



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO



Óleos essenciais no controle das arboviroses dengue, zika e chikungunya por meio do desenvolvimento de inseticidas naturais para manejo do mosquito *Aedes aegypti*

Maíra Rosato Silveira Silvério

**Ribeirão Preto
2022**

MAÍRA ROSATO SILVEIRA SILVÉRIO

Óleos essenciais no controle das arboviroses dengue, zika e chikungunya por meio do desenvolvimento de inseticidas naturais para manejo do mosquito *Aedes aegypti*

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Doutora em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia.

Orientador(a): Prof. Dr. Noberto Peporine Lopes

Ribeirão Preto

2022

RESUMO

SILVÉRIO, M. R. S. **Óleos essenciais no controle das arboviroses dengue, zika e chikungunya por meio do desenvolvimento de inseticidas naturais para manejo do mosquito *Aedes aegypti***. 2022. 71f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

As arboviroses dengue, zika e chikungunya são doenças transmitidas pelo mosquito *Aedes aegypti*, as quais causam prejuízos a saúde de bebês, crianças e adultos, podendo levar à morte nos casos mais graves. A incidência mundial de dengue teve crescimento drástico nas últimas décadas e cerca de metade da população mundial está em risco de contrair a doença. O controle do vetor ainda é o principal meio de evitar a propagação da doença, visto que não existem vacinas e nem medicamentos específicos e eficazes para seus tratamentos. O uso de inseticidas naturais a base de extratos ou frações vegetais é uma importante alternativa ou mesmo uma ferramenta integrativa aos inseticidas químicos sintéticos. Esses ativos são mais facilmente degradados e menos prejudiciais ao meio ambiente, além de menos tóxico aos organismos não-alvo. Através da avaliação do efeito larvicida de diferentes óleos essenciais e seus metabólitos majoritários foram desenvolvidas formulações contendo como ativos estes materiais botânicos naturais. A formulação com melhor resultado larvicida no ensaio em copo (laboratório), ou seja, a que apresentou um efeito mais duradouro foi escolhida para preparo de lotes piloto em duas diferentes apresentações e conseqüente diferentes locais de aplicações. Esta formulação foi avaliada quanto a sua validade, por meio do estudo de estabilidade, a efetividade e eficácia larvicida através do ensaio em campo simulado e a sua toxicidade em organismo não-alvo, pelo ensaio FET, em embrião de *zebrafish*. Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que o produto contendo óleo essencial de orégano como ativo apresenta promissora aplicação integrativa ou alternativa segura e eficaz como produto desinfestante natural para manejo do principal vetor da dengue, o mosquito *Aedes aegypti*.

Palavras-chave: Dengue, *Aedes aegypti*, Óleos essenciais, Inseticida Natural, Orégano.

ABSTRACT

SILVÉRIO, M. R. S. **Essential oils in the control of dengue, zika and chikungunya arboviruses through the development of natural insecticides for the management of the *Aedes aegypti* mosquito.** 2022. 71f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

Dengue, zika and chikungunya arboviruses are diseases transmitted by *Aedes aegypti* mosquito, which damage the health of babies, children and adults and can cause death in serious cases. The worldwide incidence of dengue has grown dramatically in recent decades and about half of the world's population is at risk of contracting the disease. Vector control is still the main way of controlling these diseases, since there are no vaccines or specific and effective drugs for their treatments. The use of natural plant-based insecticides is an important alternative or even an integrative tool to synthetic chemical insecticides, as they are degraded more easily and are less harmful to the environment, not to mention their lower toxicity to non-target insects. Through the evaluation of the larvicidal effect of different essential oils and their major metabolites, formulations were developed containing these natural botanical materials as actives. The formulation with the better larvicidal result (phase I, laboratory studies) was chosen for the preparation of pilot batches in two different presentations and consequently different application sites. The validity of this formulation was determined through the stability study, the effectiveness and larvicidal efficacy through the simulated field test and its toxicity in a non-target organism, by FET test, in *zebrafish* embryo. The results obtained in this study suggest that the product containing oregano essential oil as active has a promising and safe alternative or integrative application as a natural disinfectant product for the management of the main vector of dengue, the *Aedes aegypti* mosquito.

Keywords: Dengue, *Aedes aegypti*, Essential oils, Natural Insecticide, Oregano.

1. INTRODUÇÃO

O mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) é um inseto distribuído por todo o mundo, especialmente nas regiões tropicais e subtropicais (KRAEMER et al., 2015), sendo o Egito seu país de origem. Foi introduzido no Brasil durante o período colonial, na época do tráfico de escravos (CONSOLI, 1994). Este inseto é considerado o principal vetor das arboviroses dengue, zika e chikungunya (BENELLI; MEHLHORN, 2016), conforme ilustrado na Figura 1.

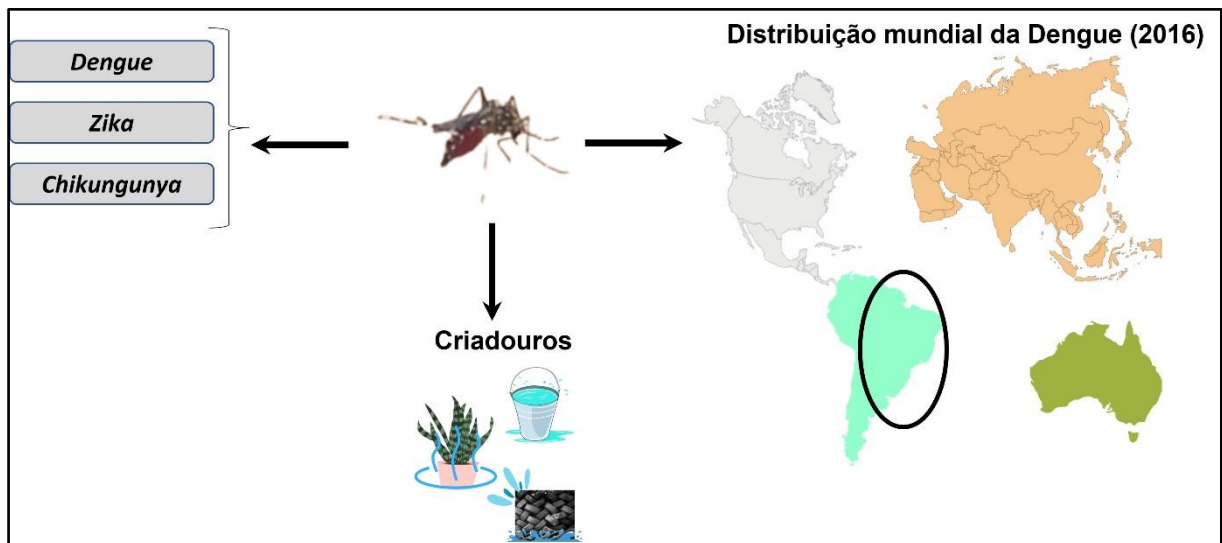


Figura 1. Mosquito *Aedes aegypti*: distribuição, criadouros e principais doenças transmitidas.

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), 390 milhões de pessoas são infectadas anualmente pelo vírus da dengue, sendo 96 milhões com manifestações clínicas (BHATT et al., 2013). Não existe tratamento específico para a dengue e os casos mais complicados da doença podem causar hemorragias e até a morte (WHO, 2020). Um estudo estimou que em 2080 cerca de 60% da população mundial estará em risco de dengue, ou seja, mais de 6,1 (4,7 – 6,9) bilhões de pessoas (MESSINA et al., 2019)

O Zika vírus pode ser também transmitido de pessoa para pessoa, via sexual ou transfusão (COUNOTTE et al., 2018). Os sintomas da doença zika são não específicos e autolimitados, sendo facilmente confundidos com outras doenças, como dengue e chikungunya. Recebem destaque as complicações da doença, que são a microcefalia em fetos e síndrome de Guillan Barré (MÉNDEZ et al., 2017). O vírus já foi relatado em países das Américas, Europa, Ásia e da região Pacífica (WHO, 2020).

Assim como a dengue e zika, a doença chikungunya não tem tratamento específico (CUNHA; TRINTA, 2017). A doença atinge principalmente a África, Ásia e o subcontinente indiano, e com um grande surto em 2015 atingiu diversos países das Américas. Atualmente, o Brasil representa mais de 90% dos casos da doença no continente americano (WHO, 2021).

O controle de mosquitos da família Culicidae, dentre eles o *Ae. aegypti*, é considerado a principal ferramenta no combate a diversas doenças em todo o mundo (GERIS et al., 2012). O *Ae. aegypti* apresenta ciclo de vida completo (Fig. 2) e existem várias técnicas já utilizadas para o combate ao mosquito, as quais atuam tanto nas fases imaturas do inseto (ovo, larva e pupa), quanto na forma adulta (mosquito propriamente dito) (BENELLI, 2015).

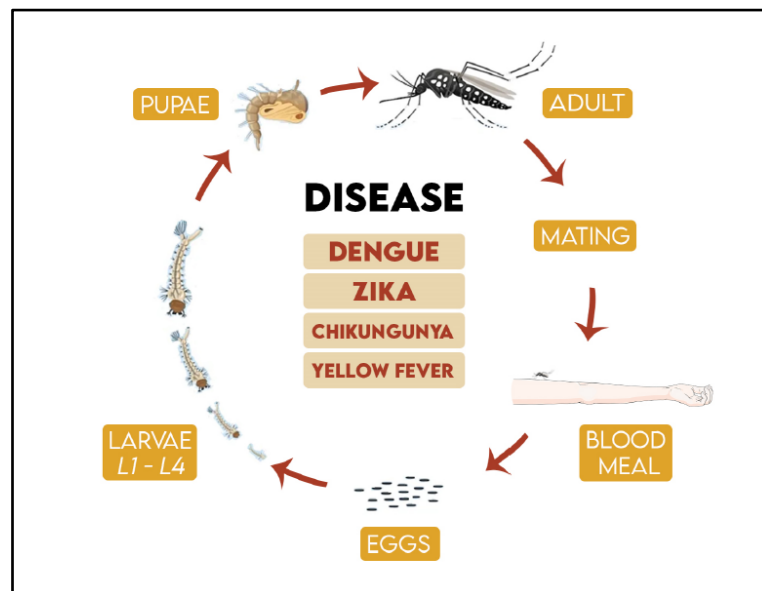


Figura 2. Ciclo de vida do mosquito *Ae. aegypti*, retirada do artigo *Molecules* 2020, 25, 3484, com autorização dos autores.

Os principais criadouros dos mosquitos são os locais que apresentam água parada, tanto os de origem natural, como bromélias, folhas secas e cascas de árvores, quanto recipientes artificiais, como caixas d'água, vasos de flores, pneus, dentre outros (GETACHEW et al., 2015), conforme ilustrado na Figura 1. O controle da forma imatura do mosquito recebe destaque, especialmente a fase larval, pois a quantidade de inseto em um mesmo local (criadouro) normalmente é grande, além de ser um estágio bastante suscetível ao efeito tóxico das substâncias químicas. Este controle é denominado tratamento focal, pois as larvas são focos de infestação (FUNASA, 2001).

Em relação ao Brasil, o combate do *Ae. aegypti* pelo Ministério da Saúde (MS), é realizado através dos controles biológico, mecânico ou ambiental e químico. O controle biológico utiliza *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) nos habitats das larvas ou peixes, como *Gambusia affinis*, que comem as larvas do mosquito e o mecânico ou ambiental é realizado através da eliminação dos criadouros e uso de telas nas janelas. O mais utilizado é o químico, cuja aplicação se dá em larvas (como o piriprofixeno e temefós) e no mosquito adulto (principalmente o malation) (FUNASA, 2001).

O organofosforado malation é aplicado espacialmente, sendo popularmente conhecido como fumacê. Embora seja também tóxico para diversos animais, potencialmente cancerígeno para humanos (IARC, 2017) e com eficácia limitada para combate do mosquito (IOC/FIOCRUZ, 2016), este inseticida é a única opção viável para combate do mosquito adulto no Brasil, se levado em consideração a resistência do inseto aos piretróides (IOC/FIOCRUZ, 2011).

O piriproxifeno é um análogo do hormônio juvenil autorizado pela OMS para uso em água potável e é considerado com baixa toxicidade para mamíferos, desde que sua concentração não seja maior do que 0,01 mg/L (WHO, 2004). Entretanto, um estudo demonstrou que este inseticida promoveu um menor ganho de peso em camundongos machos, além de danos nos testículos (dose de 1200 mg/Kg), podendo desta maneira, potencialmente interferir na espermatogênese (SHARID et al., 2019). Além disso, este inseticida apresenta persistência ambiental em condições anaeróbicas e toxicidade a animais invertebrados aquáticos (SULLIVAN; GOH, 2008).

O temefós é outro ativo bastante utilizado como larvicida pelo Ministério da Saúde (MS) no Brasil, com moderada toxicidade para mamíferos (concentração máxima permitida na água potável de 1 mg/L) (WHO, 2009). Ainda, apresenta leve a moderada toxicidade para peixes, alta a muito alta toxicidade para organismos aquáticos invertebrados (EPA, 2020).

No Brasil o combate ao *Ae. aegypti* também é feito por instituições privadas, como a Oxitec® (OXITEC, 2021) e organizações não governamentais, sem fins lucrativos, como World Mosquito Program (WMP, 2021). A Oxitec® tem o programa Aedes do Bem™, o qual utiliza a técnica de RIDL (do inglês *Release Insect with Dominant Lethal gene*) que causa modificações genéticas no mosquito macho, tornando-o estéril (ALPHEY et al., 2013), enquanto o WMP utiliza o Método *Wolbachia*, no qual o mosquito é infectado em laboratório com a bactéria e depois

liberado na natureza, interferindo na reprodução do inseto (BENELLI; JEFFRIES; WALKER, 2016).

A Figura 3 demonstra um resumo das técnicas e métodos de controles biológico e químico utilizados no Brasil.



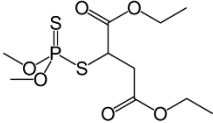

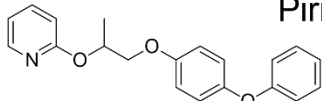
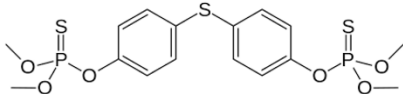
Controle Biológico	Alvo	Controle Químico	
<ul style="list-style-type: none"> ✓ técnica de RIDL ✓ Método <i>Wolbachia</i> 			Malation
<ul style="list-style-type: none"> ✓ <i>Bti</i> 		 	Piriproxifeno Temefós

Figura 3. Resumo do controle do *Ae. aegypti* aplicado no Brasil

No ano de 2016 cerca de 805 milhões de reais foram destinados para tratamento das doenças provocadas pelo mosquito, incluindo gastos médicos diretos e custos indiretos e cerca de 1,5 bilhões para combate ao vetor, totalizando 2,3 bilhões de reais, ou seja, 2% do orçamento previsto para a saúde naquele ano. Ainda em 2016 foram registrados mais de 2 milhões de casos de doenças relacionadas ao *Ae. aegypti* (TEICH; ARINELLI; FAHHAM, 2018). No ano de 2020 foram registrados 763.094 casos confirmados de dengue no país, sendo Paraná e São Paulo estados afetados, conforme ilustrado na Figura 4. Em relação a doença chikungunya foram 17.698 casos confirmados por critério laboratorial e 21.763 casos confirmados por critério clínico-epidemiológico. Para zika há apenas o número de casos prováveis (7.459). Estes dados foram retirados da plataforma integrada de vigilância em saúde (IVIS) do Ministério da Saúde. (IVIS/MS, 2022). Estes dados podem estar subestimados pelo atraso ou subnotificação destas doenças devido a mobilização das equipes epidemiológicas para enfrentamento da pandemia do coronavírus (covid-19)

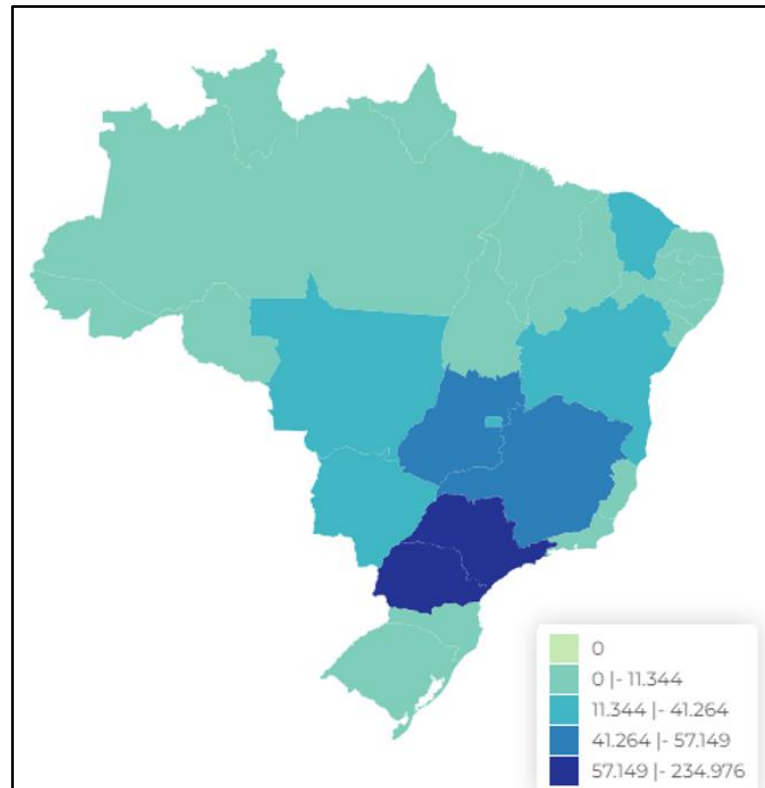


Figura 4. Número confirmado de casos de dengue, Brasil 2020, retirado da plataforma IVIS/MS (<http://plataforma.saude.gov.br/cidades/>)

Os inseticidas sintéticos causam prejuízos à saúde dos seres humanos, animais e ao meio ambiente, como (i) envenenamento, conferindo mais de 250.000 mortes/anual; (ii) câncer, devido a mecanismos não-genotóxicos (promoção, proliferação peroxissomal e desbalanço hormonal) e processo carcinogênico; (iii) efeitos danosos nos sistemas nervoso, renal, respiratório e reprodutivo e (iv) indução de estresse oxidativo (PAVELA, 2016a). Além da elevada toxicidade dos inseticidas químicos sintéticos, a resistência do mosquito *Ae. aegypti* a estes inseticidas (IOC/FIOCRUZ, 2011) e aos enormes gastos do governo devido às doenças ocasionadas por este mosquito (TEICH; ARINELLI; FAHHAM, 2018), torna-se necessária, para não dizer urgente, a busca de métodos integrativos e alternativos, que sejam eficazes e aplicáveis em grandes escalas para controle e combate do mosquito.

Desta maneira, as espécies vegetais mostram ser uma importante fonte integrativa e/ou alternativa de inseticidas botânicos devido à (i) enorme biodiversidade encontradas no mundo, estimadas em cerca de 400.000 espécies terrestres (LUGHADHA et al., 2016), (ii) cerca de 100.000 metabólitos secundários estimados, cujo centenas ou mais apresentam alguma atividade contra insetos (ISMAN, 2007) e

(iii) degradação facilitada pelos microrganismos pelo reconhecimento da homologia na natureza (PAVELA, 2016a).

A busca por produtos de origem natural para combate ao mosquito *Ae. aegypti* é antiga, com trabalhos publicados desde a década de 1980 (ZEBITZ, 1986; SHARMA, 1981). As vantagens dos inseticidas naturais são: (i) segurança ambiental; (ii) em geral (mas não regra), apresentam baixa toxicidade a organismos não-alvos, dentre eles animais homeotérmicos; (iii) resíduos destes inseticidas serem facilmente degradados por mecanismos naturais e (iv) a mistura sinérgica dos ativos presentes no extrato apresentarem vários mecanismos de ação e, portanto, menos resistência das pragas (ISMAN; MIRESMAILLI; MACHIAL, 2011; PAVELA, 2016a)

Extratos botânicos e seus metabólitos secundários demonstram ter importante ação inseticida sobre o mosquito *Ae. aegypti*, especialmente na fase larval, com destaque para os óleos essenciais, terpenos, fenilpropanoides, tiofenos, alcaloides e amidas (SILVÉRIO et al., 2020).

Dentre os extratos vegetais, os óleos essenciais apresentam algumas vantagens importantes: (i) bons rendimentos de extração; (ii) extratos concentrados em metabólitos secundários, conferindo possível efeito sinérgico ao material; (iii) relativamente não-tóxicos para mamíferos, com dose letal 50% (DL₅₀) em roedores entre 800 e 3.000 mg/Kg para compostos puros e maior do que 5.000 mg/Kg para produtos formulados e (iv) apresentam volatilidade, e portanto, não persistência no mês ambiente (ISMAN, 2000; PAVELA, 2015). Mas a principal vantagem se deve ao fato de serem cientificamente reconhecidos como importante meio para o controle de vetores (ECHEVERRÍA; ALBUQUERQUE, 2019; SILVÉRIO et al., 2020; SILVA et al., 2022; PILON et al., 2022) além de muitos já serem utilizados como produtos inseticidas, aprovados por agências reguladoras internacionais, como a EPA e EFSA (ISMAN, 2020).

A propriedade volátil dos óleos essenciais e seus metabólitos secundários pode ser considerada uma desvantagem para desenvolvimento de um produto inseticida, assim como a baixa solubilidade em água. Todavia estas limitações podem ser superadas utilizando ferramentas da tecnologia farmacêutica como a micro e nanoencapsulação, sem perder o efeito bioativo contra o mosquito (ISMAN; MIRESMAILLI; MACHIAL, 2011; PAVELA, 2016b; ECHEVERRÍA; ALBUQUERQUE, 2019). Portanto, o desenvolvimento de uma formulação adequada, capaz de garantir a estabilidade e liberação controlada do ativo no ambiente, é uma estratégia

imprescindível a ser aplicada no desenvolvimento destes inseticidas naturais (SILVÉRIO et al., 2020).

Considerando as recentes e recorrentes epidemias de dengue, zika e chikungunya em várias regiões do Brasil (SVS/MS, 2022) e a resistência do mosquito *Ae. aegypti* brasileiro a maioria dos inseticidas químicos sintéticos utilizados pelo MS (IOC/FIOCRUZ, 2011), o governo brasileiro está investindo em pesquisa para controle do mosquito. Este projeto se chama *ArboControl Brasil. Arbovírus dengue, zika e chikungunya compartilham o mesmo inseto vetor: o mosquito Aedes aegypti - moléculas do Brasil e do mundo para o controle, novas tecnologias em saúde e gestão da informação, educação e comunicação.*

Este projeto é financiado pelo Ministério da Saúde e coordenado por pesquisadores da Universidade de Brasília (UnB). Nosso grupo, o Núcleo em Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticos (NPPNS) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP), colabora dentro dos objetivos previstos no componente 1, ou seja, na prospecção de substâncias comerciais e da biodiversidade do Brasil e do mundo para desenvolvimento de produtos ovicida, larvicida, pupicida e adulticida.

Sendo a residualidade um fator importante e objetivo de estudo do projeto ArboControl, a utilização da tecnologia farmacêutica para aumentar o tempo de efeito inseticida é fundamental, especialmente para materiais voláteis e, portanto, não persistentes no local de aplicação, como o caso dos óleos essenciais e seus metabólitos secundários. Desta maneira, para prolongar o período de eficácia larvicida, diferentes técnicas de formulações podem ser utilizadas, como encapsulamento, biosíntese de nanopartículas “verdes”, uso de matriz de liberação prolongada, dentre outros (PAVELA, 2016b; OLIVEIRA; CAMPOS; FRACETO, 2018).

Assim optamos pelo preparo de formulações sólidas (tabletes) pela possibilidade de liberação prolongada do ativo, aumentando o tempo de ação larvicida, além da praticidade e facilidade de transporte, quando comparadas com outras formas, como a líquida (FERREIRA et al., 2019; OLIVEIRA; CAMPOS; FRACETO, 2018).

Para isto, selecionamos uma matriz polimérica hidrofílica derivada de celulose que apresenta como vantagens: simplicidade, facilidade de fabricação (mistura física, com princípio de adsorção), alto nível de reprodutibilidade e natureza não-tóxica (HUICHAO et al., 2014; BURDOCK, 2007). Além disso, para manipulação não é necessária nenhuma condição especial de preparo, como agitação vigorosa e

aquecimento, requeridos para outras técnicas, como a encapsulação, e nem etapa prévia de granulação.

Os produtos de liberação controlada são projetados para manter uma concentração constante do ativo por um período prolongado. Matriz é definida como um composto bem misturado de um ou mais ativos com um agente gelificante, neste caso um polímero hidrofílico (LI et al., 2005). Para o nosso estudo selecionamos o hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) K100, um polímero hidrofílico que possui baixo custo relativo. Este polímero apresenta uma característica muito interessante de intumescimento/relaxamento, interferindo diretamente na liberação do ativo incorporado para o meio, no caso, a água (LOPES; LOBO; COSTA, 2005).

Para aplicação como um produto inseticida é necessário realizar ensaios de toxicidade em organismos não-alvo, ou seja, avaliar possíveis efeitos tóxicos em outros organismos. No Brasil a classificação pela ANVISA deste produto é de um saneante tipo 2 ou desinfestante (ANVISA, RDC 59, 2010).

O organismo *zebrafish* é um modelo bastante seguro e utilizado para avaliação da toxicidade em organismos não-alvo, pois além de servir como alternativa ao uso de roedores, também fornece informações complementares (CHOI et al., 2021). Ainda, o organismo *zebrafish* apresenta 70% de homologia com os genes humanos, superior ao da drosófila, portanto mais próximos dos seres humanos do ponto de vista evolutivo (HOWE et al., 2013), por esses motivos foi o modelo escolhido para estudo de toxicidade não-alvo (subletal e letal) deste trabalho.

Em 2013, foi lançado um protocolo de testes embriotoxicológicos agudos com o peixe-zebra – FishEmbryoToxicity FET test (OECD n.236, 2013). O princípio do teste é baseado na utilização de ovos fertilizados expostos a uma substância química e as definições de períodos embriogênicos servem de base para testes de embriotoxicidade (LAMMER, 2015).

Após definido a melhor formulação em termos farmacotécnicos e biológicos, é necessário verificar a estabilidade do produto, ou seja, o prazo de validade. Para isso é realizado o estudo de estabilidade, o qual é obrigatório para o registro e essencial para desenvolvimento de um produto (THOMAS, 2020). Desta maneira, com o intuito de obter o máximo possível de informações para fornecer ao Ministério da Saúde acerca da formulação final desenvolvida neste projeto de pesquisa, para finalizar o trabalho, o estudo de estabilidade foi conduzido de acordo com a legislação brasileira vigente (RDC 59, 2010 – ANVISA).

Neste trabalho foram avaliados óleos essenciais comerciais, de diferentes espécies vegetais, e seus metabólitos secundários majoritários para ação inseticida contra o mosquito *Ae. aegypti*, com enfoque na atividade larvicida. As espécies comestíveis ganham destaque por possivelmente apresentarem menor toxicidade aos humanos, dentre elas podemos citar o funcho [*Foeniculum vulgare* Mill. (Apiaceae)], o orégano [*Thymus capitatus* (L.) Hoffmanns. & Link (Lamiaceae)], manjerição [*Ocimum basilicum* L. (Lamiaceae)], laranja doce [*Citrus aurantium dulcis* Hayne (Rutaceae)] e cravo-da-índia [*Syzygium aromaticum* (L.) Merrill & Perry (Myrtaceae)]. Outras espécies, como patchouly [*Pogostemon cablin* (Blanco) Benth. (Lamiaceae)] e litsea cubeba [*Litsea cubeba* (Lour.) Pers. (Lauraceae)] embora não comestíveis também foram avaliadas quanto a atividade larvicida. As espécies vegetais de alguns óleos essenciais adquiridos para avaliação neste estudo estão ilustradas na Figura 5.

Os materiais que apresentaram melhores resultados foram selecionados para preparo de formulações inseticidas para aplicação no combate do mosquito *Ae. aegypti* e, conseqüentemente, no controle das arboviroses dengue, Zika e chikungunya.



Figura 5. Ilustração de algumas espécies vegetais dos óleos essenciais utilizados neste trabalho de doutorado: anis estrelado, capim limão, citronela, cravo, eucalipto citriodora, funcho, grapefruit, laranja doce, limão siciliano, litsea cubeba, manjerição, orégano e patchouly.

5. CONCLUSÕES

O trabalho desenvolvido nesta pesquisa de doutorado, em parceria com UnB e financiado pelo Ministério da Saúde, foi uma importante colaboração para o projeto ArboControl (componente 1) e os resultados obtidos são promissores para desenvolvimento de mais formulações com ativos naturais para aplicação como inseticidas no controle do mosquito *Aedes aegypti*.

Diversos óleos essenciais e seus metabólitos secundários majoritários demonstraram potencial aplicação como produtos larvicidas naturais contra o mosquito *Ae. aegypti*, sendo que 10 óleos essenciais (orégano, funcho, anis estrelado, laranja doce, *grapefruit*, limão siciliano, patchouly, litsea cubeba, manjerição e citronela) e 05 metabólitos secundários (*trans*-anetol, D-limoneno, carvacrol, estragol e citral) foram muito ativos.

Já para a atividade adulticida apenas 04 óleos essenciais (palmarosa, cravo, patchouly e eucalipto *staigeriana*) mostraram resultados satisfatórios, sendo necessário mais estudos para confirmar esta aplicabilidade no controle do mosquito.

Dentre as 05 formulações desenvolvidas, a que continha óleo essencial de orégano como ativo foi a que apresentou um efeito larvicida mais prolongado quando avaliada em fase I – laboratório. Desta maneira, foi a escolhida para produção em larga escala (6600 tabletes e 175 saches de pó) e, conseqüentemente estudo de estabilidade e entrega ao Ministério da Saúde para atender o objetivo do projeto ArboControl de um produto larvicida.

Esta formulação, nomeada como F1-O_4, foi desenvolvida com matérias-primas comumente utilizados pela indústria farmacêutica para produção de comprimidos e, portanto, seguras para aplicação desejada e preparada em 2 apresentações (tablete e pó) para aplicação em recipientes de diferentes tamanhos, aumentando a funcionalidade deste produto inseticida natural.

O método analítico para quantificação do ativo carvacrol foi validado e mostrou-se adequado para controle de qualidade da formulação. Através do estudo de estabilidade foi possível verificar a validade mínima de 6 meses em temperatura ambiente, o que é de grande importância para um produto cujo ativo é um material volátil, pois dispensa o armazenamento em baixas temperaturas, reduzindo custos de um modo geral.

Em campo simulado, a formulação apresentou efeito larvicida prolongado (30 dias) para apresentação tablete e rápida ação (100% de mortalidade em 2 horas) para a apresentação pó, o que é extremamente desejável pelo Ministério da Saúde,

pois o inseticida ideal para controle do *Ae. aegypti* no Brasil deve ter efeito imediato e prolongado.

Estudos de toxicidade em organismo não-alvo em embrião de *zebrafish* sugere que esta formulação apresenta importante alternativa ou mesmo uma ferramenta integrativa para controle do mosquito da dengue, pois mostrou baixa toxicidade a este organismo, além de ser menos tóxico do que o piriproxifeno, larvicida utilizado atualmente pelo Ministério da Saúde.

Portanto, por meio da incorporação do óleo essencial de orégano, um material botânico ativo, em formulação sólida adequada, foi possível obter um produto inseticida natural, seguro, barato, de simples preparo, eficaz e de ampla funcionalidade para auxiliar no manejo do mosquito *Aedes aegypti*.

Ainda são necessários mais estudos previstos em legislação para aplicação comercial como um desinfestante, entretanto os dados obtidos até o momento contêm informações relevantes que reduzirão o trabalho e tempo de produção e registro deste possível produto natural.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

Este trabalho de doutorado abre caminhos para o desenvolvimento de mais formulações contendo óleos essenciais e/ou seus componentes majoritários como ativos para aplicação inseticida, não apenas para controle do *Aedes aegypti*, mas de outros importantes insetos vetores de doenças, como o *Aedes albopictus* e *Culex quinquefasciatus*.

Em relação a formulação nomeada como F1_O-4, pode ser continuado o estudo de estabilidade, para verificar um maior prazo de validade e melhorias na formulação, como revestir o tablete ou diluir os materiais voláteis em óleos vegetais antes de incorporar na matriz polimérica, para prolongar a vida útil do produto e, possivelmente, também o efeito larvicida.

Estudar a aplicabilidade desta formulação em outros insetos, como o *Aedes albopictus* transmissor da dengue, zika e chikungunya e *Culex quinquefasciatus* transmissor da filariose.

A formulação desenvolvida permite a incorporação de diversos outros óleos essenciais e mesmo os seus metabólitos secundários isolados e ainda outros materiais que possam ser ativos, como aqueles oriundos de extratos vegetais ou

microrganismos. Desta forma, é uma formulação versátil e que pode ser amplamente explorada para este fim.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALPHEY, L. *et al.* Genetic control of *Aedes* mosquitoes. **Pathog. Glob. Heal.** Londres, v. 107, n. 4, p. 170 – 179, abr. 2013. DOI:10.1179/2047773213Y.0000000095.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RESOLUÇÃO-RDC Nº 59, DE 17 DE DEZEMBRO DE 2010:** Dispõe sobre os procedimentos e requisitos técnicos para a notificação e o registro de produtos saneantes e dá outras providências: Brasília: RDC 59, 2010. 16 p.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RESOLUÇÃO- RDC Nº 166, DE 24 DE JULHO DE 2017:** Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências: Brasília: RDC 166, 2017. 21 p.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **PORTARIA GM/MS Nº 888, DE 4 DE MAIO DE 2021:** Altera o Anexo XX da Portaria de Consolidação GM/MS nº 5, de 28 de setembro de 2017, para dispor sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade: Brasília: PORTARIA GM/MS 888, 2021. 29 p

AMMANN, C. Stability studies needed to define the handling and transport conditions of sensitive pharmaceutical or biotechnological products. **AAPS PharmSciTech.** v.12, n. 4, p. 1264–1275, dez. 2011. DOI:10.1208/s12249-011-9684-0.

ARAUJO, A. F. O. *et al.* Larvicidal activity of *Syzygium aromaticum* (L.) Merr and *Citrus sinensis* (L.) Osbeck essential oils and their antagonistic effects with temephos in resistant populations of *Aedes aegypti*. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** Rio de Janeiro, v. 111, n. 7, p. 443 – 449, jul. 2016.

BEEK, T. A.; JOULAIN, D. The essential oil of patchouli, *Pogostemon cablin*: A review. **Flavour Fragr J.** Reino Unido, v. 33, p. 6 – 51, ago. 2017. DOI: 10.1002/ffj.34186.

BENELLI, G. Research in mosquito control: Current challenges for a brighter future. **Parasitol. Res.**, Berlim, v. 114, p. 2801 – 2805, jun. 2015, DOI 10.1007/s00436-015-4586-9.

BENELLI, G.; JEFFRIES, C.L.; WALKER, T. Biological control of mosquito vectors: past, present, and future. **Insects.** Basel, v. 7, n. 4, p. 52 – 70, out. 2016, DOI:10.3390/insects7040052.

BENELLI, G.; MEHLHORN, H. Declining malaria, rising of dengue and Zika virus: Insights for mosquito vector control. **Parasitol. Res.**, Berlim, v. 115, p. 1747–1754, mar. 2016. DOI:10.1007/s00436-016-4971-z.

BHATT, S.; *et al.* The global distribution and burden of dengue. **Nature**, Londres, v. 496, p. 504 – 507, abr. 2013. DOI:10.1038/nature12060.

BOTAS, G. S. *et al.* *Baccharis reticularia* DC. and limonene nanoemulsions: promising larvicidal agents for *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) control. **Molecules**. Basel, v. 22, p. 1990 – 2004, nov. 2017. DOI:10.3390/molecules22111990.

BURDOCK, G. A. Safety assessment of hydroxypropyl methylcellulose as a food ingredient. **Food Chem Toxicol**. Inglaterra, v. 45, p. 2341–2351, jul. 2007. DOI: 10.1016/j.fct.2007.07.011.

CDC – Centers for Disease Control and Prevention. **Guideline for Evaluating Insecticide Resistance in Vectors Using the CDC Bottle Bioassay**. Estados Unidos: CDC, 2021. 28 p.

CHANTRAINE, J-M. *et al.* Insecticidal activity of essential oils on *Aedes aegypti* larvae. **Phytother Res**. Reino Unido, v. 12, p. 350 – 354, mar. 1998.

CHOI, T.Y. *et al.* Zebrafish as an animal model for biomedical research. **Exp Mol Med**. Coréia do Sul, v. 53, p. 310–317, mar. 2021. DOI: 10.1038/s12276-021-00571-5.

CONSOLI, R.A.G.B.; OLIVEIRA, R.L. **Principais Mosquitos de Importância Sanitária no Brasil**. 1. ed. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1994. 115–117 p.

CUNHA, R. V.; TRINTA, K. S. Chikungunya virus: clinical aspects and treatment - A Review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 112, n. 8, p. 523 – 531, aug. 2017.

COUNOTTE, M.J. *et al.* Sexual transmission of Zika virus and other flaviviruses: A living systematic review. **PLoS Med.**, California, v. 15, n. 7, p. e1002611, jul. 2018. DOI: 10.1371/journal.pmed.1002611.

DHINAKARAN, S. R.; MATHEW, N.; MUNUSAMY, S. Synergistic terpene combinations as larvicides against the dengue vector *Aedes aegypti* Linn. **Drug Dev. Res**. Estados Unidos, v. 80, n. 6, p. 791 – 799, jun. 2019. DOI: 10.1002/ddr.21560.

ECHEVERRÍA, J.; ALBUQUERQUE, R.D.D.G.d. Nanoemulsions of essential oils: new tool for control of vector-borne diseases and in vitro effects on some parasitic agents. **Medicines**. v. 6, n. 42, p. 1 – 11, mar. 2019 <https://doi.org/10.3390/medicines6020042>.

EPA – Environmental Protection Agency. **Pesticides reregistration temephos**. Estados Unidos, EPA 2020. Disponível em: https://archive.epa.gov/pesticides/reregistration/web/html/temephos_red.html#IVB2. Acesso em 15 dez. 2020.

FAYEMIWO, K. A. *et al.* Larvicidal efficacies and chemical composition of essential oils of *Pinus sylvestris* and *Syzygium aromaticum* against mosquitoes. **Asian Pac J**

Trop Biomed. China, v. 4, n. 1, p. 30 – 34, jan. 2014. DOI: 10.1016/S2221-1691(14)60204-5.

FERREIRA, T. P. *et al.* Prolonged mosquitocidal activity of *Siparuna guianensis* essential oil encapsulated in chitosan nanoparticles. **PLoS Negl Trop Dis.** v. 13, n. 8, p. e0007624, ago. 2019. DOI: 10.1371/journal.pntd.0007624.

FIOCRUZ – Fundação Osvaldo Cruz. **Vírus Zika: perguntas e respostas.** Disponível em: <https://portal.fiocruz.br/pergunta/como-e-o-ciclo-de-vida-do-mosquito-aedes-aegypti> Acesso em 21 jul. 2022.

FUNASA – Fundação Nacional da Saúde. **Controle de vetores. Procedimentos de segurança.** Brasília, DF: Ministério da Saúde, Fundação Nacional da Saúde, 2001. 204 p.

GERIS, R. *et al.* Bioactive natural products as potential candidates to control *Aedes aegypti*, the vector of dengue. *In Studies in natural products chemistry.* Amsterdam: Elsevier, 2012, cap. 10, p. 277–376.

GETACHEW, D. *et al.* Breeding sites of *Aedes aegypti*: potential dengue vectors in Dire Dawa, East Ethiopia. **Interdiscip Perspect Infect Dis.** Londres, v. 2015, p. 1 – 8, ago. 2015, DOI 10.1155/2015/706276.

HOWE, K. *et al.* The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. **Nature.** Londres, v. 496, p. 498–503, abr. 2013. DOI: 10.1038/nature12111.

HUICHAO W, *et al.* The application of biomedical polymer material hydroxyl propyl methyl cellulose (HPMC) in pharmaceutical preparations. **J. Chem. Pharm. Res., Índia,** v. 6, n. 5, 155 – 160, jan. 2014.

IARC – International Agency for Research in Cancer. **List of classification.** Lyon, França, IARC, 2017. Disponível em <https://monographs.iarc.who.int/list-of-classifications>. Acesso em 23 jan. 2021.

IOC/FIOCRUZ – Instituto Osvaldo Cruz/Fundação Osvaldo Cruz. **NOTA TÉCNICA N.º 4/2016/IOC-FIOCRUZ/DIRETORIA:** considerações técnicas sobre a aplicação aérea de inseticidas em área urbana. Rio de Janeiro: IOC/FIOCRUZ, 2016. 5 p.

IOC/FIOCRUZ – Instituto Osvaldo Cruz/Fundação Osvaldo Cruz. **NOTA TÉCNICA N.º 2/2011/IOC-FIOCRUZ/DIRETORIA:** Recomendação técnica sobre a interrupção do uso de inseticidas piretróides no controle do *Aedes aegypti* no Brasil. Rio de Janeiro: IOC/FIOCRUZ, 2011. 4 p.

ISMAN, M.B. Bioinsecticides based on plant essential oils: a short overview. **Z Naturforsch C J Biosci,** Berlim, v. 75, n. 7-8, p. 179 – 182, abr. 2020. <https://doi.org/10.1515/znc-2020-0038>.

ISMAN, M.B. Bridging the gap: moving botanical insecticides from the laboratory to the farm. **Ind. Crops Prod.** Holanda, v. 110, p. 10 – 14, jul. 2017. DOI:10.1016/j.indcrop.2017.07.012.

ISMAN, M.B. Plant essential oils for pest and disease management. **Crop Prot.**, Reino Unido, v. 19, p. 603 – 608, 2000.

ISMAN, M.B.; MIRESMAILLI, S.; MACHIAL, C. Commercial opportunities for pesticides based on plant essential oils in agriculture, industry and consumer products. **Phytochem. Rev.**, Holanda, v. 10, p. 197 – 204, mar. 2011. DOI 10.1007/s11101-010-9170-4.

IVIS/MS – Plataforma integrada de vigilância em saúde / Ministério da Saúde. Vigilância em Saúde – Cidades, Brasil, 2022. Disponível em: <http://plataforma.saude.gov.br/cidades/> . Acesso em 28 jun. 2022

KRAEMER, M.U.F. *et al.* The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. **eLife**, Cambridge, v. 4, p. e08347, jun. 2015. DOI:10.7554/elife.08347.

KIMMEL C, B., *et al.* Stages of embryonic development of the zebrafish. **Dev Dyn.** Estados Unidos, v. 203, n. 3, p.:253-310, jul 1995. DOI:10.1002/aja.1002030302,.

LAMMER, E., *et al.* Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test? **Comp. Biochem. Physiol. Part - C: Toxicol. Pharmacol.**, Estados Unidos, v. 149, n. 2, p. 196–209, mar. 2009. DOI: 10.1016/j.cbpc.2008.11.006.

LI, C. L. *et al.* The use of hypromellose in oral drug delivery. **J Pharm Pharmacol.** Estados Unidos, v. 57, p. 533 – 546, jan. 2005. DOI 10.1211/0022357055957.

LOPES, C. M.; LOBO, J. M. S.; COSTA, P. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. **Braz. J. Pharm. Sci.** Brasil, v. 41, n. 2, p. 143 – 154, abr./jun. 2005.

LUGHADHA, E.N.; *et al.* Counting counts: revised estimates of numbers of accepted species of flowering plants, seed plants, vascular plants and land plants with a review of other recent estimates. **Phytotaxa.** Auckland, v. 272, n. 1, p. 82 – 88, ago. 2016. doi:10.11646/phytotaxa.272.1.5.

MAHARAJAN K. *et al.* Toxicity assessment of pyriproxyfen in vertebrate model zebrafish embryos (*Danio rerio*): A multi biomarker study. **Aquat Toxicol.** Holanda, v. 196, p. 132-145, mar. 2018.

MAIA. J. D. *et al.* Improved activity of thyme essential oil (*Thymus vulgaris*) against *Aedes aegypti* larvae using a biodegradable controlled release system. **Ind. Crops. Prod.**, v. 136, n. 15, p. 110–120, set. 2019. doi:10.1016/j.indcrop.2019.03.040.

MÉNDEZ, N. *et al.* Zika virus disease, microcephaly and Guillain-Barré syndrome in Colombia: epidemiological situation during 21 months of the Zika virus outbreak, 2015–2017. **Arch Public Health**, Reino Unido, v. 75, p. 65 – 76, nov. 2017. DOI 10.1186/s13690-017-0233-5.

MERAJUDDIN, K., *et al.* The composition of the essential oil and aqueous distillate of *Origanum vulgare* L. growing in Saudi Arabia and evaluation of their antibacterial activity. **Arab. J. Chem.**, Arábia Saudita, v. 11, n.8, p. 1189–1200, dez. 2018. DOI: 10.1016/j.arabjc.2018.02.008.

MESSINA, J. *et al.* The current and future global distribution and population at risk of dengue. **Nat. Microbiol.**, Londres, v. 4, p. 1508–1515, jun. 2019. DOI: 10.1038/s41564-019-0476-8.

OECD - The Organisation for Economic Co-operation and Development. **Test No. 236: OECD guidelines for the testing of chemicals: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test**, 2013, 22p. <https://doi.org/10.1787/9789264203709-en>

OLIVEIRA, J. L.; CAMPOS, E. V. R.; FRACETO, I. f. Recent developments and challenges for nanoscale formulation of botanical pesticides for use in sustainable agriculture. **J. Agric. Food Chem.** Washington, v. 66, p. 8898 – 8913, ago. 2018. DOI: 10.1021/acs.jafc.8b03183.

OXITEC – Oxitec do Brasil. **Tecnologia Aedes do Bem**. Campinas, OXITEC, 2021. Disponível em: <https://www.oxitec.com/br/noticias-main/nova-tecnologia-do-aedes-do-bem-da-oxitec-recebe-aprovao-completa-de-biossegurana-no-brasil>. Acesso em 04 jan. 2021.

PANDIYAN, G. N.; MATHEW, N.; MUNUSAMY, S. Larvicidal activity of selected essential oil in synergized combinations against *Aedes aegypti*. **Ecotoxicol Environ Saf.** Estados Unidos, v. 174, p. 545 – 556, jun. 2019. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2019.03.019.

PAVELA, R. History, presence and perspective of using plant extracts as commercial botanical insecticides and farm products for protection against insects — a review. **Plant Prot. Sci.** Praga 2, v. 52, n. 4, p. 229 – 241, 2016a. DOI: 10.17221/31/2016-PPS.

PAVELA, R. Encapsulation – a convenient way to extend the persistence of the effect of eco-friendly mosquito larvicides. **Curr. Org. Chem.**, Emirados Árabes, v. 20, n. 25, p. 2674 – 2680, 2016b. DOI: 10.2174/1385272820666151026231851.

PAVELA, R. Essential oils for the development of eco-friendly mosquito larvicides: a review. **Ind. Crops Prod.**, Holanda, v. 76, p. 174 – 187, jun. 2015. DOI:10.1016/j.indcrop.2015.06.050.

PILON, A.C.; DEL GRANDE, M.; SILVÉRIO, M.R.S.; SILVA, R.R.; ALBERNAZ, L.C.; VIEIRA, P.C.; LOPES, J.L.C.; ESPINDOLA, L.S.; LOPES, N.P. Combination of GC-MS molecular networking and larvicidal effect against *Aedes aegypti* for the discovery

of bioactive substances in commercial essential oils. **Molecules**, Basel, v. 27, p. 1588, fev. 2022. <https://doi.org/10.3390/molecules27051588>

POHLIT, A.M. *et al.* Patent literature on mosquito repelente inventions which contain plant essential oils—A review. **Planta Med.** Stuttgart, v. 77, n. 6, p. 598–617, abr. 2011. DOI:10.1055/s-0030-/1270723.

RÍOS, N; STASHENKO, E. E.; DUQUE, J. E. Evaluation of the insecticidal activity of essential oils and their mixtures against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Rev Bras Entomol.** Curitiba, v. 61, p. 307 – 377, out. 2017. DOI: 10.1016/j.rbe.2017.08.005.

ROCHA, D. K *et al.* Larvicidal activity against *Aedes aegypti* of *Foeniculum vulgare* essential oils from Portugal and Cape Verde. **Nat Prod Commun.** Ohio, v. 10, n. 4, p. 677 – 682, fev. 2015.

SANTOS, L. L. *et al.* Evaluation of the larvicidal potential of the essential oil Pogostemon cablin (Blanco) Benth in the control of *Aedes aegypti*. **Pharmaceuticals.** Basel, v. 12, p. 53 – 66, abr. 2019. DOI:10.3390/ph12020053.

SARMA, R. *et al.* Insecticidal activities of *Citrus aurantifolia* essential oil against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Toxicol. Rep.** Irlanda, v. 6, p. 1091 – 1096, out. 2019. DOI: 10.1016/j.toxrep.2019.10.009.

SAUDE/RS – Secretaria da Saúde – Rio Grande do Sul. **Dengue.** Disponível em <https://saude.rs.gov.br/dengue>. Acesso em 10 jun 2022.

SHAHID, A. *et al.* An investigation on some toxic effects of pyriproxyfen in adult male mice. **Iran J Basic Med Sci.** Mashhad, Iran, v. 22, p. 997 – 1003, mar. 2019. DOI 10.22038/ijbms.2019.33825.8051.

SHARMA, R.N. *et al.* Lavandula gibsonii: a plant with insectistatic potential. **Phytoparasitica.** v. 9, n. 2, p.101 – 109, fev. 1981. DOI: 10.1007/bf03158452.

SILVA, R.L.; MELLO, T.R.B.; SOUSA, J.P.B.; ALBERNAZ, L.C.; MAGALHÃES, N.M.G.; MORAIS, L.S.; FRANCISCO, L.R.; LEAL, W.S.; ESPINDOLA, L.S. Brazilian Cerrado biome essential oils to control the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*, **Ind. Crops Prod.**, Holanda, v.178, abr. 2022, p. 114568, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.114568>.

SILVÉRIO, M.R.S. *et al.* Plant natural products for the control of *Aedes aegypti*: the main vector of important arboviruses. **Molecules**, Basel, v. 25, p. 3484 – 3529, jul. 2020. DOI: 10.3390/molecules25153484.

SPARKMAN, D.O. Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy Robert P. Adams. **J Am Soc Mass Spectrom.** Estados Unidos, v. 16, n. 11, p. 1902 – 1903, nov 2005. DOI: 10.1016/j.jasms.2005.07.008.

STOILOVA, I. *et al.*, Chemical Composition, Olfactory Evaluation and Antioxidant Effects of an Essential Oil of *Origanum vulgare* L. from Bosnia. **Nat. Prod. Commun.** Estados Unidos. v. 3, n. 7, p. 1043 – 1046, jun. 2008

SULLIVAN, J. J.; GOH, K. S. Environmental fate and properties of pyriproxyfen. **J. Pestic. Sci.** Tóquio, v. 33, n. 4, p. 339 – 350, out. 2018. DOI: 10.1584/jpestics.R08-02.

TEICH, V.; ARINELLI, R.; FAHHAM, L. *Aedes aegypti* e sociedade: o impacto econômico das arboviroses no Brasil. **J. Bras. Econ.** São Paulo, v. 9, n. 3, p. 267-276, fev. 2018, DOI:10.21115/jbes.v9.n3.p267-76.

THOMAS, F. Stability testing: the crucial development step, **Pharm. Tech.** v. 44, n.3, p. 40–43, mar. 2020.

UNIYAL, A. *et al.* Larvicidal and oviposition deterrent activity of twenty three essential oils against *Aedes aegypti*. **Int J Mosq Res.** Índia, v. 3, n. 1, p. 14 – 21, dez. 2015.

VERA, S. S. *et al.* Essential oils with insecticidal activity against larvae of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Parasitol Res.** Berlim, v. 113, p. 2647 – 2654, abr. 2014. DOI 10.1007/s00436-014-3917-6.

ZEBITZ, C.P.W. Effects of three different neem seed kernel extracts and azadirachtin on larvae of different mosquito species. **J. Appl. Entomol.** Berlim, v. 102, p. 455 – 463, 1986, DOI: 10.1111/j.1439-0418.1986.tb00945.x.

WALIWITIYA, R.; KENNEDY, C. J.; LOWENBERGER, C. A. Larvicidal and oviposition-altering activity of monoterpenoids, *trans*-anethole and rosemary oil to the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Pest Manag Sci.** v. 65, p. 241 – 248, dez. 2008. DOI 10.1002/ps.1675.

WMP – World Mosquito Program. **Sobre o método Wolbachia.** Rio de Janeiro, WMP, 2021. Disponível em: <http://www.eliminatedengue.com/brasil>. Acesso em 06 jan. 2021.

WHO. World Health Organization. **Dengue Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control.** Disponível em:

https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44188/9789241547871_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y. Acesso em 12 Dezembro 2020.

WHO. World Health Organization. **Chikungunya.** Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chikungunya>. Acesso em 20 jan 2021.

WHO – World Health Organization. **Pyriproxyfen in drinking-water_Guidelines for drinking-water quality.** Genebra: WHO, 2004. 5 p.

WHO – World Health Organization. **Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides.** Geneva: WHO, 2005. 36 p.

WHO – World Health Organization. **Temephos in drinking-water: use for vector control in drinking-water sources and containers-water_Guidelines for drinking-water quality.** Geneva: WHO, 2009. 5 p.

ZAIRI, A. *et al.* Chemical composition, fatty acids profile and biological properties of *Thymus capitatus* (L.) Hoffmanns, essential oil. **Sci. Rep.** Londres, v. 9, p. 20134 – 20142, dez. 2019. DOI: 10.1038/s41598-019-56580-y.

