mudanças de temperatura, o que permite que ela diferencie objetos do hospedeiro, mesmo a uma pequena distância (ZERMOGLIO et al., 2017).

Para a sua sobrevivência, o mosquito fêmea pode tanto se alimentar de néctar como de sangue. A partir do néctar são absorvidos carboidratos destinados ao metabolismo energético, enquanto o sangue é uma refeição proteica essencial para o desenvolvimento dos ovos (JOVÉ et al., 2020). Existem relatos na literatura que associam a preferência do *Aedes aegypti* por sangue humano à concentração de isoleucina, e, de acordo com Captain-Esoah e colaboradores (2020), isso ajudaria a melhorar condicionamento físico do mosquito e sua capacidade de sintetizar reservas de energia (CAPTAIN-ESOA et al., 2020).

A partir da detecção do hospedeiro, os receptores de odor presentes no estilete do mosquito atuam a fim de detectar a localização dos vasos sanguíneos e escolher um local preciso para a picada (WHEELWRIGHT; WHITTLE; RIABININA, 2021). O estilete é a estrutura responsável por perfurar a pele e entrar em contato direto com o sangue, permitindo a alimentação (JOVÉ et al., 2020).

O organismo do mosquito passa por mudanças fisiológicas após a alimentação, as quais incluem distensão abdominal, processamento de fluídos e resíduos por neuropeptídeos e hormônios, e digestão proteica. A distensão abdominal funciona como um marcador de saciedade. Por meio dos receptores de estiramento, sinais são enviados para que a fêmea finalize a refeição (DUVALL, 2019). Quando consumidos cerca de 3 uL de sangue, independentemente da quantidade de água e do teor de proteínas, o comportamento de busca por hospedeiros é suprimido (DUVALL, 2019).

A digestão pode ser dividida em dois momentos, precoce e tardia. A digestão precoce tem início logo após a detecção de aminoácidos no intestino médio, e então hormônios diuréticos auxiliam na eliminação do excesso de sal, água e resíduos, contribuindo para a redução da distensão abdominal em cerca de 1 dia. Já a digestão tardia tem início após 12-30 horas, e é quando os nutrientes são liberados para absorção no intestino (DUVALL, 2019).

A partir da alimentação à base de sangue, o ciclo de reprodução gonotrófico do *Ae. aegypti* tem início, e vai ser finalizado com a deposição dos ovos, repetindo-se várias vezes no decorrer da vida da fêmea (GOINDIN et al., 2015). A alimentação costuma ser rápida, sendo necessários poucos segundos para dobrar a massa corporal total do mosquito. Após alimentado, o organismo do mosquito aproveita os nutrientes e proteínas advindos do sangue para o desenvolvimento dos ovos, os quais estão prontos para deposição em até 4 dias (DUVALL, 2019). Nos dias subsequentes, a fêmea para de buscar um novo hospedeiro para alimentação sanguínea e volta sua atenção para a busca de um local adequado e úmido para depor os ovos, retendo estes até que encontre um local viável. Existem estudos bem elucidados que mostram que o *Ae. aegypti* começa a ser atraído pela umidade e pelos odores do local de oviposição após 48 horas da refeição completa, alcançando o pico 72 horas depois (HILL; IGNELL, 2021). Após a oviposição, o ciclo tem início novamente (HILL; IGNELL, 2021; DUVALL, 2019).

Caso a alimentação não tenha sido suficiente, a fêmea tem um período de supressão menor e volta a buscar um hospedeiro para se alimentar. Desse modo, o desenvolvimento dos oócitos é suspenso até que exista quantidade suficiente de sangue disponível, para que então ocorra a oviposição (HILL; IGNELL, 2021). De acordo com Hill et al. (2021), a alimentação sanguínea incompleta aumenta a interação entre o vetor e o hospedeiro, visto

que a fêmea necessitará completar as reservas e terá o período de supressão menor. Isso pode, portanto, aumentar a transmissão de vírus (HILL; IGNELL, 2021).

1.4 Prevenção da transmissão e controle vetorial

A única vacina bem estabelecida hoje em relação às arboviroses é a da febre amarela. Esta foi desenvolvida a partir de processos de atenuação viral, que consistiram na passagem sequencial do vírus em culturas teciduais restritivas para o crescimento deste. Teve sua fabricação iniciada durante a segunda guerra mundial e foram realizadas campanhas de vacinação em massa na América do Sul, o que evitou surtos de febre amarela em grande escala (MONATH, 2005; PATTERSON; SAMMON; GARG, 2016). Hoje, a vacina faz parte do calendário nacional de vacinação, sendo aplicada aos 9 meses e aos 4 anos de idade. A partir dos 5 anos de idade, o indivíduo recebe uma dose única da vacina se nenhuma dose foi administrada previamente (“Calendário Nacional de Vacinação”, 2020).

Hoje existe uma vacina para a dengue, a Dengvaxia®[®], do laboratório Sanofi Pasteur. No entanto, esta não é distribuída pelo SUS e só deve ser administrada em indivíduos acima de 9 anos de idade e que já tiveram dengue ao menos uma vez, o que restringe bastante sua aplicabilidade (THOMAS; YOON, 2019). A vacina tetravalente da empresa Takeda (TAK-003) é uma forte candidata a entrar no mercado. É uma vacina desenvolvida a partir do vírus vivo atenuado do sorotipo 2 da dengue, que fornece estrutura genética para os outros 3 sorotipos. Os estudos de fase 1 e 2 mostraram resultados promissores e os estudos de fase 3, com crianças de 4 a 16 anos, mostraram uma alta eficácia. Logo após a primeira dose já é possível alcançar uma alta taxa de proteção contra todos os sorotipos (BISWAL et al., 2020). No entanto, estudos acerca do desenvolvimento

de novas vacinas que possam conferir proteção a todas as faixas etárias independentemente do estado sorológico ainda são necessários (BISWAL et al., 2020).

Não existem vacinas disponíveis no mercado para Zika e chikungunya, no entanto existem estudos em desenvolvimento (VAIRO et al., 2019; FERRARIS; YSSEL; MISSÉ, 2019; MORABITO; GRAHAM, 2017).

Desse modo, o foco da prevenção da transmissão de arboviroses ainda consiste na busca pela redução no número de vetores. Para este controle, existem no mercado larvicidas e inseticidas à base de carbamatos, piretróides, organofosforados e organoclorados. No entanto, a toxicidade para humanos e espécies não-alvo é uma preocupação. Além disso, o uso não controlado desses inseticidas, contribuiu para o aumento de mosquitos resistentes à sua ação. A pressão seletiva frente aos indivíduos que conseguem sobreviver ao uso desses produtos contribui para o desenvolvimento da resistência, o que representa um grave problema (WORKMAN et al., 2020; SANTOS et al., 2012; HAMID-ADIAMOH et al., 2020). Podem ser citadas como alternativas de menor toxicidade os neonicotinóides, que são agonistas seletivos do receptor nicotínico de acetilcolina de inseto; o diflubenzuron e o novaluron, que atuam como inibidores da síntese de quitina; e o spinosade, um produto natural bioativo de base bacteriana (BASS et al., 2015; MONTAÑO-REYES et al., 2019; SANTOS; PEREIRA, 2020; FIAZ et al., 2021).

Outra abordagem tem sido educar as populações mais expostas, e isso tem contribuído para uma redução do número de casos de arboviroses (REICHERT et al., 2019). No Brasil, os agentes de combate às endemias têm um papel fundamental no controle mecânico do vetor e atuam buscando potenciais criadores e eliminando-os adequadamente. Além disso, orientam a população, por meio da promoção de ações

educativas durante as visitas domiciliares, sobre a importância tanto de impedir quanto de evitar a proliferação do mosquito (CHAVES et al., 2020).

Os esforços crescentes para conter a rápida transmissão das arboviroses incluem, além da eliminação dos prováveis sítios de reprodução, o uso de combinações de alvos químicos e biológicos para controle do mosquito *Aedes aegypti* (BHATT et al., 2013; WORKMAN et al., 2020; SANTOS et al., 2012). Uma estratégia interessante que vem sendo desenvolvida é a utilização da bactéria *Wolbachia* para infecção deste mosquito. Esta é uma bactéria presente em cerca de 60% dos insetos, no entanto ausente no *Aedes aegypti*. Desse modo, a partir da infecção dos mosquitos com esta, o desenvolvimento dos vírus da DENV, ZIKV e CHIKV é impedido, não havendo então modificação genética (GARCIA et al., 2020).

Atualmente, têm se buscado alternativas aos larvicidas sintéticos e naturais já disponíveis, como o temefós, o óleo de neem, piretróides e o *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti). Um alvo potencial das pesquisas são produtos de origem vegetal, como óleos essenciais (OE) e outros metabólitos secundários (ALTO; LORD, 2016; HUANG et al., 2019; WORKMAN et al., 2020).

Além da atividade larvicida relatada, os óleos essenciais já são usados como repelentes naturais há mais de um século ao redor do mundo, como é o caso do OE de citronela (LUZ et al., 2020; RAI; LAL; GAUTAM, 2019).

1.5 Óleos Essenciais

Alguns produtos naturais já mostraram atividade em *Ae. aegypti*, dentre eles destacam-se os óleos essenciais. Segundo Nério e colaboradores (2015), óleos essenciais são caracterizados como misturas complexas de compostos voláteis (NERIO;

OLIVERO-VERBEL; STASHENKO, 2010; PAVELA, 2015) oriundos do metabolismo secundário das plantas, como terpenos, sesquiterpenos, aldeídos, álcoois e fenóis (NERIO; OLIVERO-VERBEL; STASHENKO, 2010). As plantas produzem OE na maioria das vezes com o intuito de se proteger contra predadores e microrganismos patogênicos, além de atrair animais polinizadores, tendo em vista que apresentam aromas fortes e característicos (LUZ et al., 2020; PAVELA, 2015).

Os óleos essenciais são descritos em diversos estudos como potenciais larvicidas, adulticidas, repelentes, alguns apresentando atividade até mesmo na oviposição (SILVÉRIO et al., 2020). Hoje, devido à crescente resistência dos vetores aos repelentes disponíveis no mercado, o estudo de novos produtos repelentes que sejam não-tóxicos, biodegradáveis e seguros tanto para o homem quanto para outros organismos não-alvo estão em alta (ALI et al., 2018).

Outro ponto relevante que a literatura descreve, é que os alvos moleculares dos óleos essenciais nos insetos são diferentes dos alvos presentes nos mamíferos, fato interessante pois tornam seu uso mais seguro tanto para humanos como para organismos não-alvo (NORRIS et al., 2019). Considerando ainda que OE são misturas complexas de compostos, é baixa a probabilidade de ocorrer resistência cruzada devido à possibilidade de exercerem diferentes mecanismos de ação no vetor (NERIO; OLIVERO-VERBEL; STASHENKO, 2010; NORRIS et al., 2019).

Embora a repelência costume ser atribuída a um constituinte majoritário do OE, os constituintes minoritários podem atuar sinergicamente contribuindo para o aumento do efeito repelente (NERIO; OLIVERO-VERBEL; STASHENKO, 2010). Além disso, estudos mostram que os mosquitos são mais responsivos a uma mistura de compostos orgânicos voláteis (COV), do que quando expostos a um COV isolado, tornando os óleos

essenciais interessantes objetos de estudo para o desenvolvimento de formulações repelentes (HILL; IGNELL, 2021).

1.6 Repelentes

Repelentes são substâncias naturais ou sintéticas, de aplicação tópica ou espacial, que têm a capacidade de afastar o vetor da origem de aplicação, reduzindo o contato deste com o indivíduo (LALTHAZUALI; MATHEW, 2017; ESTRADA et al., 2019). De acordo com Islam et al., os repelentes podem ser classificados como repelentes espaciais, excitorepelentes, dissuasores, mascaradores de odor, e mascaradores visuais (ISLAM et al., 2017).

A repelência espacial pode ser definida como o movimento orientado de vetores para longe de determinada substância química, sem que haja contato físico direto entre esta e o vetor (ACHEE et al., 2009). Desse modo, um repelente espacial seria uma substância capaz de afastar o vetor do ponto de aplicação, inibindo a capacidade dos vetores de localizar e rastrear um alvo (KLINE et al., 2003) e, por tanto, promovendo áreas livres de vetor (ACHEE et al., 2012). A modificação do comportamento do vetor na busca por hospedeiros gerada pela presença do repelente, a longo prazo, pode reduzir a pressão de seleção dos mosquitos e com isso amenizar o desenvolvimento de resistência (ESTRADA et al., 2019).

Os excitorepelentes precisam que o vetor entre em contato direto com a substância para então ser afastado. Já os dissuasores atuam inibindo um determinado comportamento do vetor, como a oviposição. Os mascaradores de odor são capazes de bloquear a atração do vetor pelo odor do hospedeiro, ao passo que os mascaradores visuais dificultam a localização do hospedeiro ao atrapalhar a visão do vetor (ISLAM et al., 2017). Ainda

existem os repelentes tópicos, que são aplicados diretamente na pele (ESTRADA et al., 2019).

O repelente de referência para aplicação tópica disponível hoje é o DEET (N, N-dietil-3-metilbenzamida), no entanto seu uso, apesar de eficaz, é limitado por este não ser tão volátil como outros repelentes o que leva a um alcance espacial menor. Além disso, seu uso pode acarretar reações adversas com intensidade variando de leve à severa. Estudos demonstraram que o DEET é capaz de inibir as enzimas acetilcolinesterase humanas, modular os receptores acoplados à proteína G e inibir os canais iônicos (REICHERT et al., 2019; LALTHAZUALI; MATHEW, 2017). Adicionalmente, o custo para aquisição do repelente não é acessível a muitas pessoas que vivem em regiões da África subsaariana, China e Índia, por exemplo (REICHERT et al., 2019). Nestes locais, a forma de proteção primária contra mosquitos é o uso de produtos naturais como repelentes, sendo os mais comuns a citronela, o capim-limão e o óleo de neem (REICHERT et al., 2019; NORRIS; COATS, 2017). Outro óleo com potencial repelente já exibido é o óleo essencial (OE) de eucalipto. (LALTHAZUALI; MATHEW, 2017; NORRIS; COATS, 2017).

Existem diferentes ensaios comportamentais descritos na literatura para triagem de novos compostos repelentes de mosquitos. Dentre estes, pode-se citar ensaios para identificação de substâncias atrativas e que inibem a atração, ensaios de irritação por contato, repelência espacial, ensaios de excitorepelência e ensaios anti-mordida (ACHEE et al., 2009).

O ensaio *arm-in-cage* foi um dos primeiros testes de repelência desenvolvidos. Este consiste na aplicação de diversos candidatos repelentes, incluindo os óleos essenciais, com o solvente adequado em um braço e na aplicação do controle negativo no braço contrário,

seguidos da inserção de cada braço em gaiolas independentes contendo mosquitos (Fig. 2) (NERIO; OLIVERO-VERBEL; STASHENKO, 2010; COLUCCI; MÜLLER, 2018).



Figura 2. Ensaio *arm-in-cage* para testes de repelência tópica (Fonte: COLUCCI e MÜLLER, 2018)

Os ensaios de excitorepelência são utilizados a fim de avaliar as ações que substâncias químicas podem exercer sobre os vetores. Este permite a avaliação tanto da irritação quanto da repelência provocada nos mosquitos expostos à uma área tratada quimicamente, além disso, auxilia na elucidação das respostas comportamentais (Fig. 3) (SUKKANON et al., 2020; CHOOMSANG et al., 2018). Sukkanon et al. (2019) usou um aparato composto por quatro câmaras, sendo 2 de tratamento, 2 de controle. Nas câmaras destinadas ao ensaio de repelência espacial, são utilizados papéis impregnados com a substância de interesse, os quais são posicionados atrás de uma grade, para evitar o contato direto com o mosquito. Já para os ensaios de excitação, os papéis impregnados ficam expostos para permitir o contato direto com o mosquito (SUKKANON et al., 2020).

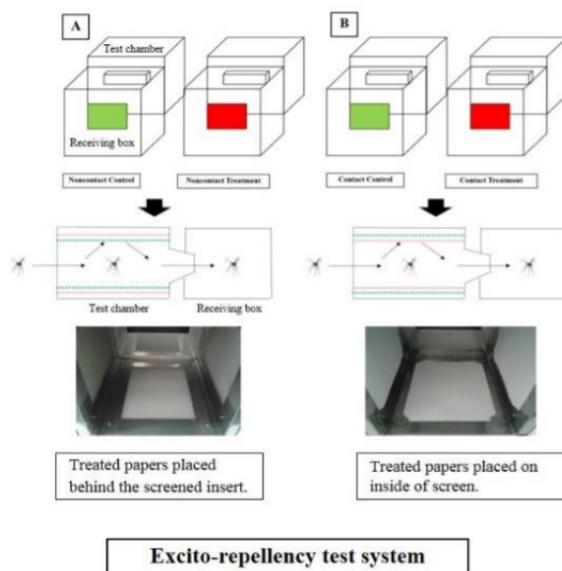


Figura 3. Sistema de ensaios de excitorepelência (Fonte: CHOOMSANG, 2018)

Klun et al. (2005) desenvolveu um módulo para condução de bioensaios *in vitro* (K&D) de 6 células com o intuito de avaliar quantitativamente a capacidade de compostos químicos dissuadirem as picadas dos vetores (Fig. 4). Os módulos eram posicionados sobre um recipiente que continha solução de alimentação para os mosquitos, sobre o qual era posicionado um tecido tratado com a amostra de interesse. Por fim, o módulo era encaixado sobre o tecido, para avaliar se os mosquitos se alimentariam da solução mesmo na presença da amostra (KLUN; KRAMER; DEBBOUN, 2005).

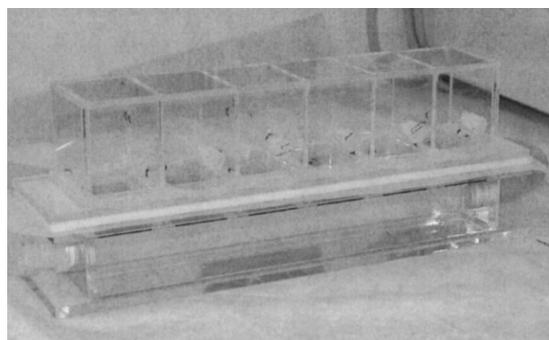


Figura 4. Módulo de 6 células para bioensaios *in vitro* (Fonte: KLUN, KRAMER e DEBBOUN, 2005)

Ainda pode-se citar o bioensaio de olfatômetro em tubo Y (Fig. 5), que consiste em um tubo em Y feito de vidro, o qual possui uma haste principal e outros dois braços, um contendo a amostra de interesse e o outro o controle. Os insetos são inseridos por um orifício na junção dos três braços e após determinado tempo são contabilizados em cada tubo (NERIO; OLIVERO-VERBEL; STASHENKO, 2010; ERLER; ULUG; YALCINKAYA, 2006).

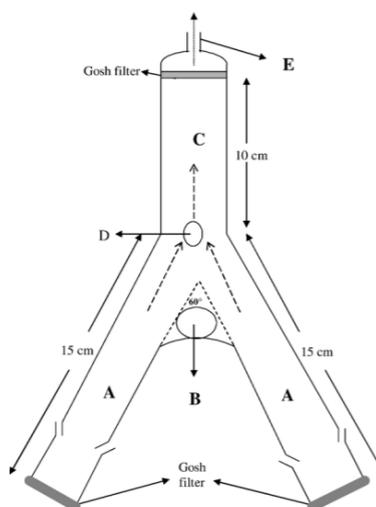


Figura 5. Desenho esquemático do olfatômetro em tubo Y, sendo A: braços do tubo em Y, B: ângulo entre os braços, C: braço principal do tubo em Y, D: introdução do inseto, -->: direção do fluxo de ar e E: conexão da bomba (Fonte: ERLER; ULUG; YALCINKAYA, 2006)

O presente estudo avaliou a atividade repelente espacial de óleos essenciais de acordo com o Guia para Testes de Eficácia de Repelentes Espaciais, da Organização Mundial de Saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2013), que preconiza a utilização do aparato *High-throughput Screening System* - HITSS.

O sistema de *high-throughput screening* permite a identificação de compostos biológicos e químicos com potencial ação em alvo biológico específico, sendo o principal objetivo de acordo com Entzeroth e colaboradores, a identificação de membros de uma

biblioteca química que interagem de uma forma definida com um sistema selecionado (ENTZEROTH; FLOTOW; CONDRON, 2009). Esta metodologia associada ao HITTS permite identificar compostos com potencial repelência espacial para uso em ambientes domésticos (Fig. 6) (ACHEE et al., 2009).

O aparato é composto por 3 câmaras, uma central, uma de tratamento e uma de controle. Os mosquitos são inseridos na câmara central e então o comportamento frente ao composto utilizado na câmara de tratamento é observado. Os mosquitos podem tanto migrar para a câmara de controle, evidenciando a repelência da amostra testada, como podem migrar em direção a câmara de tratamento, evidenciando a atratividade da amostra. Ainda há a possibilidade de os mosquitos permanecerem na câmara central, mostrando que a amostra não exerceu influência no comportamento do vetor (ACHEE et al., 2009).

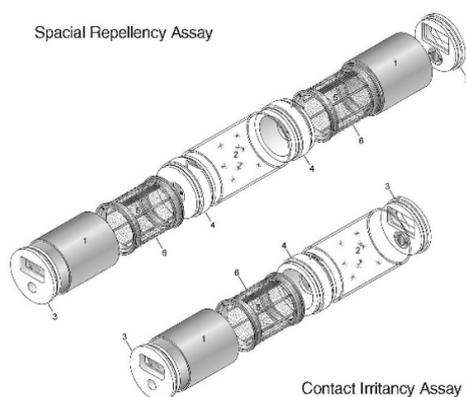


Figura 6. Desenho esquemático do aparato HITSS, que permite a realização tanto testes de repelência espacial (figura da esquerda) quanto testes de irritação por contato (figura da direita) (Adaptado: ACHEE et al., 2009)

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo do presente estudo é realizar a avaliação da atividade repelente espacial e toxicidade de 19 óleos essenciais comerciais em fêmeas de *Ae. aegypti*.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar 19 óleos essenciais quanto à atividade repelente espacial na concentração de 10% utilizando o HITSS.
- Realizar a curva dose resposta dos dois óleos essenciais com melhores resultados de repelência espacial na triagem inicial.
- Realizar o teste adulticida em garrafas dos óleos com maior atividade repelente para avaliar seu potencial de toxicidade.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Manutenção da Colônia

Os testes foram realizados em cepas de *Aedes aegypti* da linhagem Rockefeller, mantidos no Insetário ArboControl do Laboratório de Farmacognosia da Universidade de Brasília a 26 ± 4 °C e $70 \pm 10\%$ de umidade. A colônia foi mantida sob fotoperíodo de 12 horas, claro e escuro.

Para a produção dos ovos, os mosquitos eram alimentados com sangue de égua três vezes por semana. Após a eclosão dos ovos, as larvas eram depositadas em bandejas contendo 4 litros de água, e eram alimentadas com ração moída de peixe. Quando as larvas alcançaram o estágio de pupa, foram diferenciadas em macho e fêmea com base no seu tamanho e auxílio de estereomicroscópio. As pupas fêmeas utilizadas para montagem das gaiolas de teste. As fêmeas adultas destinadas ao teste foram alimentadas com solução açucarada a 10% (p/v).

3.2 Amostras

Foram adquiridos 19 óleos essenciais (BioEssência®) para avaliação de sua atividade repelente espacial e de toxicidade, e foi atribuído um código padronizado a cada um destes óleos para realização dos ensaios (Tabela 1). Foi usado como controle positivo Linalol 10% (v/v) (ESTRADA et al., 2019) e controle negativo acetona.

Tabela 1. Lista de óleos essenciais representados pelos códigos Arbo que foram avaliados quanto a sua atividade repelente espacial (HITSS) em fêmeas de *Ae. aegypti* e sua respectiva família.

Código ARBO	Família
ArboS56	Rutaceae
ArboS57	Asteraceae
ArboS59	Pinaceae
ArboS68	Zingiberaceae
ArboS69	Geraniaceae
ArboS70	Rutaceae
ArboS71	Lamiaceae
ArboS73	Rutaceae
ArboS74	Rutaceae
ArboS77	Rutaceae
ArboS79	Lamiaceae
ArboS80	Lamiaceae
ArboS81	Burseraceae
ArboS83	Lamiaceae

ArboS84	Rutaceae
ArboS86	Rutaceae
ArboS87	Rutaceae
ArboS89	Poaceae
ArboS90	Annonaceae

3.3 Teste de Repelência Espacial

Para o teste de repelência espacial foi utilizado o *High-throughput Screening System* (HITSS). O aparato é composto por uma câmara central de acrílico, uma câmara metálica de tratamento e uma câmara metálica de controle, sendo configurado de modo que ambas as câmaras metálicas estejam encaixadas às extremidades da câmara de acrílico central, por meio de conectores que facilitavam a movimentação dos mosquitos em direção às extremidades do aparato (Fig. 7) (GRIECO et al., 2005).

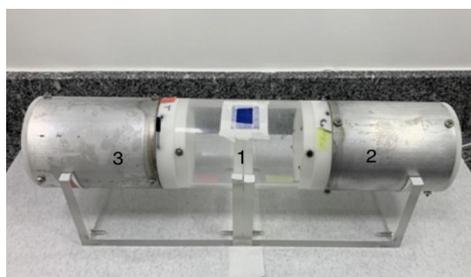


Figura 7. *High-throughput screening system* (HITSS) composto por: 1) Câmara central de acrílico; 2) Câmara metálica de controle; 3) Câmara metálica de tratamento. (Fonte: arquivo do Laboratório de Farmacognosia)

Para realização de cada teste, foram separados 12 recipientes contendo 20 ± 2 fêmeas cada, com idade entre 4 e 7 dias, no dia anterior ao teste e estas foram mantidas sem alimentação por 24 horas até a realização do teste (Fig. 8).



Figura 8. Recipientes de plástico contendo as fêmeas separadas para o teste no HITSS. Os mosquitos eram mantidos sem alimentação por 24 horas, sob 26 ± 4 °C e $70 \pm 10\%$ de umidade. (Fonte: arquivo do Laboratório de Farmacognosia)

As amostras de óleos essenciais foram preparadas no dia da realização dos testes, inicialmente na concentração de 10% (v/v), diluídas em acetona. As duas amostras com as maiores atividades repelentes foram testadas adicionalmente a 7,5; 5 e 2,5 % (v/v). As redes de tratamento e controle, com área de 275 cm², foram tratadas com 1,5 mL da amostra, utilizando-se uma micropipeta. A rede controle foi tratada com acetona. A amostra foi aplicada à rede de tratamento em dois momentos, no início e no meio do teste antes da quinta replicata, já que óleos essenciais são compostos voláteis. As redes foram secas por 15 minutos antes de serem posicionadas em suas respectivas câmaras.

Foram realizadas 9 replicatas com 20 ± 2 fêmeas. Os mosquitos foram adicionados à câmara central do aparato, a qual foi coberta com um tecido de feltro preto a fim de evitar a influência da luz sobre os mosquitos. Esperou-se 30 segundos para ambientação das fêmeas e posteriormente as válvulas de cada câmara foram colocadas na posição aberta e iniciada a contagem de 10 minutos. (Fig. 9)

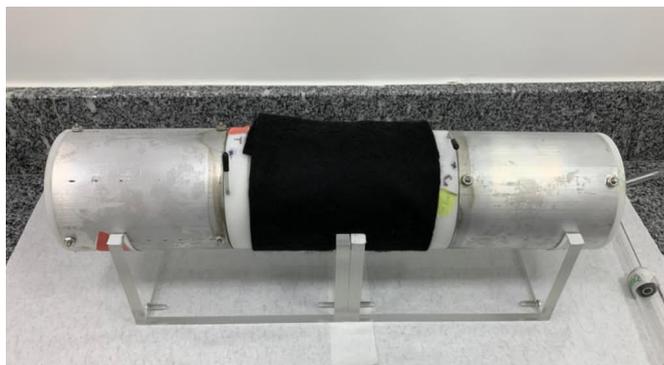


Figura 9. Aparato com feltro, durante a realização do experimento, cobrindo a parte central de acrílico para evitar influência da luz sobre os mosquitos. (Fonte: arquivo do Laboratório de Farmacognosia)

Após os 10 minutos, as válvulas foram fechadas e então foram contabilizadas as fêmeas em cada compartimento, e a ocorrência de *knockdown*. Foram considerados mosquitos *knockdown* aqueles que não conseguiam se levantar ou se movimentar.

3.3.1 Limpeza do aparato

Após a realização de cada teste foi feita a limpeza do aparato. Os cilindros internos que entraram em contato com a rede foram limpos com acetona. As demais peças componentes foram lavadas com detergente Extran (Merck) em água corrente, e posteriormente enxaguadas com água fervente, para remoção completa de resíduos das amostras. Todas as peças foram deixadas secando à temperatura ambiente.

3.3.2 Análise estatística

Os resultados foram analisados por meio de um teste não paramétrico de postos com sinais (*signed-rank*) (PROC UNIVARIATE, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA 2012-2018) a fim de se determinar a média do SAI e do wSAI de cada tratamento.

A repelência espacial foi expressa pelo SAI, índice de repelência espacial, calculado por meio da fórmula $SAI = (N_c - N_t) / (N_c + N_t)$, sendo N_c o número de fêmeas no cilindro controle e N_t o número de fêmeas no cilindro contendo a rede de tratamento. A razão pode variar de -1 a 1, sendo -1 efeito atrativo, onde todas as fêmeas entraram no cilindro com a rede tratada, e 1 efeito repelente, onde todos os mosquitos migraram para o cilindro controle.

Também foi calculado o wSAI, índice de repelência espacial ponderado, que representa o quão repelente ou o quão atrativa a amostra é. O cálculo é feito por meio da

multiplicação da porcentagem de mosquitos que mostraram-se responsivos (PERESP) pelo SAI ($wSAI = PERESP \times SAI$), sendo PERESP calculado pela fórmula $(N_c + N_t) / N \times 100$, em que N representa o número de fêmeas introduzidas no cilindro central de acrílico no início do experimento.

Foi determinado, para fins de classificação e seleção dos óleos essenciais testados a 10 % (v/v) no laboratório de Farmacognosia da UnB, que valores de wSAI acima de 50 estão relacionados a óleos de alta repelência; wSAI entre 20 e 50, média; e wSAI abaixo de 20 para óleos de baixa repelência.

3.4 Teste Adulticida

Os testes adulticidas foram realizados de acordo com o manual do CDC (CDC, 2021). Foram utilizadas fêmeas de 4 dias de idade. Garrafas Scott de 250 mL foram impregnadas com os óleos essenciais já diluídos em acetona. Para preparação de cada amostra, foram pesados 2 mg de cada óleo essencial em eppendorf e diluídos em 1 mL. O volume final pipetado na garrafa foi de 250 uL, com concentração final de 500 µg/garrafa. No momento da impregnação foram feitos movimentos rotatórios manuais para que toda a superfície interna da garrafa entrasse em contato com a amostra de interesse. O teste foi montado utilizando 10 ± 2 mosquitos por garrafa, os quais eram tampadas utilizando papel alumínio (Fig. 10). A mortalidade dos mosquitos foi observada a cada 15 minutos durante 2 horas. As fêmeas foram consideradas mortas em caso de ausência total de movimento. Foram realizadas quatro replicatas para cada amostra e para o controle com acetona. Para o cálculo da mortalidade, a seguinte fórmula foi utilizada: $Mortalidade = (soma\ dos\ mosquitos\ mortos \times 100) / total\ de\ mosquitos\ vivos$. Foram considerados ativos aqueles

óleos que exibiram mortalidade >80%. A análise estatística do teste foi feita em software GraphPadPrism 9.0.



Figura 10. Garrafas impregnadas com a amostra para realização do teste de toxicidade.

(Fonte: arquivo do Laboratório de Farmacognosia)

4. RESULTADOS

5. DISCUSSÃO

6. CONCLUSÃO

A dengue continua a impactar negativamente na saúde humana em regiões infestadas pelo *Aedes aegypti*. A incidência desta e de outras arboviroses, como Zika e chikungunya, tem sido crescente, não só no Brasil, mas no mundo, o que mostra a relevância de se buscar novas alternativas para controlar a população do vetor e frear a transmissão dessas doenças. Óleos essenciais e outros derivados de produtos naturais são alternativas interessantes para substituir os repelentes sintéticos tendo em vista que muitas vezes são de baixa toxicidade, biodegradáveis e podem agir em alvos diferentes dos já descritos como potenciais alvos de repelência (ALI et al., 2018; NERIO; OLIVERO-VERBEL; STASHENKO, 2010; NORRIS et al., 2019).

Diante dos resultados apresentados nesse trabalho pôde-se concluir que os óleos essenciais que exibiram melhor desempenho como repelentes espaciais foram os OE de ArboS80 (wSAI de 63,076), ArboS84 (wSAI de 58,464), ArboS79 (wSAI de 57,187), ArboS71 (wSAI de 52,916) e ArboS56 (wSAI de 50,324). Tais óleos já foram testados anteriormente em ensaios de repelência, porém este é o primeiro estudo que avaliou a atividade repelente espacial de acordo com o protocolo da Organização Mundial de Saúde.

Além disso, o óleo essencial ArboS80 alcançou a taxa de 88% de mortalidade no teste adulticida, sendo o melhor resultado obtido. Desse modo, pode ser considerado tanto repelente espacial como adulticida.

Os óleos essenciais ativos mostraram-se potenciais para o desenvolvimento de formulações repelentes de ambiente, na busca de produtos que permitam criar áreas-livres de vetor. Tais formulações devem ser submetidas a testes de semi-campo que avaliem sua eficiência, além da avaliação química para determinação do perfil dos OE testados neste trabalho. Além disso, pode-se realizar estudos de sinergismo entre os óleos essenciais com o intuito de alcançar maior atividade tanto adulticida como repelente espacial.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHEE, N. L. et al. Characterization of spatial repellent, contact irritant, and toxicant chemical actions of standard vector control compounds. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 25, n. 2, p. 156–167, jun. 2009.

ADAMS, T. F. et al. “Singing in the Tube”--audiovisual assay of plant oil repellent activity against mosquitoes (*Culex pipiens*). **Parasitology Research**, v. 115, n. 1, p. 225–239, jan. 2016.

ALI, A. et al. Repellent Activity of Carrot Seed Essential Oil and Its Pure Compound, Carotol, Against Mosquitoes. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 34, n. 4, p. 272–280, dez. 2018.

AMER, A.; MEHLHORN, H. Repellency effect of forty-one essential oils against *Aedes*, *Anopheles*, and *Culex* mosquitoes. **Parasitology Research**, v. 99, n. 4, p. 478–490, set. 2006.

BASURKO, C. et al. Estimating the Risk of Vertical Transmission of Dengue: A Prospective Study. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 98, n. 6, p. 1826–1832, jun. 2018.

BHATT, S. et al. The global distribution and burden of dengue. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 504–507, 25 abr. 2013.

BISWAL, S. et al. Efficacy of a tetravalent dengue vaccine in healthy children aged 4-16 years: a randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. **Lancet (London, England)**, v. 395, n. 10234, p. 1423–1433, 2 maio 2020.

CAPTAIN-ESOA, M. et al. Biting Behavior and Molecular Identification of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Subspecies in Some Selected Recent Yellow Fever Outbreak

Communities in Northern Ghana. **Journal of Medical Entomology**, v. 57, n. 4, p. 1239–1245, 4 jul. 2020.

CARROLL, J. F. et al. Repellency of the *Origanum onites* L. essential oil and constituents to the lone star tick and yellow fever mosquito. **Natural Product Research**, v. 31, n. 18, p. 2192–2197, set. 2017.

CHAVES, R. DO S. B. et al. Evaluation of larvicidal potential against larvae of *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) and of the antimicrobial activity of essential oil obtained from the leaves of *Origanum majorana* L. **PLoS ONE**, v. 15, n. 7, p. e0235740, 17 jul. 2020.

CRUZ, L. C. D. T. A. DA et al. Influence of climatic variables on the *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* populations in Mato Grosso, Brazil. **Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical**, v. 53, p. e20190185, 2020.

DA SILVA RAMOS, R. et al. Chemical Composition and In Vitro Antioxidant, Cytotoxic, Antimicrobial, and Larvicidal Activities of the Essential Oil of *Mentha piperita* L. (Lamiaceae). **TheScientificWorldJournal**, v. 2017, p. 4927214, 2017.

DHIFI, W. et al. Essential Oils' Chemical Characterization and Investigation of Some Biological Activities: A Critical Review. **Medicines (Basel, Switzerland)**, v. 3, n. 4, p. E25, 22 set. 2016.

DUONG, V. et al. Asymptomatic humans transmit dengue virus to mosquitoes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 47, p. 14688–14693, 24 nov. 2015.

DUVALL, L. B. Mosquito Host-Seeking Regulation: Targets for Behavioral Control. **Trends in Parasitology**, v. 35, n. 9, p. 704–714, 1 set. 2019.

ESTRADA, J. L. T. et al. Spatial repellency and other effects of transfluthrin and linalool on *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. **Journal of Vector Ecology: Journal of the Society for Vector Ecology**, v. 44, n. 1, p. 89–93, jun. 2019.

GIATROPOULOS, A. et al. Evaluation of bioefficacy of three Citrus essential oils against the dengue vector *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in correlation to their components enantiomeric distribution. **Parasitology Research**, v. 111, n. 6, p. 2253–2263, dez. 2012.

GIATROPOULOS, A. et al. Chemical composition and assessment of larvicidal and repellent capacity of 14 Lamiaceae essential oils against *Aedes albopictus*. **Parasitology Research**, v. 117, n. 6, p. 1953–1964, jun. 2018.

GIORDANO, B. V. et al. Discovery of an *Aedes* (Stegomyia) *albopictus* population and first records of *Aedes* (Stegomyia) *aegypti* in Canada. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 34, n. 1, p. 10–16, mar. 2020.

GOINDIN, D. et al. Parity and Longevity of *Aedes aegypti* According to Temperatures in Controlled Conditions and Consequences on Dengue Transmission Risks. **PLOS ONE**, v. 10, n. 8, p. e0135489, 10 ago. 2015.

GOVINDARAJAN, M. et al. Chemical composition and larvicidal activity of essential oil from *Ocimum basilicum* (L.) against *Culex tritaeniorhynchus*, *Aedes albopictus* and *Anopheles subpictus* (Diptera: Culicidae). **Experimental Parasitology**, v. 134, n. 1, p. 7–11, maio 2013.

GOVINDARAJAN, M. et al. Acute toxicity and repellent activity of the *Origanum scabrum* Boiss. & Heldr. (Lamiaceae) essential oil against four mosquito vectors of public health importance and its biosafety on non-target aquatic organisms. **Environmental Science and Pollution Research International**, v. 23, n. 22, p. 23228–23238, nov. 2016.

GRIECO, J. P. et al. A novel high-throughput screening system to evaluate the behavioral response of adult mosquitoes to chemicals. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 21, n. 4, p. 404–411, dez. 2005.

HARI, I.; MATHEW, N. Larvicidal activity of selected plant extracts and their combination against the mosquito vectors *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti*. **Environmental Science and Pollution Research International**, v. 25, n. 9, p. 9176–9185, mar. 2018.

HILL, S. R.; IGNELL, R. Modulation of odour-guided behaviour in mosquitoes. **Cell and Tissue Research**, v. 383, n. 1, p. 195–206, jan. 2021.

HUANG, Y.-J. S.; HIGGS, S.; VANLANDINGHAM, D. L. Emergence and re-emergence of mosquito-borne arboviruses. **Current Opinion in Virology**, v. 34, p. 104–109, fev. 2019.

ISLAM, J. et al. Mosquito repellents: An insight into the chronological perspectives and novel discoveries. **Acta Tropica**, v. 167, p. 216–230, mar. 2017.

JOVÉ, V. et al. Sensory Discrimination of Blood and Floral Nectar by *Aedes aegypti* Mosquitoes. **Neuron**, v. 108, n. 6, p. 1163- 1180.e12, 23 dez. 2020.

KLINE, D. L. et al. Olfactometric evaluation of spatial repellents for *Aedes aegypti*. **Journal of Medical Entomology**, v. 40, n. 4, p. 463–467, jul. 2003.

KLUN, J. A.; KRAMER, M.; DEBBOUN, M. A new in vitro bioassay system for discovery of novel human-use mosquito repellents. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 21, n. 1, p. 64–70, mar. 2005.

KUMAR, S.; WAHAB, N.; WARIKOO, R. Bioefficacy of *Mentha piperita* essential oil against dengue fever mosquito *Aedes aegypti* L. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 1, n. 2, p. 85–88, abr. 2011.

- LALTHAZUALI, NULL; MATHEW, N. Mosquito repellent activity of volatile oils from selected aromatic plants. **Parasitology Research**, v. 116, n. 2, p. 821–825, fev. 2017.
- LUZ, T. R. S. A. et al. Essential oils and their chemical constituents against *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) larvae. **Acta Tropica**, v. 212, p. 105705, dez. 2020.
- MURUGAN, K.; MURUGAN, P.; NOORTHEEN, A. Larvicidal and repellent potential of *Albizzia amara* Boivin and *Ocimum basilicum* Linn against dengue vector, *Aedes aegypti* (Insecta:Diptera:Culicidae). **Bioresource Technology**, v. 98, n. 1, p. 198–201, jan. 2007.
- NERIO, L. S.; OLIVERO-VERBEL, J.; STASHENKO, E. Repellent activity of essential oils: a review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 1, p. 372–378, jan. 2010.
- NORRIS, E. J. et al. Plant essential oils synergize various pyrethroid insecticides and antagonize malathion in *Aedes aegypti*. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 33, n. 4, p. 453–466, dez. 2019.
- NORRIS, E. J.; COATS, J. R. Current and Future Repellent Technologies: The Potential of Spatial Repellents and Their Place in Mosquito-Borne Disease Control. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 14, n. 2, p. E124, 29 jan. 2017.
- PAVELA, R. Essential oils for the development of eco-friendly mosquito larvicides: A review. **Industrial Crops and Products**, v. 76, p. 174–187, 15 dez. 2015.
- POHLIT, A. M. et al. Patent literature on mosquito repellent inventions which contain plant essential oils--a review. **Planta Medica**, v. 77, n. 6, p. 598–617, abr. 2011.
- RAI, P.; LAL, M.; GAUTAM, K. A REVIEW: PATENT LITERATURE ON INVENTIONS CONTAINING ESSENTIAL OILS WITH MOSQUITO REPELLENCY. p. 13, [s.d].

- REICHERT, W. et al. Repellency Assessment of *Nepeta cataria* Essential Oils and Isolated Nepetalactones on *Aedes aegypti*. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1524, 6 fev. 2019.
- SANTOS, N. D. DE L. et al. Oviposition-stimulant and ovicidal activities of *Moringa oleifera* lectin on *Aedes aegypti*. **PloS One**, v. 7, n. 9, p. e44840, 2012.
- SATHANTRIPHOP, S. et al. Behavioral responses of *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, *Culex quinquefasciatus*, and *Anopheles minimus* against various synthetic and natural repellent compounds. **Journal of Vector Ecology: Journal of the Society for Vector Ecology**, v. 39, n. 2, p. 328–339, dez. 2014.
- SOONWERA, M. Efficacy of essential oils from citrus plants against mosquito vectors *Aedes aegypti* (Linn.) and *Culex quinquefasciatus* (Say). **International Journal of Agricultural Technology**, v. 11, n. 3, p. 669–681, 2015.
- SUKKANON, C. et al. Excito-repellency Activity of *Andrographis paniculata* (Lamiales: Acanthaceae) Against Colonized Mosquitoes. **Journal of Medical Entomology**, v. 57, n. 1, p. 192–203, 9 jan. 2020.
- SUWANSIRISILP, K. et al. Behavioral responses of *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) to four essential oils in Thailand. **Journal of Pest Science**, v. 86, n. 2, p. 309–320, jun. 2013.
- THOMAS, S. J.; YOON, I.-K. A review of Dengvaxia®: development to deployment. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 15, n. 10, p. 2295–2314, 2019.
- TISGRATOG, R. et al. Evaluation of the Constituents of Vetiver Oil Against *Anopheles minimus* (Diptera: Culicidae), a Malaria Vector in Thailand. **Journal of Medical Entomology**, v. 55, n. 1, p. 193–199, 10 jan. 2018.
- WHEELWRIGHT, M.; WHITTLE, C. R.; RIABININA, O. Olfactory systems across mosquito species. **Cell and Tissue Research**, v. 383, n. 1, p. 75–90, jan. 2021.

WORKMAN, M. J. et al. Yeast-encapsulated essential oils: a new perspective as an environmentally friendly larvicide. **Parasites & Vectors**, v. 13, n. 1, p. 19, 13 jan. 2020.

ZERMOGLIO, P. F. et al. What does heat tell a mosquito? Characterization of the orientation behaviour of *Aedes aegypti* towards heat sources. **Journal of Insect Physiology**, v. 100, p. 9–14, jul. 2017.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo *Aedes aegypti* (dengue, chikungunya e Zika), Semanas Epidemiológicas 1 a 8, 2021. **Boletim Epidemiológico 8**, v. 52, março. 2021.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo *Aedes aegypti* (dengue, chikungunya e Zika), Semanas Epidemiológicas 1 a 35, 2021. **Boletim Epidemiológico 32**, v. 52, setembro. 2021.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo *Aedes aegypti* (dengue, chikungunya e Zika), Semanas Epidemiológicas 1 a 46, 2020. **Boletim Epidemiológico 48**, v. 51, dezembro. 2020.

ACHEE, N. L. et al. Characterization of spatial repellent, contact irritant, and toxicant chemical actions of standard vector control compounds. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 25, n. 2, p. 156–167, jun. 2009.

ACHEE, N. L. et al. Spatial repellents: from discovery and development to evidence-based validation. **Malaria Journal**, v. 11, n. 1, p. 164, 14 maio 2012.

Calendário Nacional de Vacinação. Disponível em:
<<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/c/calendario-de-vacinacao>>.

Acesso em: 27 set. 2021.

CDC. **Insecticide Resistance** | CDC. Disponível em:

<<https://www.cdc.gov/mosquitoes/mosquito-control/professionals/cdc-bottle-bioassay.html>

>. Acesso em: 28 set. 2021.

CHOOMSANG, I. et al. Diurnal test periods influence behavioral responses of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) to repellents. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 21, n. 3, p. 971–983, 1 set. 2018.

COLUCCI, B.; MÜLLER, P. Evaluation of standard field and laboratory methods to compare protection times of the topical repellents PMD and DEET. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 12578, 22 ago. 2018.

DA SILVA RAMOS, R. et al. Chemical Composition and In Vitro Antioxidant, Cytotoxic, Antimicrobial, and Larvicidal Activities of the Essential Oil of *Mentha piperita* L. (Lamiaceae). **TheScientificWorldJournal**, v. 2017, p. 4927214, 2017.

DHIFI, W. et al. Essential Oils' Chemical Characterization and Investigation of Some Biological Activities: A Critical Review. **Medicines (Basel, Switzerland)**, v. 3, n. 4, p. E25, 22 set. 2016.

ERLER, F.; ULUG, I.; YALCINKAYA, B. Repellent activity of five essential oils against *Culex pipiens*. **Fitoterapia**, v. 77, n. 7–8, p. 491–494, dez. 2006.

ESTRADA, J. L. T. et al. Spatial repellency and other effects of transfluthrin and linalool on *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. **Journal of Vector Ecology: Journal of the Society for Vector Ecology**, v. 44, n. 1, p. 89–93, jun. 2019.

FIAZ, M. et al. Behavioral and ultrastructural effects of novaluron on *Aedes aegypti* larvae. **Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases**, v. 93, p. 104974, set. 2021.

GIATROPOULOS, A. et al. Evaluation of bioefficacy of three Citrus essential oils against the dengue vector *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in correlation to their components enantiomeric distribution. **Parasitology Research**, v. 111, n. 6, p. 2253–2263, dez. 2012.

GIATROPOULOS, A. et al. Chemical composition and assessment of larvicidal and repellent capacity of 14 Lamiaceae essential oils against *Aedes albopictus*. **Parasitology Research**, v. 117, n. 6, p. 1953–1964, jun. 2018.

GUEDES, D. R. et al. Zika virus replication in the mosquito *Culex quinquefasciatus* in Brazil. **Emerging Microbes & Infections**, v. 6, n. 8, p. e69, 9 ago. 2017.

HAMID-ADIAMOH, M. et al. Insecticide resistance in indoor and outdoor-resting *Anopheles gambiae* in Northern Ghana. **Malaria Journal**, v. 19, n. 1, p. 314, 31 ago. 2020.

KLUN, J. A.; KRAMER, M.; DEBBOUN, M. A new in vitro bioassay system for discovery of novel human-use mosquito repellents. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 21, n. 1, p. 64–70, mar. 2005.

MONATH, T. P. Yellow fever vaccine. **Expert Review of Vaccines**, v. 4, n. 4, p. 553–574, ago. 2005.

MONTAÑO-REYES, A. et al. Susceptibility and alterations by diflubenzuron in larvae of *Aedes aegypti*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, p. e21604, 22 jul. 2019.

PATTERSON, J.; SAMMON, M.; GARG, M. Dengue, Zika and Chikungunya: Emerging Arboviruses in the New World. **The Western Journal of Emergency Medicine**, v. 17, n. 6, p. 671–679, nov. 2016.

SANTOS, V. S. V.; PEREIRA, B. B. Properties, toxicity and current applications of the biolarvicide spinosad. **Journal of Toxicology and Environmental Health. Part B, Critical Reviews**, v. 23, n. 1, p. 13–26, 2020.

SOONWERA, M. Efficacy of essential oils from citrus plants against mosquito vectors *Aedes aegypti* (Linn.) and *Culex quinquefasciatus* (Say). **International Journal of Agricultural Technology**, v. 11, n. 3, p. 669–681, 2015.

TODEY, S. A.; FALLON, A. M.; ARNOLD, W. A. Neonicotinoid insecticide hydrolysis and photolysis: Rates and residual toxicity. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 37, n. 11, p. 2797–2809, nov. 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Efficacy-testing of traps for control of *Aedes* spp. mosquito vectors**. Geneva: World Health Organization, 2018. Disponível em: <<https://apps.who.int/iris/handle/10665/275801>>. Acesso em: 27 set. 2021.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Dengue - Instruções para Pessoal de Combate ao Vetor**. Ministério da Saúde, FUNASA, 2001. Disponível em: <https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/funasa/man_dengue.pdf>. Acesso em: 17 out. 2021.

BADAWY, M. E. I.; TAKTAK, N. E. M.; EL-ASWAD, A. F. Chemical composition of the essential oils isolated from peel of three citrus species and their mosquitocidal activity against *Culex pipiens*. **Natural Product Research**, v. 32, n. 23, p. 2829–2834, dez. 2018.

BHATTACHARYA, S.; BASU, P. The Southern House Mosquito, *Culex quinquefasciatus*: profile of a smart vector. p. 73–81, 1 jan. 2016.

FERRARIS, P.; YSSEL, H.; MISSÉ, D. Zika virus infection: an update. **Microbes and Infection**, v. 21, n. 8–9, p. 353–360, nov. 2019.

High-throughput screening (HTS). Disponível em: <<https://www.bmglabtech.com/pt/high-throughput-screening/>>. Acesso em: 10 nov. 2021.

HUANG, H.-T. et al. Phytochemical composition and larvicidal activity of essential oils from herbal plants. **Planta**, v. 250, n. 1, p. 59–68, jul. 2019.

SAMARASEKERA, R.; WEERASINGHE, I. S.; HEMALAL, K. P. Insecticidal activity of menthol derivatives against mosquitoes. **Pest Management Science**, v. 64, n. 3, p. 290–295, mar. 2008.

SONG, B.-H. et al. Zika virus: History, epidemiology, transmission, and clinical presentation. **Journal of Neuroimmunology**, v. 308, p. 50–64, 15 jul. 2017.

VAIRO, F. et al. Chikungunya: Epidemiology, Pathogenesis, Clinical Features, Management, and Prevention. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 33, n. 4, p. 1003–1025, dez. 2019.

VU, D. M.; JUNGKIND, D.; ANGELLE DESIREE LABEAUD, NULL. Chikungunya Virus. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 37, n. 2, p. 371–382, jun. 2017.

ENTZEROTH, M.; FLOTOW, H.; CONDRON, P. Overview of high-throughput screening. **Current Protocols in Pharmacology**, v. Chapter 9, p. Unit 9.4, mar. 2009.

GARCIA, G. A. et al. *Aedes aegypti* insecticide resistance underlies the success (and failure) of Wolbachia population replacement. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 63, 9 jan. 2020.

SILVÉRIO, M. R. S. et al. Plant Natural Products for the Control of *Aedes aegypti*: The Main Vector of Important Arboviruses. **Molecules**, v. 25, n. 15, p. 3484, jan. 2020.

Dengue worldwide overview. Disponível em: <<https://www.ecdc.europa.eu/en/dengue-monthly>>. Acesso em: 11 nov. 2021.