



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA

EDNA BARBOZA DE LIMA

TESTES DE REPELÊNCIA E DETERRÊNCIA DE OVIPOSIÇÃO EM *Aedes aegypti* L. (CULICIDAE, DIPTERA) COM ÓLEOS ESSENCIAIS DE ESPÉCIES NATIVAS DA REGIÃO NORDESTE DO BRASIL

Recife
2020

EDNA BARBOZA DE LIMA

TESTES DE REPELÊNCIA E DETERRÊNCIA DE OVIPOSIÇÃO EM *Aedes aegypti* L. (CULICIDAE, DIPTERA) COM ÓLEOS ESSENCIAIS DE ESPÉCIES NATIVAS DA REGIÃO NORDESTE DO BRASIL

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia em recursos naturais.

Orientadora: Prof^{fa}. Dr^a. Daniela Maria do Amaral Ferraz Navarro

Coorientador: Prof. Dr. Cláudio Augusto Gomes da Câmara

Recife

2020

Catálogo na fonte
Elaine C Barroso
(CRB4 1728)

Lima, Edna Barboza de

Testes de repelência e deterrência de oviposição em *Aedes aegypti* L. (Culicidae: Diptera) com óleos essenciais de espécies nativas da região Nordeste do Brasil/ Edna Barboza de Lima – 2020.

109 f.: il., fig., tab.

Orientadora: Daniella Maria do Amaral Ferraz Navarro

Coorientador: Cláudio Augusto Gomes da Camara

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2020.

Inclui referências, apêndice e anexo.

1. Óleos essenciais 2. *Aedes aegypti* 3. Repelência I. Navarro, Daniella Maria do Amaral Ferraz (orient.) II. Camara, Cláudio Augusto Gomes da (coorient.) III. Título

665.3

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2020- 178

EDNA BARBOZA DE LIMA

TESTES DE REPELÊNCIA E DETERRÊNCIA DE OVIPOSIÇÃO EM *Aedes aegypti* L. (CULICIDAE, DIPTERA) COM ÓLEOS ESSENCIAIS DE ESPÉCIES NATIVAS DA REGIÃO NORDESTE DO BRASIL

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

Aprovada em: 10/09/2020.

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Daniela Maria do Amaral Ferraz Navarro (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr^ª. Teresinha Gonçalves da Silva (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr^ª. Maria Tereza dos Santos Correia (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Thiago Henrique Napoleão (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Dr^ª. Elis Paula de Almeida Batista (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Minas Gerais

AGRADECIMENTOS

À professora Daniela Maria do Amaral Ferraz Navarro pela orientação e dedicação prestada no presente trabalho.

Ao meu coorientador Cláudio Câmara por ter trazido ao nosso trabalho novas ideias e apoio profissional.

A Marcelo Felipe pela ajuda nos experimentos de cromatografia e separação de compostos.

À Kamilla Dutra pelas dicas e ajuda na parte escrita.

A todos os colegas do Laboratório de Ecologia Química que prestaram serviços, ajudas e auxílios para realização das diversas funções desenvolvidas, especialmente os colegas André Silva, Liderlanio Araújo, Weverton Marlon e Jéssica Nascimento.

A Júlio César técnico do laboratório de Ecologia Química pela ajuda na execução de experimentos.

A Paulo Milet e Geanne Novais por me auxiliar nos experimentos com eletroantennografia.

A todo o pessoal do Laboratório de Inovação Tecnológica e Empreendedorismo em Controle de Vetores (LINTEC – UFMG) pela parceria e colaboração na execução de experimentos.

Ao Prof. Álvaro Eiras da Universidade Federal de Minas Gerais pela cooperação com o nosso laboratório.

À Kelly Paixão pelos ensinamentos e acompanhamento na realização dos experimentos de olfatometria.

Aos colegas do LINTEC-UFMG Elizângela Melo, Elis Batista, Juliana Souza e Richard Diogo pelas palavras de apoio, companhia e novas ideias.

Ao meu namorado Manoel Júnior pela compreensão e palavras de apoio.

A todos os professores do programa de pós-graduação em biotecnologia pelos ensinamentos.

A todos os colegas de classe.

Aos meus pais Jozemil Barboza e Lenita Freitas pela força, dedicação e conselhos dados.

Aos meus irmãos Edson Barboza e Edvania Barboza pelas palavras de apoio e atenção.

À Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e ao Departamento de Química Fundamental (DQF) por ceder espaço para realização de experimentos.

À Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) pela cooperação com a Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Dengue (INCT em dengue) pelo auxílio das passagens cedido para a realização de experimentos em parceria com UFMG e o LINTEC.

À FACEPE pelo auxílio cedido para realização de tal projeto.

RESUMO

O *Aedes aegypti* é o mosquito transmissor dos arbovírus da dengue, zika e chikungunya, pelos quais é estimado que uma a cada três pessoas no mundo podem se infectar. Por não haver vacina contra essas três arboviroses, o seu controle é baseado principalmente no controle do vetor. No entanto, desafios como a crescente resistência à inseticidas nas populações de *Ae. aegypti* expõem a necessidade de se buscar novas tecnologias que possam complementar as tradicionais ferramentas de controle dos mosquitos vetores. Diante disto, o presente estudo teve por objetivo analisar o potencial repelente e deterrente de oviposição de óleos essenciais encontrados na região Nordeste do Brasil como ferramentas auxiliares no combate ao mosquito *Ae. aegypti*. Para isso, primeiramente, os óleos essenciais utilizados foram extraídos por hidrodestilação à 160°C durante 3h e caracterizados pelas técnicas de cromatografia gasosa e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas. Em seguida, testes de repelência em olfatômetro de dupla escolha foram realizados com os óleos essenciais de *Eugenia uniflora* L., *Eugenia uvalha* Cambess, *Xylopia sericea* A. St.-Hil, *Algrizea minor* Sobral, Faria e Proença e *Myroxylon peruiferum* L.f., onde aproximadamente 15 fêmeas, em jejum por 12h, foram utilizadas em cada teste. Posteriormente, foram realizados testes de eletroantenografia com o óleo essencial de *E. uniflora* para identificar possíveis compostos ativos ao *Ae. aegypti*. Os compostos curzereno e germacrona que apresentaram respostas nos testes eletroantenográficos foram extraídos pela técnica de cromatografia em camada delgada. Por fim, foram realizados bioensaios de oviposição com microemulsões do óleo essencial de *E. uniflora* e seus compostos majoritários, curzereno e germacrona, em gaiolas de metal e acrílico no tamanho (33x21x30cm), contendo 10 fêmeas grávidas de *Ae. aegypti*. Os testes de repelência mostraram que o óleo de *E. uniflora* se destacou na concentração de 5 ppm, apresentando 26,01% de repelência, indicando maior eficácia em comparação aos demais óleos analisados ($p < 0,05$). Nos bioensaios de deterrência de oviposição as microemulsões formadas pelo óleo de *E. uniflora* à 50ppm e 5 ppm, apresentaram percentuais de deterrência de 73,66% ($p = 0,00$) e 65,50% ($p = 0,00$), respectivamente, enquanto que o percentual de deterrência para a microemulsão formada pelo composto puro curzereno à 5ppm foi de

66,60% ($p=0,02$), já o percentual de deterrência para a microemulsão formada pelo composto puro germacrona, ao contrário das demais amostras, não foi eficaz na inibição da postura de ovos e seu valor foi de 47,92% ($p=0,786$). Assim, podemos concluir que o curzereno foi o componente ativo responsável pelas variações sensoriais causadas no *Ae. aegypti*.

Palavras-chave: *Aedes aegypti*. Repelência. Deterrência de oviposição. Óleos essenciais.

ABSTRACT

Aedes aegypti is the mosquito that transmits the dengue, zika and chikungunya arboviruses, by which it is estimated that one in three people in the world can become infected. Since there is no vaccine against these three arboviruses, their control is based mainly on vector control. However, challenges such as the growing resistance to insecticides in populations of *Ae. aegypti* expose the need to search for new technologies that can complement the traditional mosquito vector control tools. Given this, the present study aimed to analyze the repellent and deterring potential of oviposition of essential oils found in the Northeast region of Brazil as auxiliary tools in the fight against the *Ae. aegypti* mosquito. For this, first, the essential oils used were extracted by hydrodistillation at 160°C for 3h and characterized by the techniques of gas chromatography and gas chromatography coupled with mass spectrometry. Then, repellency tests in a double-choice olfactometer were performed with the essential oils of *Eugenia uniflora* L., *Eugenia uvalha* Cambess, *Xylopia sericea* A. St.-Hil, *Algrizea minor* Sobral, Faria and Proença and *Myroxylon peruiferum* Lf, where approximately 15 females, fasting for 12h, were used in each test. Subsequently, electroantenography tests were performed with the essential oil of *E. uniflora* to identify possible active compounds in *Ae. aegypti*. The compounds curzerene and germacrone that showed responses in the electroanthenographic tests were extracted using the thin layer chromatography technique. Finally, oviposition bioassays were carried out with microemulsions of the essential oil of *E. uniflora* and its major compounds, curzerene and germacrone, in metal and acrylic cages in size (33x21x30cm), containing 10 pregnant females of *Ae. aegypti*. Repellency tests showed that *E. uniflora* oil stood out at a concentration of 5 ppm, presenting 26.01% repellency, indicating greater efficiency compared to the other analyzed oils ($p < 0.05$). In the oviposition deterrent bioassays, the microemulsions formed by *E. uniflora* oil at 50ppm and 5 ppm, showed deterrent percentages of 73.66% ($p = 0.00$) and 65.50% ($p = 0.00$), respectively, while the deterrent percentage for the microemulsion formed by the pure curzerene compound at 5ppm was 66.60% ($p = 0.02$), whereas the deterrent percentage for the microemulsion formed by the pure germacrone compound, unlike the others samples, was not effective in inhibiting egg laying and its value was 47.92% ($p =$

0.786). Thus, we can conclude that curzerene was the active component responsible for the sensory variations caused in *Ae. aegypti*.

Keywords: *Aedes aegypti*. Repellency. Deterioration of oviposition. Essencial oils.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1– Ciclo biológico do mosquito <i>Ae. aegypti</i>	20
Figura 2– Dimorfismo sexual entre machos e fêmeas de <i>Ae. aegypti</i>	20
Figura 3– Distribuição geográfica mundial dos casos de dengue entre os anos de 2010 a 2016, por transmissão autóctone	25
Figura 4– Número de casos de dengue no Brasil separados por regiões no ano de 2019 em comparação com o mesmo período do ano anterior. ..	25
Figura 5– Casos de zika entre os anos de 2015 a 2016 nas Américas do Norte, Central e do Sul, por transmissão autóctone.....	27
Figura 6– Número de casos de zika no Brasil separados por regiões no ano de 2019 em comparação com o mesmo período do ano anterior	27
Figura 7– Casos de chikungunya, por transmissão autóctone no ano de 2017	29
Figura 8– Número de casos de chikungunya no Brasil separados por regiões no ano de 2019 em comparação com o mesmo período do ano anterior	30
Figura 9– Método de captura de insetos (a) A = Exaustor, B= Gaiola de seleção, C= Gaiola Bug-Dorm®, D= Gaiola de liberação. (b) Captura dos insetos.....	41
Figura 10– Ilustração dos componentes e funcionalidade do olfatômetro de dupla escolha. (A) Gaiola de liberação dos mosquitos; (B) Tubo principal; (C) Caixa de escolha; (D) Tubo de escolha; (E) Tubo de liberação de estímulo, onde os tratamentos avaliados foram posicionados de forma randômica	42
Figura 11– Sistema para estudos de comportamento de insetos (A) Olfatômetro de dupla escolha; (B) Sistema de exaustão; (C) Carvão ativado; (D) Banho maria adaptado	43
Figura 12– Detector eletroantenográfico acoplado ao cromatógrafo gasoso (CG-DEA).....	46

Figura 13– Cabeça do <i>Ae. aegypti</i> acoplada ao capilar contendo solução de Ringer.....	47
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA Agência Nacional de Vigilância Sanitária

Ae. Aedes

CG Cromatografia Gasosa

CG-DEA Cromatografia Gasosa Acoplada a um Detector Eletroantenográfico

CG-EM Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas

CHIKV Chikungunya Virus

DEET NN-dietil-3-metilbenzamida

DENV Dengue Vírus

DHS Diferença Honestamente Significativa

EBAAP Butilacetilaminopropionato de Etila

FIOCRUZ Fundação Oswaldo Cruz

FD Febre da Dengue

FHD Febre Hemorrágica da Dengue

MS Ministério da Saúde

NSO Neurônio Sensorial Olfativo

OMS Organização Mundial da Saúde

OPAS Organização Pan-Americana de Saúde

SCD Síndrome do Choque da Dengue

ZIKV Zika Vírus

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
1.1	OBJETIVOS.....	18
1.1.1	Objetivo Geral.....	18
1.1.2	Objetivos Específicos.....	18
2	REFERENCIAL TEÓRICO	19
2.1	ASPECTOS GERAIS SOBRE O <i>AE. AEGYPTI</i>	19
2.1.1	Órgãos sensoriais, detecção do hospedeiro, hematofagia e comunicação interespecífica	22
2.1.2	Importância para a saúde pública	23
2.2	REPELENTES	30
2.3	DETERRENTES DE OVIPOSIÇÃO	32
2.4	ÓLEOS ESSENCIAIS	33
2.5	ELETROANTENOGRAMA.....	37
3	MÉTODOS.....	39
3.1	CRIAÇÃO DOS <i>AE. AEGYPTI</i> UTILIZADOS NOS TESTES DE REPELÊNCIA	39
3.2	CRIAÇÃO DOS <i>AE. AEGYPTI</i> UTILIZADOS NOS TESTES DE OVIPOSIÇÃO.....	39
3.3	EXTRAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS.....	39
3.4	CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS	40
3.5	MÉTODO DE CAPTURA DOS MOSQUITOS UTILIZADOS NOS TESTES DE REPELÊNCIA.....	41
3.6	MÉTODO DE CAPTURA DOS MOSQUITOS UTILIZADOS NOS TESTES DE OVIPOSIÇÃO.....	41
3.7	OLFATÔMETRO DE DUPLA ESCOLHA USADO NOS TESTES DE REPELÊNCIA	42
3.8	CALIBRAÇÃO DO OLFATÔMETRO	43
3.9	BIOENSAIOS DE REPELÊNCIA	44
3.10	BIOENSAIOS DE OVIPOSIÇÃO.....	44
3.11	ANÁLISE ELETROFISIOLÓGICA.....	45
3.12	ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS MAJORITÁRIOS	47

3.13	ANÁLISE DE DADOS PARA OS TESTES DE REPELÊNCIA	47
3.14	ANÁLISE DE DADOS PARA OS TESTES DE OVIPOSIÇÃO	48
4	ATIVIDADE REPELENTE DE ÓLEOS ESSENCIAIS DA REGIÃO NORDESTE DO BRASIL CONTRA PICADAS DE <i>Aedes Aegypti</i> (CULICIDAE, DIPTERA).....	49
5	ATIVIDADE DETERRENTE DE OVIPOSIÇÃO DO ÓLEO DE EUGENIA UNIFLORA L. E SEUS COMPOSTOS MAJORITÁRIOS CURZERENO E GERMACOMA FRENTE AO MOSQUITO <i>Aedes</i> <i>Aegypti</i> (CULICIDAE, DIPTERA).....	68
6	CONCLUSÕES	85
	REFERÊNCIAS	86
	APÊNDICE A – PATENTE	99
	APÊNDICE B – COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS	107

1 INTRODUÇÃO

A Organização Mundial da Saúde vem há anos colocando nas suas pautas o apoio ao desenvolvimento de pesquisas que visem a produção de imunobiológicos capazes de proteger a população de patógenos causadores de doenças transmitidas pelo *Ae. aegypti* (Linnaeus, 1762) (TEIXEIRA; BARRETO; GUERRA, 1999). No ano de 2015 o laboratório francês Sanofi-Pasteur criou uma vacina contra a dengue denominada Dengvaxia®, que prometia a imunização da população, porém no ano de 2018 a Anvisa emitiu um comunicado informando que o uso de tal vacina em pessoas que nunca contraíram o vírus da dengue poderia causar riscos de hospitalização ou maior probabilidade de contraírem dengue grave (ANVISA, 2018; SWAMINATHAN; KHANNA, 2019).

Até o presente momento não há no mercado qualquer vacina totalmente eficaz contra a dengue sem contra indicações, portanto métodos preventivos no combate ao vetor são extremamente importantes, dentre eles podemos destacar o uso de repelentes tópicos ou espaciais e deterrentes de oviposição (SCHWARTZ et al., 2015).

Os repelentes são compostos voláteis que aplicados em determinado local, na qual se deseja proteção, promovem um estímulo químico captado pela antena do mosquito e com isso o fará voar em direção oposta ao local na qual o produto foi disseminado (ACHEE et al., 2012).

Um repelente para ser considerado eficaz e viável deve ter boa volatilidade, baixa toxicidade, boa absorção pela pele, boa fixação, possuir tempo prolongado de ação, resistir ao suor e à lavagens e possuir valor de mercado compatível com os demais produtos concorrentes (KATZ; MILLER; HEBERT, 2008; BROWN; HERBERT, 1997).

No mercado temos repelentes que são do tipo sintético e natural. O DEET (NN-diethyl-3-metilbenzamida) é o repelente sintético mais conhecido e utilizado na atualidade, sua concentração está entre 7,0 e 50,0 % nos produtos vendidos comercialmente (THAVARA et al., 2001). Apesar de ser largamente utilizado esse composto pode vir a causar efeitos tóxicos em adultos e principalmente em crianças,

tais como irritações na pele, dormência, dermatites de contato e urticária (MARK; FRADIN, 1998; MARK; FRADIN; DAY, 2002; SWALE et al., 2014).

Os repelentes naturais surgiram como uma opção em geral mais segura e menos tóxica que os repelentes sintéticos, esses produtos possuem em sua composição óleos essenciais extraídos de plantas (NERIO; OLIVERO-VERBEL; STASHENKO, 2010). A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos relatou que os óleos de *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor, *Citrus limon* (L.) Osbeck e *Eucalyptus globulus* Labill são exemplos de opções seguras e eficazes de repelentes naturais contra picadas de insetos hematófagos (KATZ; MILLER; HEBERT, 2008).

Os óleos essenciais utilizados para produção de repelentes naturais são oriundos de metabólitos secundários de plantas e são constituídos por uma mistura de compostos orgânicos voláteis tais como: hidrocarbonetos (terpenos e sesquiterpenos) e compostos oxigenados (álcoois, ésteres, éteres, aldeídos, cetonas, lactonas e fenóis) (GUENTHER, 1972).

Estudos tem demonstrado que alguns compostos repelentes tem causado uma diminuição na resposta olfativa de insetos após cerca de 3 h de pré-exposição, ou seja, o inseto vetor passa a ser direcionado ao atrativo mesmo que este esteja com repelente, isso ocorre porque ao se utilizar o produto com certa frequência ocorrem mudanças na função do sistema olfativo periférico e as sensilas olfativas, presentes nas antenas dos mosquitos, se adaptam ao odor de tais componentes (STANCZYK et al., 2013; STANCZYK et al., 2010; SYED; LEAL, 2008).

A fim de amenizar ou eliminar tais inconvenientes se faz necessário pesquisas que visem a descoberta de novos componentes químicos repelentes para que sejam utilizadas combinações dos mesmos nas formulações de produtos comerciais gerando uma maior dificuldade de adaptação ao odor captado pelas sensilas olfativas do inseto vetor (MISNI; NOR; AHMAD, 2016; LOMBARDO et al., 2017)

Uma outra alternativa para o controle vetorial do *Ae. aegypti* é o estudo de componentes que sejam capazes de evitar a oviposição das fêmeas. Compostos químicos oriundos de óleos essenciais são uma excelente alternativa, pois são comumente tóxicos para mosquitos e causam interrupção no seu ciclo de desenvolvimento e propagação, não agredindo o meio ambiente (GOMES et al., 2016). Os óleos de *Mentha x piperita* L., *Ocimum basilicum* L., *Rosmarinus officinalis*

L., *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle e *Commiphora leptophloeos* (Mart.) J. B. Gillett são alguns dos exemplos de deterrentes de oviposição de eficácia já comprovada pela literatura (WARIKOO; WAHAB; KUMAR, 2011; SILVA, R et al., 2015).

O presente trabalho teve por objetivo estudar novos compostos oriundos de óleos essenciais de plantas encontradas na região nordeste do Brasil como repelentes e deterrentes de oviposição para os mosquitos *Ae. aegypti*.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial repelente e deterrente de oviposição de óleos essenciais extraídos de espécies da região Nordeste do Brasil, como ferramenta complementar ao combate do vetor *Aedes aegypti*.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Obter óleos essenciais das espécies *E. uniflora*, *E. uvalha*, *X. sericea*, *A. minor* e *M. peruiferum* através de hidrodestilação;
- Identificar e quantificar os compostos presentes nos óleos essenciais utilizando as técnicas de cromatografia gasosa (GC) e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS);
- Realizar ensaios de repelência com óleos essenciais de *E. uniflora*, *E. uvalha*, *X. sericea*, *A. minor* e *M. peruiferum* contra fêmeas de *Ae. aegypti* em olfatômetro de Dupla-Escolha.
- Efetuar testes eletroantenográficos (CG-DEA) em fêmeas de *Ae. aegypti* com o óleo essencial que obtiver melhor resultado nos testes de repelência.
- Isolar os compostos majoritários presentes no óleo essencial que apresentar resultado nos testes eletroantenográficos.
- Realizar testes de deterrência de oviposição com o óleo essencial que apresentar resultados mais promissores nos testes de eletroantenografia, juntamente com seus compostos majoritários.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 ASPECTOS GERAIS SOBRE O *Ae. AEGYPTI*

O mosquito *Ae. aegypti* é um inseto que pertence à ordem Diptera, subordem Nematocera e família Culicidae (VOGEL; BROWN; STRAND, 2015).

A origem etimológica do binômio específico *Aedes aegypti* vem do grego e significa “desagradável” e do latim “do Egito”, região de origem desse mosquito. Sua disseminação começou inicialmente em regiões de climas subtropicais por volta do século XVI, através do transporte de escravos em navios negreiros (FIOCRUZ, 2019). Com o processo de colonização esse inseto chegou até as Américas e passou a se proliferar em ambientes urbanos que continham água parada (FONSECA; BRAZ, 2010).

Atualmente o mosquito *A.aegypti* apresenta comportamento cosmopolita, sendo capaz de acompanhar populações urbanas em busca de condições ideais de umidade e temperatura para o desenvolvimento do seu ciclo de vida (FONSECA; BRAZ, 2010). Nas condições ideais a larva eclode e passa pelo processo de metamorfose completa, também chamado de holometabolia (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994; UTSUNOMIYA et al., 2008; BARRETO et al., 2006). Seu ciclo de vida possui quatro fases: ovo, larva, pupa e adulto. O estágio larval possui quatro ínstar L1-L4 que em condições ideais dura em média cinco dias (SILVA; MARIANO; SCOPEL, 2008). Por possuírem fototropismo negativo as larvas tendem a ficar aglomeradas nos locais mais escuros do criadouro na qual se alimentam (VARGAS, 1998).

Após chegar no quarto ínstar larval o *Ae. aegypti* passa para a fase de pupa, durante a qual não se alimenta e permanece na superfície da água apenas realizando o processo de respiração aeróbia, estágio que dura cerca de dois dias (Figura 1) (SILVA; MARIANO; SCOPEL, 2008).

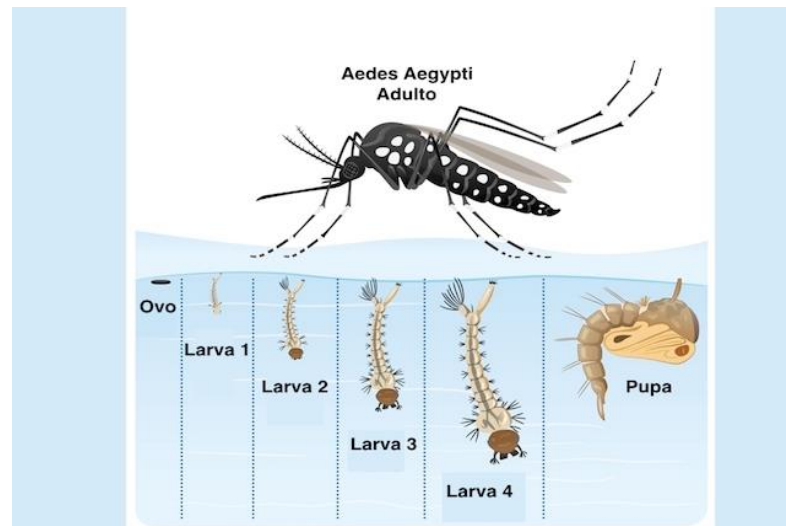


Figura 1- Ciclo biológico do mosquito *Ae. aegypti*.

Fonte: <http://educaaedes.federalcubatao.com.br/index.php/noticia/16-fases-do-aedesaegypti>. Acesso em 14/05/2019.

O *Ae. aegypti* adulto possui dimorfismo sexual, ou seja, machos e fêmeas têm características morfológicas distintas (ALMEIDA, 2011). O macho possui antenas do tipo plumosas e os palpos (estrutura do aparelho bucal) alongados em relação às fêmeas que possuem antenas pilosas e palpos menores (Figura 2) (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994).

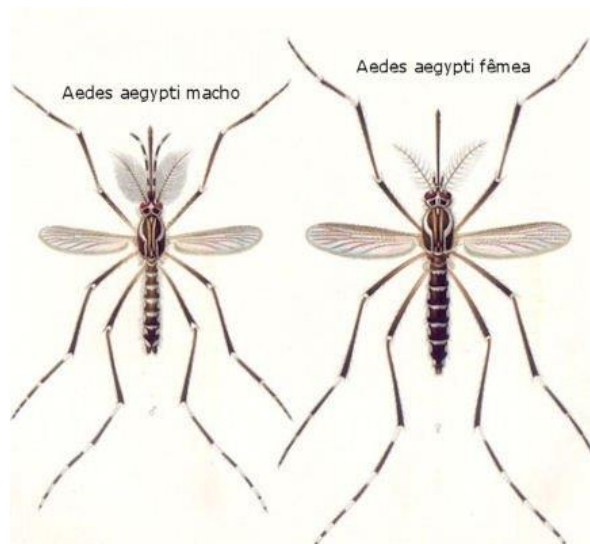


Figura 2- Dimorfismo sexual entre machos e fêmeas de *Ae. aegypti*.

Fonte: <http://www.minutobiomedicina.com.br/postagens/2016/04/07/estudo-propoe-edicao-genetica-para-eliminar-femeas-de-aedes-aegypti/>. Acesso em 14/05/2019.

Os insetos adultos são diurnos com atividades mais intensas nos períodos matutino (6h e 7h) e vespertino (17h, 18h e 19h) (FORATTINI, 2002).

Machos e fêmeas necessitam de uma fonte de carboidrato para garantir energia necessária para suas atividades vitais, como realização de voo e atividades metabólicas, a qual é obtida na natureza através de seiva vegetal e néctar de plantas (FOSTER; TAKKEN 2004; RIBEIRO et al., 2016; CHADEE; SUTHERLAND; GILLES, 2014).

A alimentação da fêmea difere um pouco da alimentação do macho pelo fato da mesma realizar hematofagia, processo necessário para obtenção de aminoácidos usados na maturação de ovos (SYLVESTRE; GANDINI; MACIEL-DE-FREITAS, 2013).

Após a cópula, a fêmea deposita seus ovos, em superfícies próximas a locais com água limpa para dar início ao seu ciclo reprodutivo (TAUIL, 2002). Se o ambiente no qual os ovos foram depositados estiver em condições desfavoráveis de temperatura e umidade, o processo de embriogênese será interrompido e ocorre o fenômeno de diapausa, ou seja, os ovos sofrem uma retenção temporária no seu desenvolvimento e são capazes de resistir à condições adversas por 6 meses ou mais, até que o ambiente ideal para seu desenvolvimento seja restabelecido (FARNESI et al., 2009).

Na busca por repasto sanguíneo mosquitos fêmeas de *Ae. aegypti* apresentam preferências por determinados hospedeiros, podendo haver mudança da espécie hospedeira quando recursos sanguíneos estiverem escassos. Essas alterações de preferências são moduladas por fatores genéticos e fisiológicos como conservação de receptores olfativos para determinado indivíduo e experiências anteriores de aprendizado com determinadas espécies (VINAUGER et al., 2018).

Após encontrar o hospedeiro disponível e mais adequado os mosquitos hematófagos pousam sobre a pele do indivíduo e fazem a inserção das peças bucais em busca de vasos sanguíneos, esse processo de busca intradérmica por vasos sanguíneos é denominado tempo de sondagem (RIBEIRO, 2001).

Ao realizar a penetração vascular os mosquitos liberam juntamente com a saliva compostos anticoagulantes, antiplaquetários e vasodilatadores afim de evitar o processo de hemostasia (CIPRANDI; HORN; TERMIGNONI, 2003; RIBEIRO, 2001).

Nesse processo de penetração o hospedeiro pode ser contaminado por patógenos caso o mosquito que realize a lesão esteja infectado (SIM; RAMIREZ; DIMOPOULOS, 2012).

O patógeno chega até as glândulas salivares do mosquito por diversas vias, dentre elas através da passagem pelo epitélio intestinal até a hemolinfa (SIM; RAMIREZ; DIMOPOULOS, 2012). Ao picar o hospedeiro o inseto vetor inocula o vírus presente na sua saliva na corrente sanguínea do vertebrado para dá continuidade ao processo de replicação viral (LUPLERTLOP et al., 2011).

Nesse processo de repasto sanguíneo a fêmea detecta o hospedeiro a partir de estímulos que podem ser térmicos, químicos e mecânicos realizados a partir de órgãos sensoriais. As sensilas são os órgãos sensoriais que captam os estímulos através do sistema nervoso e os transformam em informação (CABRINI; ANDRADE, 2006)

Os órgãos sensoriais estão localizados em diversas partes do corpo do mosquito como olhos, tegumento, halteres, pernas, peças bucais e antenas (MEIJERINK; VAN LOON, 1999).

2.1.1 Órgãos sensoriais, detecção de hospedeiro, hematofagia e comunicação interespecífica

As fêmeas de *Ae. aegypti* detectam o hospedeiro a partir de estímulos térmicos, químicos e/ou mecânicos realizados a partir de órgãos sensoriais que podem estar localizados em diversas partes do corpo do mosquito como olhos, tegumento, halteres, pernas, peças bucais e antenas (MEIJERINK; VAN LOON, 1999).

Nos processos de hematofagia essas fêmeas voam em direção a pluma de odor emitida pelo hospedeiro a partir da respiração e de emanações cutâneas (ZWIEBEL; TAKKEN, 2011). Os sistemas olfativos são os responsáveis pela captação desses odores através das sensilas que transformam os estímulos em informação através de impulsos nervosos (CABRINI; ANDRADE, 2006).

As antenas dos mosquitos possuem as sensilas quimiorreceptoras, cuja cavidade distal é preenchida por um fluido denominado linfa sensilar na qual moléculas voláteis de odor são dissolvidas e entram em contato com o neurônio sensorial olfativo (NSO)

que faz a detecção desses estímulos olfativos (FOX et al., 2001; HALLBERG; HANSSON, 1999).

O processo de interação entre alguns seres vivos se dá a partir da produção de substâncias voláteis, pela fonte vegetal, capazes de agir na comunicação entre as espécies. Esses compostos químicos produzidos recebem o nome de semioquímicos (BRUCE; WADHAMS; WOODCOCK, 2005). No caso de interações entre indivíduos de espécies distintas, como interações planta-inseto, esses semiquímicos são chamados de aleoquímicos (BREZOLIN et al., 2018).

Os aleoquímicos presentes nos óleos essenciais de plantas podem ser atrativos ou repelentes (GANESAN et al., 2006). Como esses voláteis estão presentes em grande número e com diferentes composições químicas a identificação do componente biologicamente ativo torna-se extremamente difícil (BECK; LIGHT; GEE, 2012). Análises eletrofisiológicas são utilizadas afim de identificar essas espécies ativas através do uso da antena do inseto como sensor biológico (PATRICIO; CRUZ-LÓPEZ; MORGAN, 2004).

Em casos onde os compostos naturais possuem efeitos neutóxicos para mosquitos as mudanças comportamentais do inseto podem ser explicadas pelos mecanismos de inibição da acetilcolinesterase e modulação alostérica positiva dos receptores (JANKOWSKA et al., 2018). No primeiro caso os compostos atuam modificando a atividade da enzima acetilcolinesterase presentes nas funções neurais dos insetos, enquanto que no segundo caso os compostos químicos presentes nos óleos essenciais agem sobre o ácido gama-amminobutílico se ligando a receptores específicos presente no sistema olfativo dos mosquitos (INGKANINAN et al., 2003; JANKOWSKA et al., 2018).

2.1.2 Importância para a saúde pública

Os insetos vetores são considerados uma ameaça à saúde global, pois podem transmitir vários patógenos causadores de doenças (LING; RAIKHEL, 2018; KING, 2020). O *Ae. aegypti* é o transmissor dos dois flavivírus mais disseminados na atualidade, vírus da dengue (DENV) e vírus do zika (ZIKV) e do alfavírus chikungunya (CHIKV), além da transmissão de doenças que podem levar a óbito esse mosquito também é comumente utilizado como um indicativo de pobreza e debilidade social

(VIEIRA et al., 2020; SUWANMANEE; LUPLERTLOP, 2017; KOVENDAN et al., 2012; RAULT et al., 2019).

A dengue é a arbovirose que mais atinge a população mundial, sua extensão assume mais de 100 países. As Américas e Sudeste Asiático são os locais onde ocorre uma maior incidência de casos de dengue registrados mundialmente (WHO, 2016) (Figura 3). Anualmente são registrados mais de 390 milhões de casos, sendo 96 milhões com manifestações aparentes em níveis distintos de gravidade que resultam em aproximadamente 12.000 casos de óbitos, com a maior parte dos casos registrados em países em desenvolvimento com clima subtropical (OLIVEIRA; BAHIA; VALE, 2020; ZHANG; WANG, 2020).

A dengue é causada por cinco sorotipos diferentes (DEN 1-5) e pode se manifestar como febre da dengue (FD), febre hemorrágica da dengue (FHD) e síndrome do choque da dengue (SCD), sendo as duas últimas formas de manifestação mais agressivas que a primeira e a taxa de mortalidade da FD costuma ser entre 1 a 5% menor que as formas FHD e SCD (ZHANG; WANG, 2020).

Os principais sintomas da doença incluem febre súbita, fadiga, perda de apetite, náusea, dores de cabeça, dor ao redor dos olhos, dor muscular, dor nos ossos e articulações e vermelhidão que pode ser observada nas regiões da face, pescoço e peito (HEILMAN et al., 2014; GURUGAMA et al., 2010).

Segundo dados da Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) no ano de 2019 o continente Americano superou o maior número de casos de dengue já registrados chegando a 2,7 milhões, sendo 22.127 casos graves e 1206 óbitos. Nesse mesmo ano o Brasil ocupou a quinta posição no número de casos registrados por habitantes nas Américas perdendo apenas para Belize, El Salvador, Honduras e Nicarágua. Houve um crescimento de 13 % no número total de casos em 2019 em relação à 2015, onde a epidemia registrava os maiores índices (OPAS, 2019).

Nesse ano de 2019, o Brasil apresentou um aumento de 600 % no número de casos de dengue, em comparação com dados do ano anterior, e registrou 591 mortes (MS, 2019). A região sudeste foi responsável pela maior elevação no número de casos de dengue (Figura 4).

Em Pernambuco, o número de casos passou de 9.135 para 31.056 tendo uma variação de 240% (MS, 2019).

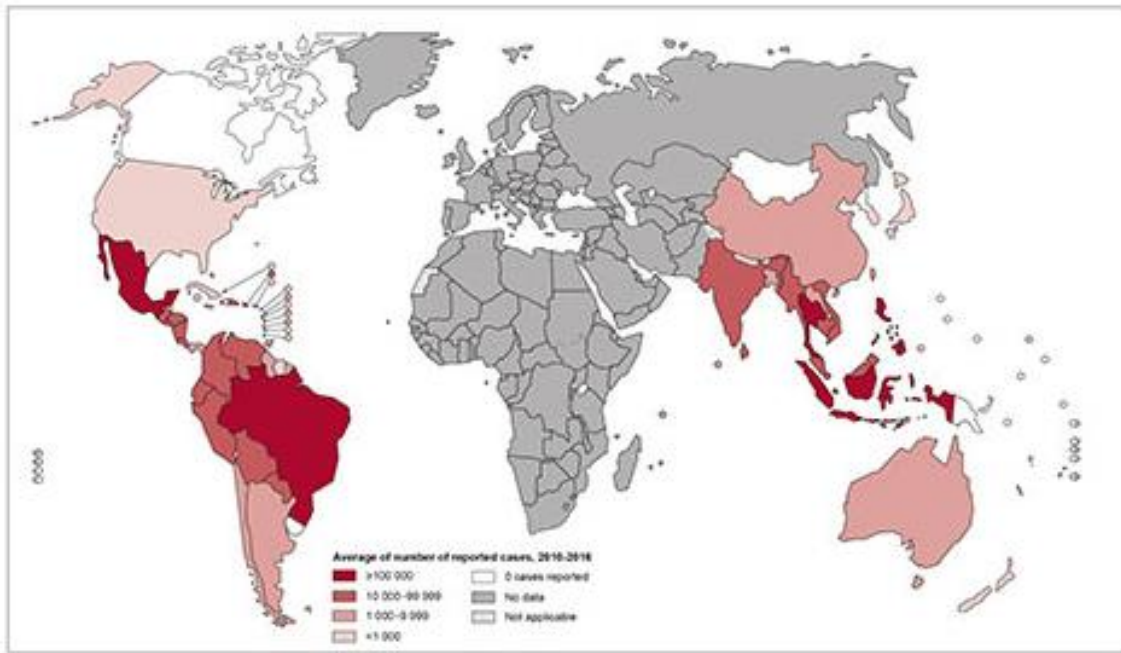


Figura 3- Distribuição geográfica mundial dos casos de dengue entre os anos de 2010 a 2016, por transmissão autóctone.

Fonte: World Health Organization, 2019.

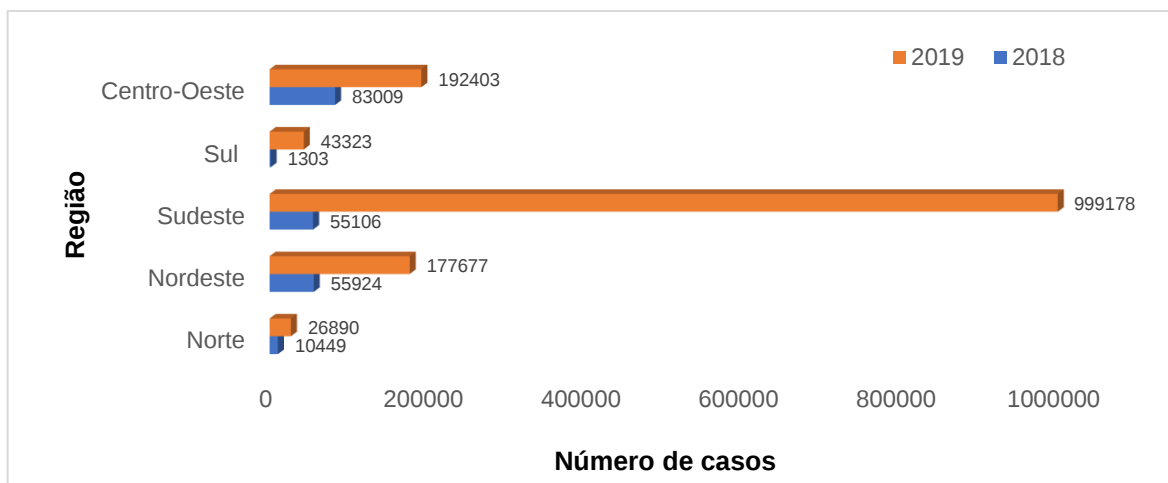


Figura 4- Número de casos de dengue no Brasil separados por regiões no ano de 2019 em comparação com o mesmo período do ano anterior.

Fonte: Adaptado de Boletim Epidemiológico do Ministério da Saúde, 2020.

O vírus da zika foi descoberto em 1947 na Uganda, leste da África. Inicialmente foi isolado do macaco sentinela Rhesus e posteriormente, cerca de um ano depois, foi isolado do mosquito *Aedes africanus* (KESARI et al., 2020). Esse flavivírus é comumente encontrado em mosquitos do gênero *Aedes* especialmente os da espécie

Ae. aegypti (AL-ABDELY, 2016). Na África, o zika foi descrito clinicamente como uma doença praticamente assintomática, durante mais de 60 anos foram registrados apenas 14 casos, com sintomas de febre leve (GRUBOR-BAUK et al., 2019). No ano de 2007 ocorreu a primeira epidemia de zika na Micronésia com quadros clínicos sem grandes complicações (SALGADO et al., 2020). Apenas em 2013, na Polinésia Francesa, ocorreram os primeiros surtos com complicações patológicas, relato de transmissões não advindas de vetores e casos de distúrbios neurológicos dentre eles alguns casos de microcefalia (BRAUD et al., 2017).

Entre 2015 e 2016 o vírus se espalhou pelas Américas causando maiores impactos na Colômbia e no Brasil (Figura 5) (RODRIGUES, 2016, SAAVEDRA et al., 2018). Relatos apresentados por Al-Abdely (2016) mostram que, por análise filogenética, foi detectada uma semelhança de 99% entre cepas encontradas no Brasil e na Polinésia Francesa. No ano de 2016, a Organização Mundial de Saúde (OMS) declarou casos de emergência de saúde pública no Brasil com importância internacional, associando o surto de zika ao aumento de 20 vezes nos casos de microcefalia (VENTURA et al., 2016). Em 2019, houve um crescimento de mais de 49% nos prováveis casos de zika no país, em comparação com o mesmo período do ano anterior, as regiões Sudeste e Nordeste foram as que apresentaram maior número de possíveis casos (Figura 6). Em Pernambuco, o número de casos passou de 70 para 437, tendo uma variação de 524% (MS, 2019).

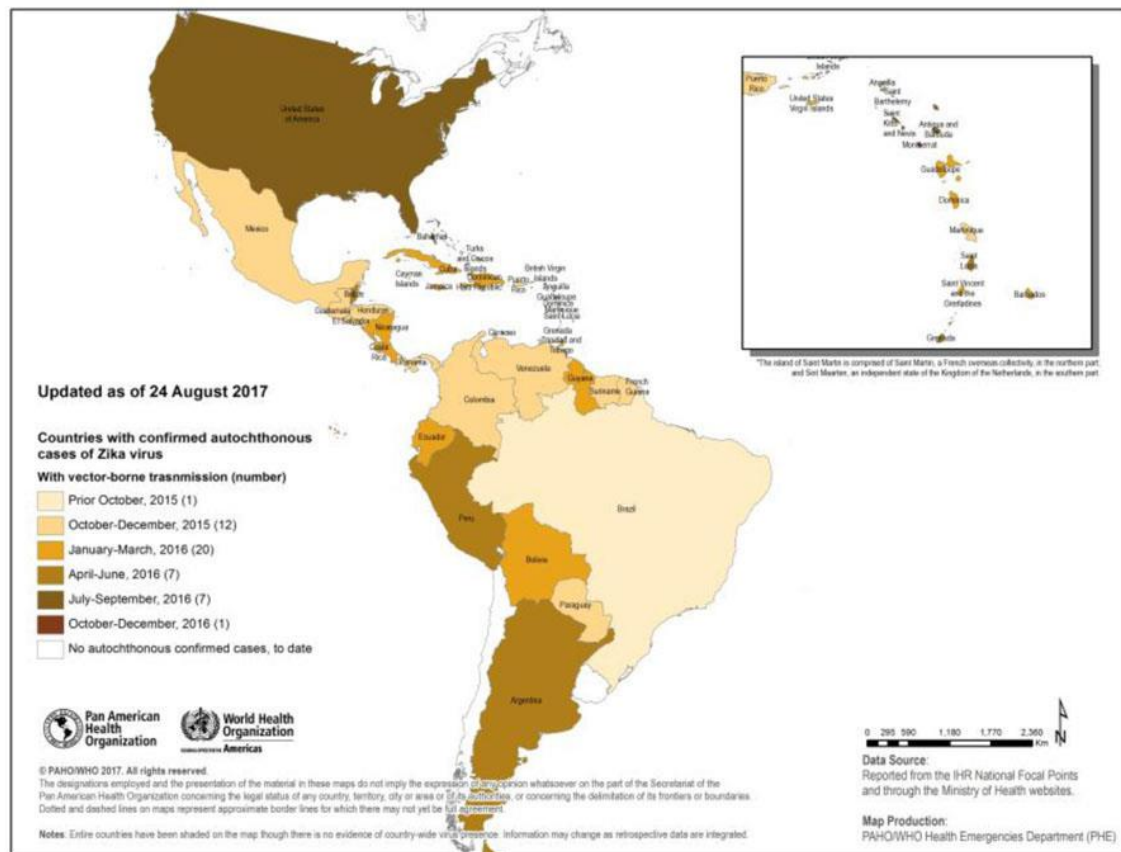


Figura 5- Casos de zika entre os anos de 2015 a 2016 nas Américas do Norte, Central e do Sul, por transmissão autóctone.

Fonte: World Health Organization, 2019

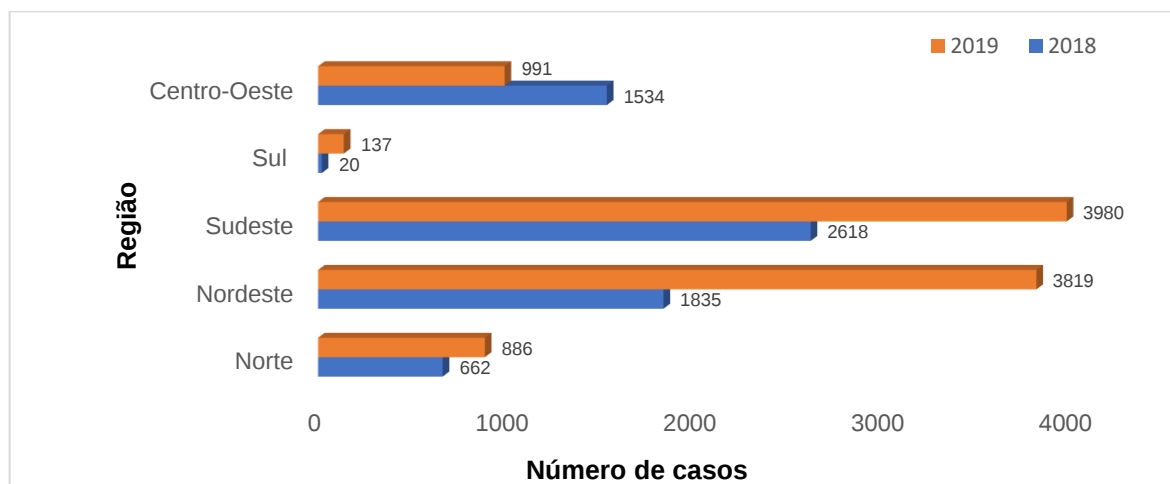


Figura 6- Número de casos de zika no Brasil separados por regiões no ano de 2019 em comparação com o mesmo período do ano anterior.

Fonte: Adaptado: Boletim Epidemiológico do Ministério da Saúde, 2020.

O vírus chikungunya pertence ao gênero *Alphavirus* e família *Togaviridae*, sendo vírus de RNA com cadeia simples positiva (HIGUERA; RAMÍREZ, 2019; SILVA-JÚNIOR et al., 2017; LIU et al., 2019; HORWOOD; BUCHY, 2015). Apesar da maior parte das transmissões ocorrerem por mosquitos fêmeas das espécies *Ae. aegypti* e *A. albopictus* (PEZZI et al., 2020), há estudos que relatam rotas distintas de transmissão com ausência do vetor, como a transmissão de mãe para filho, infecção nosocomial, transfusões de sangue, transplante de órgãos e relações sexuais (FRITEL et al., 2010; GÉRARDIN et al., 2008; HIGUERA; RAMÍREZ, 2019).

O primeiro surto descrito na literatura é datado de 1952 e ocorreu na região de Maconde, localizada no sudeste da Tanzânia. A etimologia da palavra chikungunya surgiu da língua maconde e significa “contorcido”, “inclinado”, devidos aos sintomas da doença serem caracterizados, principalmente, por dores fortes nas articulações, o que causam um grande desconforto ao paciente, levando o mesmo a um estado de contorção causada por dificuldades de locomoção (BURNETT, 2014). Em geral, os sintomas aparecem entre 4 e 7 dias após a picada do mosquito e a enfermidade pode conter duas fases, na qual a primeira se caracteriza por febre alta, dor de cabeça, vômito, erupção cutânea, mialgia ou poliartralgia com duração entre 1 e 10 dias, enquanto que a segunda fase é crônica, caracterizada por poliartralgia incapacitante com tempo de duração indeterminado, podendo variar de semanas a anos (RASHAD et al., 2018). Na maior parte dos casos os sintomas desaparecem entre 7 e 14 dias, porém, aproximadamente 10% dos pacientes apresentam sintomas que penduram por anos (LIU et al., 2019).

Passadas mais de 50 décadas desde o primeiro surto, entre 2004 e 2007 surgiram grandes epidemias em parte do continente Africano e Asiático (PATTERSON, 2016). Inicialmente, a infecção foi registrada na Ilha da Reunião com um terço da população infectada, e posteriormente, progrediu para a Índia (1,4-6,5 milhões de casos). Nas Américas foram registrados 1.118.763 casos entre 2013 e 2014, 575.281 casos em 2015 e 998.015 casos em 2016 (DANIS-LOZANO et al., 2017). Até o ano de 2017, essa arbovirose já havia atingido mais de 60 países na Ásia, África, Europa e Américas (Figura 7) (OMS, 2019).

No Brasil os primeiros casos de chikungunya ocorreram entre 2013 e 2014, nas regiões Norte, cidade de Oiapoque Amapá, e Nordeste, em Feira de Santana Bahia

(SILVA et al., 2018). Somente a partir de 2015 a epidemia atingiu outras localidades, com 20.598 casos em 2015 e 216.102 casos em 2016, até a semana epidemiológica 32, sendo mais de 87% dos casos registrados na região Nordeste (MS, 2016). Pernambuco foi o estado com o maior número de relatos chegando a 53.601 suspeitas de casos (BRITO, 2017; COSTA et al., 2019). Em 2019, as regiões Nordeste, Sudeste e Sul apresentaram crescimento de 134,5%, 74,9% e 179,7% nos casos de chikungunya. Em Pernambuco, o número de casos passou de 846 para 2.440, tendo uma variação de 188% (Figura 8) (MS, 2019).



Figura 7- Casos de chikungunya, por transmissão autóctone no ano de 2017.

Fonte: Organização Panamericana de Saúde, 2017

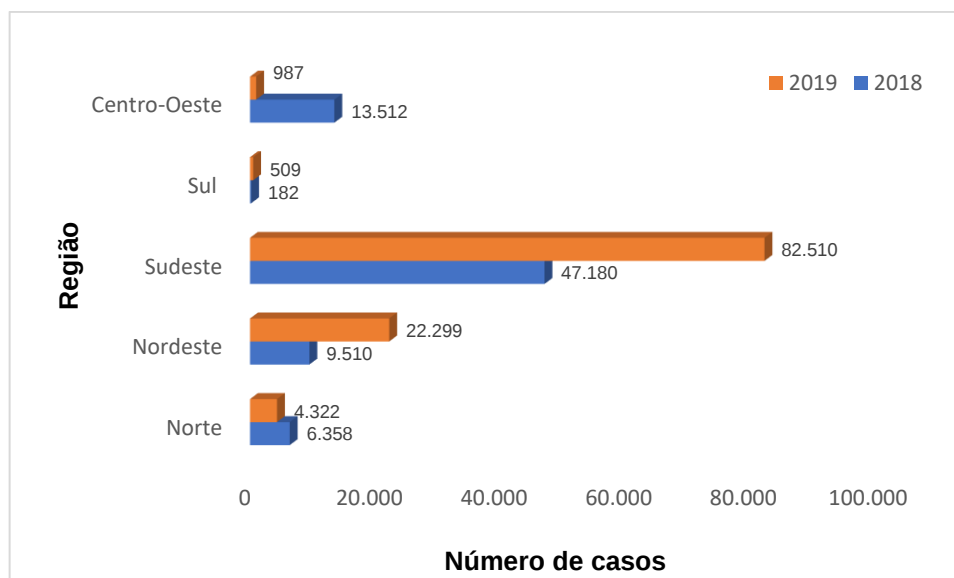


Figura 8- Número de casos de chikungunya no Brasil separados por regiões no ano de 2019 em comparação com o mesmo período do ano anterior.

Fonte: Adaptado: Boletim Epidemiológico do Ministério da Saúde, 2020.

2.2 REPELENTES

Desde a antiguidade o homem vem buscando formas de combater os indesejáveis insetos hematófagos (TABANCA et al., 2010). Os primeiros repelentes utilizados pela humanidade eram de fontes naturais e consistiam no uso de fumaças aromáticas (OLIFERENKO et al., 2013).

Durante o período da segunda guerra mundial houve milhões de casos de malária registrados nas tropas dos soldados norte-americanos e por conta desse incidente se intensificaram as pesquisas em busca de repelentes com maior eficácia e resistência à água (DEBBOUN; FRANCES; STRICKMAN, 2007).

Com o passar dos anos e evolução das pesquisas sobre, produtos repelentes, foram registrados protocolos que devem ser atendidos para que o produto seja considerado como eficaz e efetivo, dentre eles estão: bom grau de volatilidade, frequência e uniformidade de aplicação, boa absorção pela pele, resistência à água, tempo prolongado de ação, não causar irritação na pele, possuir odor agradável ou inodoro e não causar danos a utensílios de uso pessoal como roupas, joias, bolsas ou qualquer produto que possa vir a entrar em contato com o repelente aplicado (BROWN; HERBERT, 1997).

A composição dos repelentes pode variar e possuir origem natural, sintética ou sintético-natural (TUETUN et al., 2005) podendo ser comercializado como sprays, cremes, óleos corporais, loções e aerossóis (VILAR et al., 2020).

O repelente comercialmente mais utilizado é o NN-dietil-3-metilbenzamida, de origem sintética e descoberto nos Estados Unidos em 1946 para proteger tropas de soldados em ambientes tropicais (EPA, 2020). Apesar de ser considerado um dos repelentes mais eficazes da atualidade, possui as seguintes desvantagens: 1) eficácia reduzida contra *Anopheles albimanus* e variedades tolerantes de *Ae. aegypti* 2) pode causar irritação na pele, neurotoxicidade e tem ação plastificante em polímeros, ou seja, pode interagir e danificar roupas, bolsas e outros utensílios de uso pessoal que contenham polímeros; e 3) seu custo de mercado é relativamente elevado em comparação com outros repelentes utilizados comercialmente (OLIFERENKO et al., 2013).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) emitiu uma nota comunicando que o uso de repelentes a base de DEET não é recomendado para crianças com idade inferior a 2 anos e crianças com idade entre 2 e 12 anos só devem utilizar repelentes contendo esse composto na concentração máxima de 10%, sendo aconselhada no máximo 3 aplicações por dia (ANVISA, 2015).

Os repelentes naturais são uma alternativa aos sintéticos devido à diversidade de componentes químicos presentes nos seus óleos essenciais, além de serem comumente considerados mais seguros, com boa biodegradabilidade, eficácia, baixa toxicidade e baixo custo (COELHO; LEAL; VASCONCELOS, 2019; LI et al., 2019).

Atualmente, são encontrados no mercado norte americano repelentes naturais contendo os óleos essenciais de *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor, *Juniperus virginiana* L., *Eucalyptus globulus* Labill, *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf e *Pelargonium graveolens* L'Hér (MARK; FRADIN; DAY, 2002).

No Brasil, o órgão que regulamenta o uso de compostos que podem ser utilizados em formulações de repelentes tópicos e espaciais é a ANVISA e atualmente são comercializados em território nacional repelentes a base de DEET, Icaridina ou Picaridina, EBAAP ou IR 3535 (Butilacetilaminopropionato de etila) e óleo de *C. winterianus* (ANVISA, 2015).

2.3 DETERRENTES DE OVIPOSIÇÃO

Alguns óleos derivados de plantas são capazes de impedir a oviposição de fêmeas de mosquitos e a esse efeito chamamos de deterrência de oviposição (PRAJAPATI et al., 2005; COELHO et al., 2009). Esse processo de rejeição da fêmea em depositar seus ovos em local contendo o deterrente pode estar relacionado à captação de sinais quimiossensoriais das sensilas (SANTOS, N et al., 2012). As sensilas respondem aos voláteis presentes nas plantas, sendo esses odores deterrentes para mosquitos os mesmos recebem sinais neurais que afetam o seu comportamento e o direcionam para outros locais para realizar a oviposição (BOHBOT; VOGT, 2005).

O uso de componentes naturais extraídos de plantas no controle de insetos vetores são normalmente eco-seguros, possuindo resistência insignificante, número reduzido de aplicações, maior aceitabilidade e adequação para áreas rurais (WARIKOO; WAHAB; KUMAR, 2011).

Os óleos essenciais de *Azadirachta indica* A. Juss, *Pongamia glabra* Vent (BENELLI et al., 2014), *Commiphora leptophloeos* (Mart.) J.B.Gillett (SILVA, R et al., 2015), *Argemone mexicana* L. (WARIKOO; KUMAR, 2014), *Moringa oleífera* Lam. (COELHO et al., 2009), *Mentha x piperita* L., *Ocimum basilicum* L., *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle (WARIKOO; WAHAB; KUMAR, 2011), *Alpinia purpurata* (Zingiberaceae) (SANTOS, G et al., 2012), *Ageratum houstonianum* Mill (TENNYSON et al., 2012), *Juniperus macropoda* Boiss, *Pimpinella anisum* L., *Zingiber officinale* Roscoe, *Rosmarinus officinalis* L. (PRAJAPATI et al., 2005) e *Artemisia annua* L. (CHEAH et al., 2013) são alguns exemplos de deterrentes de oviposição encontrados na literatura.

Esses compostos deterrentes são capazes de evitar a propagação de mosquitos desde o início do seu ciclo de vida (KAUR; LAI; GIGER, 2003). Nesse contexto, a proliferação de patógenos podem ser afetadas pela inibição da oviposição em determinado criadouro onde o composto foi aplicado (HAMILTON; BERESFORD; SUTCLIFFE, 2011; SILVA, R et al., 2015; BENELLI; JEFFRIES; WALKER, 2016).

2.4 ÓLEOS ESSENCIAIS

A procura por componentes naturais capazes de repelir/eliminar hematófagos vem crescendo ao longo dos anos, devido à falta de métodos eficazes e problemas ambientais gerados pelo uso indiscriminado de compostos sintéticos no meio ambiente (PONTES et al., 2007).

Os óleos essenciais são vistos como uma alternativa segura e eficaz, devido seu longo histórico de uso, boa biodegradabilidade no ambiente e ampla bioatividade de seus componentes (LI et al., 2019; COELHO; LEAL; VASCONCELOS, 2019). Seu uso remonta desde o início da história da humanidade, na qual eram utilizados com a finalidade de proporcionar sabor e aroma aos alimentos (FRANZ, 2010).

Sua obtenção pode vir de diversas partes de uma mesma planta, porém algumas espécies concentram esses óleos em partes específicas como folha, frutos, raízes, caule, entre outros (MIRANDA et al., 2016; OUSSALAH et al., 2007).

O processo de extração pode ser realizado por diferentes técnicas como hidrodestilação, arraste a vapor, prensagem, enfleurage, extração com solventes orgânicos e extração com dióxido de carbono (CO₂) supercrítico (MORAIS, 2009; AMMAR; MENIAI; ZAGROUBA, 2014)

Com o passar dos anos, seu uso foi se tornando cada vez mais comum e foram descobertas diversas atividades biológicas, tais como: antioxidante (WANNES et al., 2010), anestésico e anti-inflamatório (MENDES et al., 2010), fungicida (CARMO; LIMA; SOUZA, 2008), antitumoral (SILVA et al., 2008), repelente, deterrente e larvícida (SANTOS, G et al., 2012; RAJKUMAR; JEBANESAN, 2010).

Sua composição é complexa e pode variar de acordo com a espécie de planta, sua localização geográfica, época de colheita e técnica de extração, sendo sensível à variações de calor e umidade. De maneira geral, possuem quatro classes de compostos: terpenos, compostos de cadeia linear, fenilpropanóides e grupos com estruturas variadas não inclusas nas demais classes (NAZARI et al., 2018).

Os terpenos são os compostos mais abundantes nos óleos essenciais e são formados por unidades repetitivas de isopreno (C₅H₈), sendo classificados em hemiterpenos (1 unidade), monoterpenos (2 unidades), sesquiterpenos (3 unidades), diterpenos (4 unidades), sesterpenos (5 unidades), triterpenos (6 unidades) e politerpenos (mais de 6 unidades) (MORSY, 2017). Esses compostos podem ser

formados apenas por hidrocarbonetos ou por cadeias carbônicas contendo oxigênio, sendo denominado terpenóide, nesse último caso os compostos podem apresentar diferentes funções químicas, tais como: ácidos, álcoois, aldeídos, cetonas, éteres e fenóis (FELIPE; BICAS, 2016).

Os compostos de cadeia linear são formados por hidrocarbonetos contendo apenas carbonos primários e secundários na sua estrutura, já os fenilpropanoídes são compostos aromáticos derivados de benzeno. Existe também um grupo que é constituído por estruturas variadas, esses compostos são formados pela degradação de ácidos graxos, lactonas, terpenos, glicosídeos e compostos com nitrogênio e enxofre (MORSY, 2017).

Os monoterpenos e sesquiterpenos por possuírem baixa massa molecular e alta volatilidade, são as classes de compostos que mais contribuem com o aroma dos óleos essenciais produzidos como metabólitos secundários de plantas (FELIPE; BICAS, 2016).

Os aromas produzidos pelas fontes vegetais são utilizados como forma de defesa a ataques patogênicos advindos de insetos que co-evoluem com a planta. Os terpenos presentes nesses aromas podem possuir propriedades repelentes ou deterrentes (SIMAS et al., 2004).

Dentre as espécies vegetais com maior quantidade de compostos voláteis destacam-se as pertencentes à família Myrtaceae, que contém 100 gêneros e cerca de 3000 espécies, espalhadas principalmente em regiões tropicais e subtropicais (ZOGHBI et al., 2011). No Brasil há cerca de 23 gêneros e 1000 espécies dessa família, sendo 400 espécies pertencentes ao gênero *Eugenia* que possui descrito na literatura comprovadas atividades biológicas contra o mosquito *Ae. aegypti* (STIEVEN; MOREIRA; SILVA, 2009; ZOGHBI et al., 2011; GARMUS et al., 2014). A espécie *Eugenia uniflora* é conhecida popularmente como pitanga ou cereja do Suriname (GOVINDARAJAN et al., 2018). É amplamente utilizada contra reumatismo, diarreia, cólica, dor de cabeça, dor de garganta e hipertensão (FIGUEIREDO et al., 2019) e sua composição química apresenta comumente sesquiterpenos (STEFANELLO; PASCOAL; SALVADOR, 2011). No que diz respeito ao combate a mosquitos, a *E. uniflora* apresenta propriedades larvicidas contra o *Ae. aegypti*, enquanto que o seu componente majoritário, curzereno, foi descrito na literatura como sendo capaz de

eliminar larvas de *Anopheles subpictus*, *A. albopictus* e *Culex tritaeniorhynchus* com valores de toxicidade baixos (FAMUYIWA; ADEBAJO, 2012; GOVINDARAJAN et al., 2018).

A espécie *Eugenia uvalha* também conhecida como uvalha, uvaia-do-mato e uvalheira é um arbusto que pode chegar a 15 metros de altura com tronco normalmente ereto, copa estreita, folhas simples, flores brancas e frutos amarelados (EMMERICH et al., 2014; SCALON; FILHO; RIGONI, 2004; ARMSTRONG; DUARTE; MIGUEL, 2012). Possui atividade antioxidante, anti-inflamatória, antibacteriana e antifúngica (KLEIN et al., 2018; LOPES et al., 2018). Sua composição química varia, porém o óleo essencial extraído das folhas pelo método de hidrodestilação apresenta preferencialmente sesquiterpenos e sesquiterpenos oxigenados (STIEVEN; MOREIRA; SILVA, 2009; KLEIN et al., 2018). A espécie *Algrizea minor* é relativamente nova e foi descoberta no ano de 2006 na região da Chapada Diamantina, localizada no estado da Bahia, nordeste do Brasil (SOBRAL; FARIA; PROENÇA, 2010) e possui atividade antimicrobiana, antinociceptiva e antioxidante e seu óleo essencial apresenta em sua composição química monoterpenos e sesquiterpenos (VERAS et al., 2019).

Dentro da família Myrtaceae podemos destacar as espécies *Eugenia candollena* DC, *Eugenia brejoensis* Mazine e *Eugenia piauiensis* Vellaff como exemplos de espécies com atividades larvicidas contra mosquitos *Ae. aegypti* (NEVES et al., 2017; SILVA, A et al., 2015; DIAS et al., 2015). Com atividades repelentes podemos destacar: *Melaleuca quinquinervia* Cav S.T. Blake, *Syzygium aromaticum* L., *Eucalyptus globulus* Labill e *Eucalyptus nitens* (H.Deane & Maiden) Maiden (LEYVA et al., 2012; SOUZA et al., 2019). Já atividades deterrentes de oviposição foram encontradas nas espécies *Syzygium lanceolatum* (Lam.) Wight & Arn., *Eucalyptus citriodora* Hook e *Eugenia jambolana* Lam (BENELLI; RAJESWARY; GOVINDARAJAN, 2016; CASTILHO; STASHENKO; DUQUE, 2017; PRATHIBHA; RAGHAVENDRA; VIJAYAN, 2014).

Espécies pertencentes à família Annonaceae tem sido descrita quanto a seus potenciais medicinais, acaricida, nematocida e inseticida. São comumente encontradas em regiões tropicais e subtropicais e compreende cerca de 130 gêneros e 2300 espécies (PONTES et al., 2007). No Brasil essa família possui cerca de 27

gêneros e 290 espécies, sendo o gênero *Xylopia* um dos mais abundantes e comumente encontrados na região Nordeste, bioma cerrado (BARRETO; JOHNSTON; EVANS, 2012; PONTES et al., 2007). A espécie *Xylopia sericea* é popularmente conhecida como 'embiriba', 'embira-vermelha', 'pau carne', 'pindaíba', 'pimenta da costa', 'pimenta de macaco' e 'pimenta do sertão', possuindo aplicações como analgésico e anti-inflamatório e age no combate ao reumatismo, problemas na bexiga, halitose, caries dentárias e problemas gastrointestinais (MENDES et al., 2017; FERRAZ et al., 2013). Estudos realizados por Pontes et al (2007) e Mendes et al (2017) mostraram que o óleo essencial de *X. sericea* possui em sua composição química monoterpenos e sesquiterpenos, sendo um óleo essencial de alta volatilidade passível de afetar o comportamento de artrópodes hematófagos. No que diz respeito ao combate ao *Ae. aegypti* por voláteis extraídos de fontes vegetais pertencentes à família Annonaceae, podemos destacar atividade inseticida das espécies *Guatteria hispida* (R. E. Fr.) Erkens & Maas, *Guatteria blepharophylla* Mart. e *Guatteria friesiana* (W.A. Rodrigues) Erkens & Maas, atividade larvicida pelo isolamento de alguns componentes de *Xylopia laevigata* (Mart.) R.E. Fr. e atividades repelente e de oviposição por *Cananga odorata* (Lam.) Hook.f. & Thomson (ACIOLE et al., 2011; SILVA et al., 2012; SOONWERA, 2015).

A família Fabaceae é composta por cerca de 695 gêneros e 19.000 espécies (PEREIRA et al., 2019). A espécie *Myroxylon peruiferum* L.f. é nativa do Brasil mas pode ser encontrada na Bolívia, Equador, Paraguai, Peru, Venezuela Guiana e Argentina (INDACOCHEA et al., 2018). É popularmente conhecida como 'cabriuna' e 'cabriuna-vermelha', devido o seu tronco possuir cor marrom-avermelhado, sua madeira é resistente e de qualidade, sendo vendida comercialmente (MATHIAS et al., 2000). Essa espécie também fornece uma resina cuja composição química apresenta monoterpenóides, sesquiterpenóides, álcoois e derivados de fenilpropanóides, sendo seu óleo essencial utilizado para fins medicinais (tratamento de asma e leishmaniose) e em perfumarias (LOAYZA-CABEZAS et al., 2018; MATHIAS et al., 2000). Estudos realizados por Simas et al (2004), mostraram que frações contendo terpenóides e fenilterpenóides extraídos de *M. peruiferum* foram eficazes como larvicidas contra o *Ae. aegypti*.

De maneira geral, produtos derivados de plantas compreendem misturas botânicas com inúmeros compostos químicos que podem agir de forma sinérgica em processos fisiológicos e comportamentais de artrópodes hematófagos, assim as chances de resistência causada por um ingrediente ativo isolado são mínimas, fazendo com que o uso de óleos essenciais seja uma excelente alternativa no combate a mosquitos (SUMITHA; THOPPIL, 2015).

2.5 ELETROANTENOGRRAFIA

Com o intuito de facilitar a identificação de componentes ativos o pesquisador Schneider realizou o primeiro estudo sobre eletrofisiologia no ano de 1957, onde analisava os voláteis presentes no feromônio da mariposa *Bombyx mori* (MYRICK; BAKER, 2018).

Essa técnica consiste na utilização da antena do inseto como sensor eletroantenoográfico capaz de fornecer informações sobre as respostas olfativas do inseto aos aleoquímicos (PATRICIO; CRUZ-LÓPEZ; MORGAN, 2004). Nesse processo, o estímulo químico gerado através de um “puff” do componente volátil nas sensilas dos insetos é transformado em potencial elétrico e amplificado gerando um sinal que pode indicar certa atividade da substância analisada (BERGSTRÖM, 2008). Esse processo é denominado eletroantenografia (EAG) (NAIME et al., 2006).

Afim de obter análises mais específicas e com maior sensibilidade o pesquisador Moorhouse e seus colaboradores acoplaram à eletroantenografia um cromatógrafo a gás (CG-DEA) no ano de 1969, com isso foi possível analisar os componentes ativos presentes em misturas de voláteis de maneira eficaz e com elevada sensibilidade (SCHIESTL; MARION-POLL, 2002).

Nessa técnica são acoplados os eletrodos de trabalho e de referência nas extremidades das antenas do inseto e também é utilizada uma solução salina para fechar o circuito (MORAES et al., 2008). Ao ser acoplado no cromatógrafo a gás o sistema CG-DEA recebe a mistura de componentes de forma isolada, ou seja, cada componente chega até a antena do inseto por vez, de acordo com o seu tempo de eluição (BERGSTRÖM, 2008). Ao realizar o “puff” contendo os componentes voláteis a antena do inseto pode sofrer uma despolarização gerando uma diferença de potencial que é ampliada e registrada na tela do computador na forma gráfica

denominada eletroantenograma (MYRICK; BAKER, 2018). Através do eletroantenograma é possível analisar quais substâncias são bioativas.

Na eletroantenografia é realizada uma espécie de seleção de componentes biologicamente ativos, com isso se reduz o número de ensaios feitos com espécies candidatas (OSBOURN; LANZOTTI, 2009). Esses compostos ativos provocam uma mudança comportamental no inseto que pode indicar atração ou repelência, sendo necessários bioensaios complementares capazes de revelar qual tipo de mudança de comportamento o inseto apresenta (BECK; LIGHT; GEE, 2012).

3 MÉTODOS

3.1 CRIAÇÃO DOS AE. *AEGYPTI* UTILIZADOS NOS TESTES DE REPELÊNCIA

Os mosquitos utilizados nos testes de repelência foram obtidos da colônia do Laboratório de Inovação Tecnológica e Empreendedorismo em Controle de Vetores (Lintec), localizado no Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). As larvas foram mantidas em cubas plásticas com aproximadamente 5 cm de profundidade e com água desclorada, sendo alimentadas com ração para réptil (Reptolife®). Durante a fase de pupa, os insetos foram mantidos em uma sala separada para emergência dos adultos, os quais foram mantidos em gaiolas com telas finas do tipo Bug-Dorm® (30x30x30cm) contendo solução açucarada à 10%(m/v). Os mosquitos foram mantidos em condições controladas (27±2°C, UR 70±10% e fotoperíodo 12L:12E).

3.2 CRIAÇÃO DOS AE. *AEGYPTI* UTILIZADOS NOS TESTES DE OVIPOSIÇÃO

Os mosquitos utilizados nos testes de deterência de oviposição foram obtidos da colônia do Laboratório de Ecologia Química (LEQ), localizado no Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). As larvas foram mantidas em cubas plásticas com aproximadamente 6cm de profundidade, contendo água destilada e cerca de 1g de ração para felino triturada. Na fase pupa, os mosquitos foram transferidos para copos de vidros dispostos no interior de gaiolas de metal e acrílico no tamanho (33x21x30cm), cobertas com tela contendo em seu interior solução açucarada à 10%(m/v). Os mosquitos foram mantidos em condições controladas (27±1°C, UR 70±5% e fotoperíodo de 14h).

3.3 EXTRAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos essenciais de *E. uniflora*, *E. uvalha*, *A. Minor*, *X. sericea* e *M. peruiferum* foram obtidos por hidrodestilação. As folhas frescas de cada espécie foram trituradas e postas em um balão volumétrico contendo 3L de água destilada acoplado a um aparato de Clevenger. A mistura presente no balão foi aquecida a 160°C em manta aquecedora por 3h. O óleo coletado foi mantido sob refrigeração a -24°C. Os processos de extração foram realizados em etapa única, sendo os óleos de *E. uniflora*, *E. uvalha* e *X. sericea* obtidos no Laboratório de Produtos Naturais da Universidade

Federal Rural de Pernambuco e os óleos de *A. minor* e *M. peruiferum* obtidos no Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco.

3.4 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

A identificação dos componentes presentes nos óleos essenciais estudados foi realizada através da técnica de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas CG/EM. Para a caracterização química de cada óleo essencial foi utilizado um cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas (CG-EM) Agilent 5975C, equipado com coluna apolar HP-5 (30mX0,25mm, 0,25µm, Agilent), injetor split/splitless e detector do tipo quadrupolo. Os óleos essenciais foram analisados sob as seguintes condições cromatográficas: temperatura inicial do forno de 40°C (mantida por 2min) com aquecimento a uma taxa de 4°C/min até a temperatura final de 230°C, mantida por 5 minutos. O injetor foi mantido a 250°C e hélio foi usado como gás de arraste, com fluxo de 1mL/min. As temperaturas do detector quadrupolo e da fonte de íons foram 230°C e 150°C, respectivamente, com potencial de ionização a 70eV e faixa de varredura de 35-350m/z e 1.0scan/s. Para cada análise, uma alíquota de 1µL de uma solução com concentração de 1000µL/mL do óleo essencial dissolvido em acetona foi inserida no equipamento em modo split 1:50. Em seguida, uma alíquota de uma solução de padrões de hidrocarbonetos, contendo uma série homóloga de alcanos (C9 a C30), foi analisada nas mesmas condições cromatográficas usadas para o óleo essencial. A partir da análise dos tempos de retenção dos compostos nas amostras dos óleos essenciais e dos padrões de hidrocarboneto foi calculado o índice de retenção para cada componente dos óleos, segundo a equação de Kratz.

Os compostos foram identificados a partir dos espectros de massa de cada pico cromatográfico, usando comparações dos índices de retenção calculados com os índices de retenção disponíveis na base de dados do laboratório e verificação com padrões autênticos. A quantificação dos componentes presentes nos óleos essenciais foi realizada em um cromatógrafo gasoso (CG), com detector de ionização por chama (DIC) (Thermo Trace GC Ultra, Thermo Scientific, Milan, Italy) equipado com coluna HP-5 (30mx0.25mmx 0.25µm, Agilent) e injetor split/splitless. A programação de temperatura no cromatógrafo gasoso foi a mesma utilizada nas análises por CG-EM.

3.5 MÉTODO DE CAPTURA DOS MOSQUITOS UTILIZADOS NOS TESTES DE REPELÊNCIA

Para realização dos bioensaios de repelência foram capturados apenas mosquitos fêmeas que estavam há 12h sem alimentação. A captura dos mosquitos se deu através da busca de inseto vetor por repasto sanguíneo na qual uma pluma de odor humano era enviada aos insetos por fluxo de ar. A gaiola tipo Bug-Dorm® na qual os mosquitos eram mantidos foi colocada dentro de uma gaiola de seleção com dimensão (50x50x50cm), essa gaiola de seleção continha um espaço para encaixe da gaiola de liberação na qual era posta a palma da mão que servia como atrativo para os mosquitos. Esse odor humano chegava até os mosquitos presentes na gaiola Bug-Dorm® através de um sistema de exaustão, acoplado na gaiola de seleção, que os fazia voarem até o interior da gaiola de liberação (Figura 9). Posteriormente, os mosquitos eram aprisionados e levados para o olfatômetro de dupla-escolha (POSEY; SCHRECK, 1981).

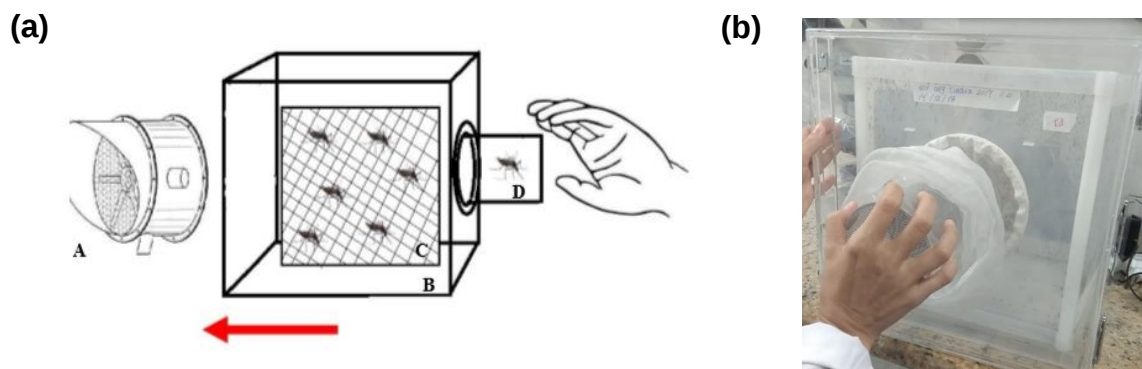


Figura 9- Método de captura de insetos (a) A = Exaustor, B= Gaiola de seleção, C= Gaiola Bug-Dorm®, D= Gaiola de liberação. (b) Captura dos insetos.

Fonte: Adaptado de PAIXÃO, 2011.

3.6 MÉTODO DE CAPTURA DOS MOSQUITOS UTILIZADOS NOS TESTES DE OVIPOSIÇÃO

Para realização dos testes de deterência de oviposição foram capturadas 10 fêmeas de *A.aegypti* que tinham recebido alimentação sanguínea há 3 dias. Os mosquitos utilizados tinham idade entre 5 e 10 dias e foram capturados utilizando “Capturador manual de Castro”.

3.7 OLFATÔMETRO DE DUPLA ESCOLHA USADO NOS TESTES DE REPELÊNCIA

O olfatômetro é composto por uma gaiola de liberação conectada a um tubo principal em acrílico (90cm de comprimento x 12cm de diâmetro), uma caixa de escolha e dois tubos de escolha (36,5cm de comprimento e 12cm de diâmetro) conectados diretamente à dois tubos de liberação de estímulos, nos quais as amostras avaliadas eram posicionadas de forma randômica. As amostras eram aplicadas em papel de filtro de tamanho de 4cm de comprimento x 2cm de largura e presas ao tubo de liberação de estímulos por clipe metálico (Figura 10).

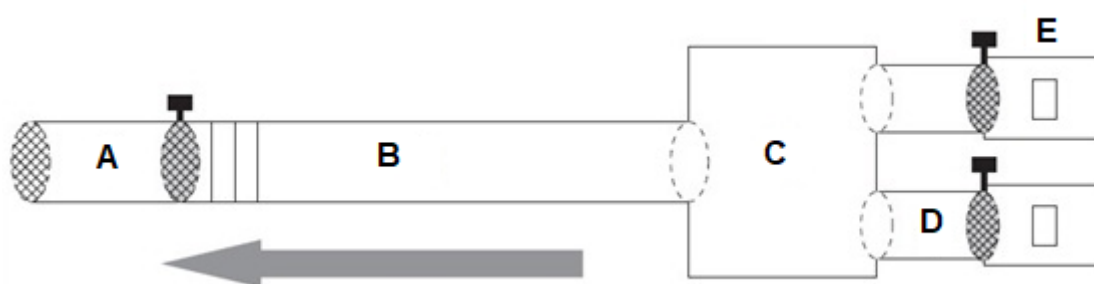


Figura 10- Ilustração dos componentes e funcionalidade do olfatômetro de dupla escolha. (A) Gaiola de liberação dos mosquitos; (B) Tubo principal; (C) Caixa de escolha; (D) Tubo de escolha; (E) Tubo de liberação de estímulo, onde os tratamentos avaliados foram posicionados de forma randômica em papéis de filtros presos por cliques metálicos.

O olfatômetro é conectado à um sistema de exaustão (Qualitas®, CQ1T4 SC - Motor WEG, potência: 0,5 HP), o qual gera um fluxo de ar na velocidade de 0,32m/s (MOTA, 2003). O fluxo de ar era filtrado por uma manta de carvão ativado, umidificado e aquecido por um tanque de água, antes de entrar no olfatômetro (Figura 11).

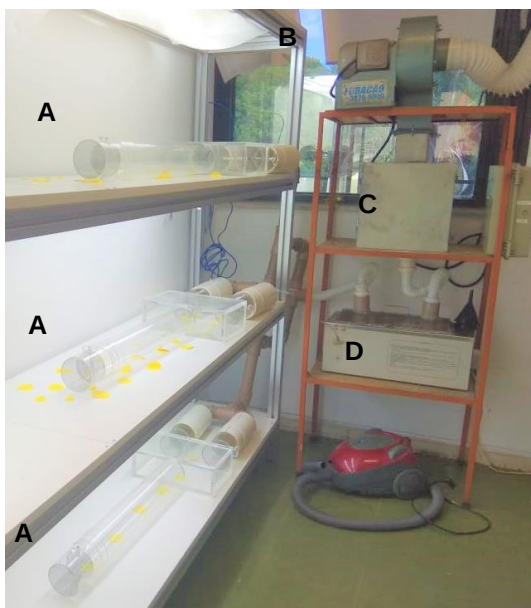


Figura 11- Sistema para estudos de comportamento de insetos (A) Olfatômetro de dupla escolha; (B) Sistema de exaustão; (C) Carvão ativado; (D) Banho maria adaptado

Figura 11- Sistema para estudos de comportamento de insetos (A) Olfatômetro de dupla escolha; (B) Sistema de exaustão; (C) Carvão ativado; (D) Banho maria adaptado.

3.8 CALIBRAÇÃO DO OLFATÔMETRO

Afim de verificar se havia alguma preferência dos mosquitos por quaisquer dos lados do tubo de liberação de estímulos realizamos o teste de tendência lateral. Os mosquitos presentes na gaiola de liberação foram aclimatizados à $27 \pm 2^\circ\text{C}$ por 15 min e posteriormente foram acoplados ao olfatômetro onde foram novamente aclimatizados à $27 \pm 2^\circ\text{C}$ por 5min. Após aclimatizações foram realizados os testes de tendência lateral utilizando 15 ± 3 fêmeas à 12h de jejum. O teste teve duração de 1min e ambos os lados do tubo de liberação de estímulos estavam sem odor. Foram realizadas 15 repetições para cada tratamento, de forma randômica. Ao final de cada teste foram contados o número de mosquitos presentes em cada lado do tubo de liberação de estímulos.

Um segundo teste foi realizado para verificar se os mosquitos estavam respondendo ao estímulo de um odor atrativo, chamamos de teste de atividade de voo. Os mosquitos presentes na gaiola de liberação foram aclimatizados à $27 \pm 2^\circ\text{C}$ por 15min e posteriormente foram acoplados ao olfatômetro onde passaram por aclimatização à $27 \pm 2^\circ\text{C}$, durante 5 min. Um lado do tubo de liberação de estímulos

continha um odor atraente (odor humano) e o outro lado do tubo de liberação de estímulos estava sem odor, foram realizadas 15 repetições em cada tratamento de forma randômica e cada teste teve duração de 1min. Ao final de cada tratamento foram contados o número de mosquitos presentes em cada lado do tubo de liberação de estímulos.

3.9 BIOENSAIOS DE REPELÊNCIA

Os bioensaios de repelência foram realizados em olfatômetro de dupla escolha. Durante os bioensaios foram testadas as concentrações 0,05; 0,5; 5; 50 e 500 ppm dos óleos essenciais de *E. uniflora*, *E. uvalha*, *A. Minor*, *X. sericea* e *M. peruiferum* em acetona. As concentrações escolhidas estão dentro da faixa de concentrações testadas por Uniyal et al., (2016) e a acetona foi utilizada como solvente por apresentar boa solubilidade em todos os óleos testados.

No início de cada teste os mosquitos presentes na gaiola de liberação, foram mantidos, sob condições ambientais, durante 15min para aclimação. Após esse período, a gaiola de liberação com os mosquitos foi acoplada ao olfatômetro e mantidos sob o fluxo de ar por um período de mais 5min para uma nova aclimação e em seguida os mosquitos foram liberados dentro do olfatômetro e seguiram em direção à pluma de odor por um período de 1min. Foram realizadas 15 repetições para cada tratamento, utilizando 15 ± 3 fêmeas por repetição com idades entre 5 e 10 dias.

3.10 BIOENSAIOS DE OVIPOSIÇÃO

Foram preparadas duas soluções estoque à 100ppm, sendo uma usada como controle e a outra como teste. A solução teste continha a amostra, hexano e Tween® 80 formando uma microemulsão, enquanto a solução controle continha os mesmos componentes da solução teste excluindo a amostra. Ambas soluções estoque foram diluídas para uso nos testes de oviposição. Para o óleo de *E. uniflora* foram usadas as concentrações de 50 e 5ppm. Para os compostos isolados foi utilizada apenas a concentração de 5ppm. Nos experimentos de oviposição 25mL das soluções controle e teste foram postos em copos de vidro contendo papel de filtro em seu interior no tamanho (12x12) cm. Os copos foram distribuídos de forma randômica em 8 gaiolas de metal e acrílico (33x21x30) cm, cobertas com tecido, contendo 10 fêmeas em seu

interior que haviam sido alimentadas com sangue há 3 dias. As fêmeas foram deixadas no escuro por um período de 16h, para posterior contagem do número de ovos em cada gaiola.

3.11 ANÁLISE ELETROFISIOLÓGICA.

Nesse tipo de análise, investigamos quais compostos presentes no óleo essencial apresentaram estímulo na antena dos mosquitos. Os testes foram realizados em um cromatógrafo gasoso com detector de ionização de chama (Thermo Trace GC Ultra, Thermo Scientific, Milan, Italy) acoplado a um detector eletroantenográfico (Syntech, Kirchzarten, Germany) o qual inclui um módulo controlador da temperatura da linha de transferência (TC-02), um módulo controlador de estímulos (CS-55), um módulo que controla a aquisição de dados captados pelos eletrodos (IDAC4) e um divisor de fluxo que permite que os compostos que saem da coluna cromatográfica cheguem ao mesmo tempo ao detector DIC e à antena do mosquito.

O cromatógrafo gasoso foi equipado com uma coluna apolar HP-5 (50mx0.25 mmx0.25µm, Agilent). Nitrogênio foi usado como gás de arraste, mantido a fluxo constante de 1mL/min. A temperatura inicial do forno foi de 100°C (mantida por 1min), programada para aumentar até 210°C a uma velocidade de aquecimento de 7°C/min. A temperatura final foi mantida por 2min. O injetor e o detector foram mantidos a 250°C e a linha de transferência para o DEA foi aquecida a 220°C. Um fluxo de ar limpo e umidificado direcionado à antena montada carrega os estímulos químicos. A antena foi montada entre dois capilares de vidro preenchidos com solução de Ringer (solução salina contendo 8.0g/L NaCl, 0.4g/L KCl, 0.4g/L CaCl₂ em água destilada). Um eletrodo de fio de prata foi inserido em cada capilar, permitindo o fechamento do circuito elétrico (Figura 12).

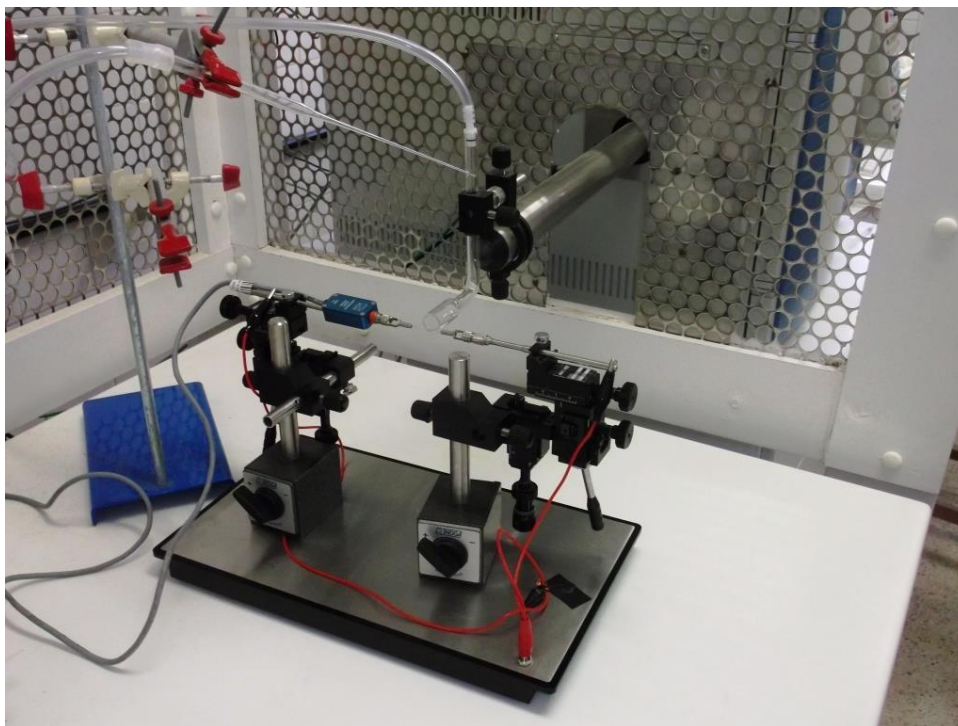


Figura 12- Detector eletroantenográfico acoplado ao cromatógrafo gasoso (CG-DEA).

Para montagem das antenas foram utilizados mosquitos fêmeas com idades entre 2 e 7 dias à 24h sem alimentação. Os insetos foram postos em estado de dormência através de refrigeração (4°C durante 15 a 20min) para posterior decapitação de sua cabeça com lâmina de bisturi. A cabeça do mosquito foi então colocada num capilar contendo solução de Ringer e a ponta distal de uma das antenas foi cortada. O capilar contendo a cabeça do mosquito foi inserido em um dos eletrodos do detector eletroantenográfico (DEA) e a ponta cortada da antena foi conectada ao capilar presente no segundo eletrodo, fechando o circuito (Figura 13). Foram considerados compostos eletrofisiologicamente ativos aqueles para os quais foi observada resposta em pelo menos cinco indivíduos. Para os ensaios eletrofisiológicos foram preparadas soluções de óleos essenciais na concentração de 6000 ppm, usando acetona como veículo. Pelo menos 50 testes eletroantenográficos foram realizados no total.



Figura 13- Cabeça do *Ae. aegypti* acoplada ao capilar contendo solução de Ringer.

3.12 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS MAJORITÁRIOS

O óleo essencial de *E. uniflora* foi diluído em clorofórmio, padrão analítico, na proporção 1:10 (v/v) e seus compostos majoritários foram separados em uma placa de sílica gel (cromatofolha de alumínio com sílica gel 60 e indicador UV254, dimensões de 20x20 cm, espessura de 0,20mm, marca Macherey-Nagel), com dicloro-hexano na proporção 1,5:1(v/v) como eluente e revelação em lâmpada ultravioleta com $\lambda=294$ nm. Foram obtidas 6 frações (F1-F6) e cada fração foi analisada em cromatógrafo gasoso (CG) no modo split 1:10, com programação similar a descrita nas condições analíticas. A fração F5 correspondeu ao curzereno e a fração F6 ao germacrona, ambos com mais de 85% de pureza.

3.13 ANÁLISE DE DADOS PARA OS TESTES DE REPELÊNCIA

Nos testes de tendência lateral e atividade de voo os valores presentes nos braços controle e teste foram convertidos em percentual, sofreram transformações angular do tipo arco-seno e foram analisados quanto a normalidade usando o teste de Shapiro-Wilk no programa PAST® com nível de confiança de 95%. Com os dados normalizados foram aplicados os testes t de student não pareados a 5% de significância no programa MINITAB® 19.

O percentual de repelência (PR) foi calculado a partir do número de mosquitos presentes no controle (C) menos o número de mosquitos presentes no teste (T) dividido pelo número de mosquitos no controle mais o número de mosquitos no teste, conforme descrito por Uniyal et al., 2006 (Equação 1).

$$PR = \frac{(C - T) * 100}{(C + T)} \quad \text{(Equação 1)}$$

Os valores obtidos foram analisados estatisticamente através do teste de Shapiro-Wilk no programa PAST® com nível de confiança de 95% e todos obtiveram um valor de $p > 0,05$, indicando normalidade nos dados. Esses percentuais de repelência foram analisados usando ANOVA de uma via para determinação de variância e diferença honestamente significativa (DHS) pelo teste de Tukey a 5% de significância usando o programa MINITAB® 19.

3.14 ANÁLISE DE DADOS PARA OS TESTES DE OVIPOSIÇÃO

O percentual de repelência de oviposição em cada gaiola foi calculado a partir da contagem do número de ovos no papel de filtro de cada amostra, dividido pelo número de ovos totais. De posse de todos os percentuais, foi calculada a média geral em cada amostra e aplicado o teste t de student, não pareado, no programa MINITAB® 19, para avaliar se havia diferença significativa entre as médias à 95% de confiabilidade.

4 ATIVIDADE REPELENTE DE ÓLEOS ESSENCIAIS DA REGIÃO NORDESTE DO BRASIL CONTRA PICADAS DE *Ae. aegypti* (CULICIDAE, DIPTERA)

Atividade repelente de óleos essenciais da região Nordeste do Brasil contra picadas de *Ae. aegypti* (Culicidae, Diptera)

*Repellent activity of essential oils from the Northeast region of Brazil against bites of *Ae. aegypti* (Culicidae, Diptera)*

Edna Barboza de Lima^{1*}, Márcia Vanuza da Silva², Cláudio Augusto Gomes da Câmara³, Kelly da Silva Paixão⁴, Álvaro Eduardo Eiras⁵, Geanne Karla Novais Santos⁶, Daniela Maria do Amaral Ferraz Navarro⁷

¹ Doutoranda em Biotecnologia – Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO) – UFPE. Avenida Jornalista Anibal Fernandes, s/n, Cidade Universitária 50740-560, Recife, PE, Brazil, email: ednabarbozalima@gmail.com (autor correspondente), Telefone: (81) 99740-8063.

² Professora Associada do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

³ Professor Titular do Departamento de Química da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

⁴ Doutora em Ciências pela Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

⁵ Professor Titular do Departamento de Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

⁶ Doutora em Química pela Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

⁷ Professora Associada do Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

RESUMO

O *Aedes aegypti* pode transmitir inúmeras arboviroses como dengue, zika e chikungunya e chega a atingir mais de 400 milhões de pessoas anualmente. Como não há vacina totalmente eficaz, no combate a dengue, zika e chikungunya, e o uso de inseticidas vem sendo atrelado a processos de resistência de mosquitos, o uso de repelentes naturais é cada vez mais utilizado como medida protetora capaz de afastar mosquitos de hospedeiros, de forma segura e eficaz. Aqui analisamos o efeito repelente dos óleos de *Eugenia uniflora*, *Eugenia uvalha*, *Algrizea Minor*, *Xylopia sericea* e *Myroxylon peruiferum* contra fêmeas de *Ae. aegypti*. Os óleos essenciais foram extraídos por hidrodestilação à 160°C durante 3h e mantidos sob refrigeração à -24°C. Bioensaios de repelência em olfatômetro de dupla escolha, foram realizados com DEET (controle positivo) e com os óleos essenciais, diluídos em acetona nas concentrações 0,05; 0,5; 5; 50 e 500ppm utilizando olfatômetro contendo 15±3 fêmeas de *Ae. aegypti* em jejum por 12h. Os óleos essenciais analisados apresentaram vários perfis de repelência, sendo o óleo de *E. uniflora* mais efetivo na concentração de 5 ppm, com 26,01% de taxa de repelência. Os testes estatísticos revelaram que o controle positivo apresentou maior taxa de repelência, diferindo de todos os óleos analisados, e que dos óleos essenciais testados o óleo de *E. uniflora* apresentou melhor taxa de repelência efetiva. De maneira geral, o óleo de *E. uniflora* apresentou melhor eficácia repelente que todos os óleos analisados, sendo capaz de repelir melhor em concentrações mais baixas.

Palavras-chave: Respostas sensoriais. Bioensaios. Olfatômetro de dupla escolha. Repelente natural.

ABSTRACT

Aedes aegypti can transmit numerous arboviruses such as dengue, zika and chikungunya and reaches more than 400 million people annually. As there is no fully effective vaccine to combat dengue, zika and chikungunya, and the use of insecticides has been linked to resistance processes by mosquitoes, the use of natural repellents is increasingly used as a protective measure capable of keeping mosquitoes away from hosts, safely and effectively. Here we analyze the repellent effect of the oils of *Eugenia uniflora*, *Eugenia uvalha*, *Algrizea Minor*, *Xylopia sericea* and *Myroxylon peruiferum* against *Ae. aegypti* females. The essential oils were extracted by hydrodistillation at 160°C for 3h and kept under refrigeration at -24°C. Repellency bioassays in a double choice olfactometer, were performed with DEET (positive control) and with essential oils, diluted in acetone in concentrations 0.05; 0.5; 5; 50 and 500 ppm using an olfactometer containing 15±3 *Ae. aegypti* females fasting for 12 hours. The essential oils analyzed showed several repellency profiles, with *E. uniflora* oil being more effective in the concentration of 5 ppm, with 26.01% repellency rate. Statistical tests revealed that the positive control showed a higher rate of repellency, differing from all the oils analyzed, and that of the essential oils tested, *E. uniflora* oil had a better rate of effective repellency. In general, *E. uniflora* oil showed better repellent efficacy than all the oils analyzed, being able to repel better at lower concentrations.

Keyword: Sensory responses. Bioassays. Double choice olfactometer. Natural repellent.

1. INTRODUÇÃO

O mosquito *Aedes aegypti* é o transmissor dos patógenos causadores da dengue, zika e chikungunya, chegando a infectar mais de 400 milhões de pessoas anualmente. Sua distribuição geográfica é definida predominantemente por fatores climáticos, sendo encontrado mais facilmente em regiões de climas tropicais e subtropicais (MATTHEWS et al., 2018).

No ano de 2015 o Brasil passou por uma tríplice epidemia viral e o ministério da saúde decretou estado de emergência de saúde pública. A região nordeste do país foi um dos locais onde houve um maior número de casos de enfermidades transmitidas pelo *Ae. aegypti*. Nessa região o clima costuma ser predominante quente durante todo o ano e o abastecimento de água é precário em algumas localidades, assim a população costuma armazenar água em containers abertos facilitando o desenvolvimento e a proliferação do vetor (AUGUSTO et al., 2016).

O Ministério da saúde realizou campanhas e voltou sua atenção para o combate ao mosquito, de forma mais intensa e ativa, durante o ano de 2016 com o intuito de reduzir o número de enfermidades. O uso de inseticidas foi um dos métodos mais adotados para combater a proliferação desse vetor, porém o uso indiscriminado desse agente químico pode ter desencadeado um processo de resistência nas populações de *Ae. aegypti*. (RODRIGUEZ et al., 2015).

O uso de repelentes tópicos e espaciais é uma das maneiras adotadas para evitar o contato do vetor com o hospedeiro e a exposição a doença. Repelentes a base de DEET, picaridina, IR 3535 e p-mentano-3,8-diol atuam diretamente nos receptores olfativos, localizados nas antenas dos mosquitos e modificam a atividade de voo desse inseto vetor frente a pluma de odor liberada pelo hospedeiro (XU et al., 2015).

O NN-dietil-3-metilbenzamida (DEET) é o repelente mais usado comercialmente para combater o *Ae. aegypti*, porém estudos mostraram que esse composto pode causar irritação na pele, neurotoxicidade e tem ação plastificante, além de causar resistência nos mosquitos (DENNIS; GOLDMAN; VOSSHALL, 2019).

Os repelentes naturais advindos de óleos essenciais podem ser uma alternativa viável ao uso de produtos sintéticos capaz de repelir insetos vetores de seus

hospedeiros e reduzir os impactos na saúde pública. Produtos à base de fontes naturais possuem um longo histórico de uso e relatos na literatura de baixa toxicidade e boa biodegradabilidade, além de possuírem uma quantidade muito grande de componentes voláteis o que dificulta a resistência do mosquito a um determinado composto químico (SARMA et al., 2019).

Óleos essenciais de *Syzygium aromaticum* L., *Eucalyptus saligna* Sm., *Eucalyptus globulus* Labill, *Eucalyptus nitens* (H.Deane & Maiden) Maiden, *Myrica gale* L. e *Melaleuca quinquinervia* Cav S.T. Blake, plantas pertencentes à família Myrtaceae, são alguns exemplos de fontes naturais descritas na literatura com poder repelente contra *Ae. aegypti* pertencentes a família Myrtaceae (SOUZA et al., 2019).

A família Myrtaceae é uma das fontes naturais com maior quantidade de compostos voláteis e que apresenta numerosas espécies com atividades repelentes contra mosquitos. Já as famílias Annonaceae e Feltaceae possuem espécies cuja composição química do seu óleo essencial apresenta grande quantidade de monoterpenos e sesquiterpenos, componentes com elevada volatilidade capazes de atuar nos receptores olfativos de artrópodes hematófagos afetando o seu comportamento frente a plumas de odor atrativas (AZEEM et al., 2019).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade repelente dos óleos essenciais de *Eugenia uniflora* L., *Eugenia uvalha* Cambess, *Algrizea Minor* Sobral, Faria & Proença (Myrtaceae), *Xylopia sericea* A.St.-Hil (Annonaceae) e *Myroxylon peruiferum* L.f. (Feltaceae) obtidos na região nordeste do Brasil, contra picadas de *Ae. aegypti*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 CRIAÇÃO DO *Ae. aegypti*

Os ovos que deram origem as larvas e posteriormente aos mosquitos utilizados nos testes foram obtidos e criados no insetário do laboratório de inovação tecnológica e empreendedorismo em controle de vetores (Lintec), localizado no Departamento de Parasitologia na Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

A criação dos ovos se deu em cubas plásticas contendo aproximadamente 5cm de profundidade com água desclorada e ração de réptil (Reptolife®) para eclosão e desenvolvimentos de larvas que posteriormente deram origem as pupas.

As pupas obtidas foram coletadas das cubas, postas em potes plásticos e mantidas em gaiolas com telas finas do tipo Bug-Dorm® com as dimensões 30x30x30cm. Os mosquitos que se desenvolveram foram mantidos em Bug-Dorm® na temperatura de $27\pm 2^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $70\pm 10\%$, fotoperíodo de 12L:12E e alimentação a base de solução açucarada à 10%(m/v).

2.2 MATERIAL VEGETAL

As folhas de *E. uniflora*, *E. uvalha* e *X. sericea* foram coletadas na Universidade Federal Rural de Pernambuco, localizada na Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Recife-PE e ambas foram autenticadas por Câmara, C. A. G, sendo uma exsicata de cada espécie depositada no Herbário Professor Vasconcelos Sobrinho da Universidade Federal Rural de Pernambuco (*E. uniflora* exsicata: PEUFR 48490, *E. uvalha* exsicata: PEUFR 48216 e *X. sericea* exsicata: PEUFR 48090). Já as folhas de *A. minor* e *M. peruiferum* foram coletadas no Vale do Catimbau, localizado na cidade de Buíque e ambas foram autenticadas por Gomes, A. S, sendo uma exsicata de cada espécie depositada no Herbário Dárdaro de Andrade Lima, do Instituto Agrônomo de Pernambuco (*A. minor* exsicata: IPA 78999 e *M. peruiferum*: exsicata: IPA 84110).

2.3 ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos essenciais de *E. uniflora*, *E. uvalha*, *A. minor*, *X. sericea* e *M. peruiferum* foram obtidos por hidrodestilação. As folhas frescas de cada espécie foram trituradas e postas em um balão volumétrico contendo 3L de água destilada acoplado

a um aparato de Clevenger. A mistura presente no balão foi aquecida a 160°C em manta aquecedora por 3h. O óleo coletado foi mantido sob refrigeração a -24°C. Os processos de extração foram realizados em etapa única, sendo os óleos de *E. uniflora*, *E. uvalha* e *X. sericea* obtidos no Laboratório de Produtos Naturais da Universidade Federal Rural de Pernambuco e os óleos de *A. minor* e *M. peruiferum* obtidos no Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco.

2.4 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

A identificação dos componentes presentes nos óleos essenciais estudados foi realizada através da técnica de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas CG/EM. Para a caracterização química de cada óleo essencial foi utilizado um cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas (CG-EM) Agilent 5975C, equipado com coluna apolar HP-5 (30mX0,25mm, 0,25µm, Agilent), injetor split/splitless e detector do tipo quadrupolo. Os óleos essenciais foram analisados sob as seguintes condições cromatográficas: temperatura inicial do forno de 40°C (mantida por 2 minutos) com aquecimento a uma taxa de 4°C/min até a temperatura final de 230°C, mantida por 5 minutos. O injetor foi mantido a 250°C e hélio foi usado como gás de arraste, com fluxo de 1 mL/min. As temperaturas do detector quadrupolo e da fonte de íons foram 230°C e 150°C, respectivamente, com potencial de ionização a 70eV e faixa de varredura de 35-350m/z e 1.0scan/s. Para cada análise, uma alíquota de 1µL de uma solução com concentração de 1000µL/mL do óleo essencial dissolvido em acetona foi inserida no equipamento em modo split 1:50. Em seguida, uma alíquota de uma solução de padrões de hidrocarbonetos, contendo uma série homóloga de alcanos (C9 a C30), foi analisada nas mesmas condições cromatográficas usadas para o óleo essencial. A partir da análise dos tempos de retenção dos compostos nas amostras dos óleos essenciais e dos padrões de hidrocarboneto foi calculado o índice de retenção para cada componente dos óleos, segundo a equação de Kratz.

Os compostos foram identificados a partir dos espectros de massa de cada pico cromatográfico, usando comparações dos índices de retenção calculados com os índices de retenção disponíveis na base de dados do laboratório e verificação com padrões autênticos. A quantificação dos componentes presentes nos óleos essenciais

foi realizada em um cromatógrafo gasoso (CG), com detector de ionização por chama (DIC) (Thermo Trace GC Ultra, Thermo Scientific, Milan, Italy) equipado com coluna HP-5 (30m x0.25mmx0.25µm, Agilent) e injetor split/splitless. A programação de temperatura no cromatógrafo gasoso foi a mesma utilizada nas análises por CG-EM.

2.5 MÉTODO DE CAPTURA DOS MOSQUITOS

Para a realização dos bioensaios de repelência foram selecionados fêmeas que estavam em jejum por 12h. Para a seleção dos mosquitos foi utilizada uma gaiola de seleção (50x50x50cm), na qual foi adicionada em seu interior gaiola Bug-Dorm® contendo os mosquitos. A gaiola de seleção continha um espaço para encaixe de uma gaiola de liberação, na qual era posta a palma da mão (atrativo para os mosquitos) para gerar uma pluma de odor, através de um sistema de exaustão, que fazia os mosquitos voarem até o interior da gaiola de liberação (POSEY; SCHRECK, 2011). Essa metodologia foi utilizada para evitar qualquer dano nos mosquitos, pois é necessário que se mantenha a integridade do inseto para detecção de mudança comportamental respondida aos estímulos.

2.6 CALIBRAÇÃO DO OLFATÔMETRO

Afim de verificar se havia alguma preferência dos mosquitos por quaisquer dos lados do tubo de liberação de estímulos realizamos o teste de tendência lateral. Os mosquitos presentes na gaiola de liberação foram aclimatizados à $27\pm2^{\circ}\text{C}$ por 15min e posteriormente foram acoplados ao olfatômetro onde foram aclimatizados novamente à $27\pm2^{\circ}\text{C}$ por 5min. Após aclimatações foram realizados os testes de tendência lateral utilizando 15 ± 3 fêmeas à 12h de jejum. O teste teve duração de 1min e ambos os lados do tubo de liberação de estímulos estavam sem odor. Foram realizadas 15 repetições para cada tratamento, de forma randômica. Ao final de cada teste foram contados o número de mosquitos presentes em cada lado do tubo de liberação de estímulos.

Um segundo teste foi realizado para verificar se os mosquitos estavam respondendo ao estímulo de um odor atrativo, chamamos de teste de atividade de voo. Os mosquitos presentes na gaiola de liberação foram aclimatizados à $27\pm2^{\circ}\text{C}$ por 15min e posteriormente foram acoplados ao olfatômetro onde passaram por

aclimatização à $27\pm 2^{\circ}\text{C}$, durante 5min. Um lado do tubo de liberação de estímulos continha um odor atraente (odor humano) e o outro lado do tubo de liberação de estímulos estava sem odor, foram realizadas 15 repetições em cada tratamento de forma randômica e cada teste teve duração de 1min. Ao final de cada teste foram contados o número de mosquitos presentes em cada lado do tubo de liberação de estímulos.

2.7 BIOENSAIOS DE REPELÊNCIA

Os bioensaios de repelência foram realizados em olfatômetro de dupla escolha. Durante os bioensaios foram testadas as concentrações 0,05; 0,5; 5; 50 e 500ppm dos óleos essenciais de *E. uniflora*, *E. uvalha*, *A. Minor*, *X. sericea* e *M. peruiferum* em acetona. Cada concentração foi testada 15 vezes utilizando 15 ± 3 insetos famintos de *Ae. aegypti* fêmea com idades entre 5 e 10 dias. As concentrações escolhidas estão dentro da faixa de concentrações testadas por Uniyal et al., 2016 e a acetona foi utilizada com solvente porque apresentou boa solubilidade em todos os óleos testados.

O olfatômetro era composto por uma gaiola de liberação conectada a um tubo principal em acrílico com dimensões (90cm de comprimento x 12cm de diâmetro), uma caixa de escolha e dois tubos de escolha (36,5cm de comprimento e 12cm de diâmetro) que estavam ligados diretamente a dois tubos de liberação de estímulos na qual eram postas as amostras controle e teste umectadas em papel filtro com dimensões 4,0x2,0cm. As amostras eram postas de forma randômica nos tubos de liberação de estímulos.

Um sistema de exaustão (Qualitas ®, CQ1T4 SC - Motor WEG, potência: 0,5HP) estava conectado ao olfatômetro, no qual enviava um fluxo de ar na velocidade de 0,32m/s ao sistema (MOTA, 2003). Esse ar era filtrado por filtros de carvão ativado, aquecido e umidificado por um tanque de água, antes de entrar no olfatômetro.

Durante os testes, a corrente de ar era responsável por levar a pluma de odor contida nos papéis de filtro umidificados, presentes nos tubos de liberação de estímulos, até o sistema olfativo dos mosquitos.

No início de cada teste os mosquitos presentes na gaiola de liberação eram mantidos aclimatizados à temperatura de $27\pm 2^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de $70\pm 10\%$,

durante 15min, após esse tempo os mosquitos eram postos no olfatômetro e mantidos aclimatizados sob o fluxo de ar horizontal vindo do exaustor por um período de mais 5min. Após toda aclimatização os mosquitos eram liberados dentro do olfatômetro e os mesmos seguiriam em direção a pluma de odor por um período de 1min.

2.8 ANÁLISE DOS DADOS

Nos testes de tendência lateral e atividade de voo os valores presentes nos braços controle e teste foram convertidos em percentual, sofreram transformações angular do tipo arco-seno e foram analisados quanto a normalidade usando o teste de Shapiro-Wilk no programa PAST® com nível de confiança de 95%. Com os dados normalizados foram aplicados os testes t de student não pareados a 5% de significância no programa MINITAB® 19.

O percentual de repelência (PR) foi calculado a partir do número de mosquitos presentes no controle (C) menos o número de mosquitos presentes no teste (T) dividido pelo número de mosquitos no controle mais o número de mosquitos no teste, conforme descrito por Uniyal et al., 2006 (Equação 1).

$$PR = \frac{(C - T) * 100}{(C + T)} \quad \text{(Equação 1)}$$

Os valores obtidos foram analisados estatisticamente através do teste de Shapiro-Wilk no programa PAST® com nível de confiança de 95% e todos obtiveram um valor de $p > 0,05$, indicando normalidade nos dados. Esses percentuais de repelência foram analisados usando ANOVA de uma via para determinação de variância e diferença honestamente significativa (DHS) pelo teste de Tukey a 5% de significância usando o programa MINITAB® 19.

3. RESULTADOS

3.1 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

Por meio de hidrodestilação foi possível extrair os óleos de *E. uniflora*, *E. uvalha*, *X. sericea*, *A. minor* e *M. peruiferum*, ambos com rendimentos superiores a 1%. Nas três primeiras espécies houve uma prevalência de sesquiterpenos oxigenados, somando mais de 55%. Já os óleos de *A. minor* e *M. peruiferum* apresentaram maior quantidade de compostos pertencentes a classe dos sesquiterpenos, somando mais de 40% (Tabela 1).

Tabela 1- Classes de compostos presentes nos óleos essenciais de *E. uniflora*, *E. uvalha*, *X. sericea*, *A. minor* e *M. peruiferum*.

Classes de compostos	<i>E. uniflora</i>	<i>E. uvalha</i>	<i>X. sericea</i>	<i>A. minor</i>	<i>M. peruiferum</i>
Monoterpenos	0	0	0,2	0	26,49
Sesquiterpenos	18,9	27,13	40,57	99,86	42,72
Sesquiterpenos oxigenados	65,07	60,1	55,88	0,03	16,07
Total	83,97	87,23	96,65	99,89	85,28

3.2 RESPOSTA COMPORTAMENTAL DE *AE. AEGYPTI* PARA ÓLEOS ESSENCIAIS

Inicialmente testamos ambos os lados dos tubos de liberação de estímulos, sem odor, para verificar a tendência lateral. A proporção de mosquitos que escolheram os braços controle ou teste não diferiu significativamente ($p = 0,718$, teste t não pareado, $n=15$) (Figura 1). Isso indicou que não havia preferência dos mosquitos por quaisquer dos lados do tubo de liberação.

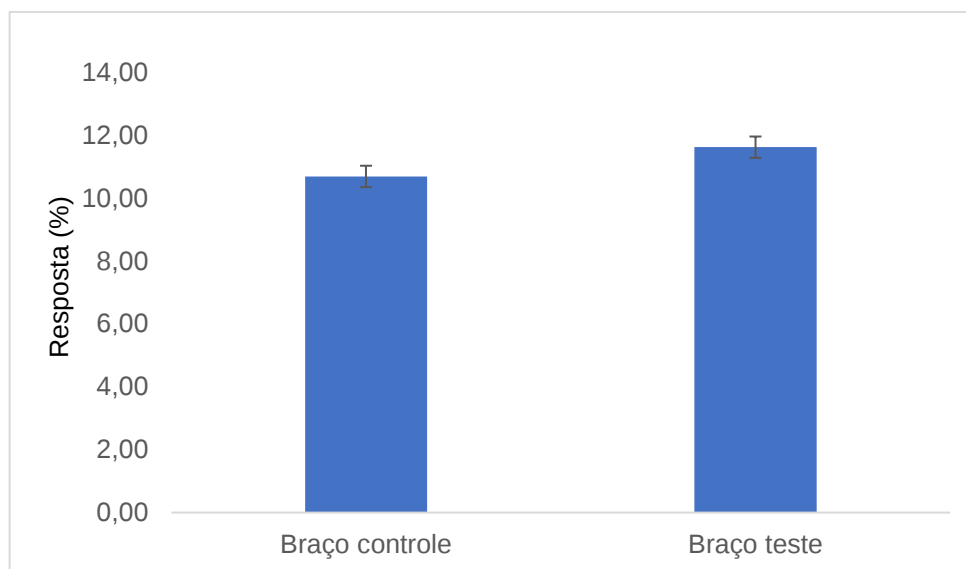


Figura 1- Percentual de mosquitos no tubo de liberação de estímulos (Percentagem média $\pm$ E.P) (n=15) nos braços controle e teste ($p=0,718$, teste t) (n=15).

Um segundo teste foi realizado para verificar a atividade de voo dos mosquitos, usando odor humano (atraente) em um dos lados do tubo de liberação de forma randômica. O percentual de mosquitos atraídos pelo odor humano foi de $70,19 \pm 5,04\%$ ($p < 0,0001$, teste t não pareado, $n=15$), indicando que houve diferença significativa entre os lados do tubo de liberação, ou seja, os mosquitos responderam ao estímulo.

Após verificar que não havia tendência lateral e que os mosquitos estavam ativos foram realizados os testes comportamentais do *Ae. aegypti* frente aos óleos essenciais de *E. uniflora*, *E. uvalha*, *X. sericea*, *A. minor* e *M. peruiferum* em olfatômetro de dupla escolha e posterior comparação com o repelente comercial DEET (Tabela 2).

Tabela 2- Repelência percentual e erro padrão de *E. uniflora*, *E. uvalha*, *X. sericea*, *A. minor*, *M. peruiferum* e DEET.

Composto	% Média de repelência $\pm$ EP				
	0,05 ppm	0,5 ppm	5 ppm	50 ppm	500 ppm
<i>Eugenia uniflora</i>	18,25 $\pm$ 1,62 ^b	18,47 $\pm$ 1,56 ^b	26,01 $\pm$ 2,42 ^b	26,85 $\pm$ 2,55 ^b	27,96 $\pm$ 1,95 ^b
<i>Xylopi sericea</i>	12,17 $\pm$ 0,37 ^c	14,13 $\pm$ 1,49 ^{bc}	17,52 $\pm$ 1,20 ^c	19,65 $\pm$ 1,27 ^{bc}	25,62 $\pm$ 1,73 ^b
<i>Eugenia uvalha</i>	8,75 $\pm$ 0,41 ^c	9,85 $\pm$ 0,75 ^c	17,95 $\pm$ 1,07 ^c	18,33 $\pm$ 1,04 ^{cd}	28,12 $\pm$ 0,99 ^b
<i>Algrizea minor</i>	7,75 $\pm$ 0,40 ^c	9,13 $\pm$ 1,24 ^c	10,93 $\pm$ 1,67 ^c	11,02 $\pm$ 1,66 ^d	11,83 $\pm$ 1,82 ^c
<i>Myroxylon peruiferum</i>	10,76 $\pm$ 1,29 ^c	14,65 $\pm$ 2,59 ^{bc}	16,45 $\pm$ 2,56 ^c	19,26 $\pm$ 2,74 ^{bc}	23,49 $\pm$ 2,08 ^b
DEET	50,15 $\pm$ 2,71 ^a	58,57 $\pm$ 3,46 ^a	63,60 $\pm$ 1,96 ^a	68,28 $\pm$ 2,06 ^a	75,48 $\pm$ 1,07 ^a

Repelência percentual média $\pm$ EP. Os dados seguidos pelas letras diferentes são significativamente diferentes (P < 0,05, por ANOVA unidirecional e Tukey).

Os valores mostrados pela mesma letra são estatisticamente não significativos (P > 0,05)

Em 0,05ppm, *E. uniflora* (18,25%) apresentou maior percentual de repelência, sendo estatisticamente diferente dos demais óleos. Os óleos de *X. sericea* (12,17%), *M. peruiferum* (10,76%), *E. uvalha* (8,75%) e *A. minor* (7,75%) obtiveram repelência semelhantes entre si (F=17,94, df=74, p=0,00).

Na concentração de 0,5ppm o óleo de *E. uniflora* (18,47%) foi o mais repelente seguido por *M. peruiferum* (14,65%) e *X. sericea* (14,13%) que se apresentaram estatisticamente semelhantes, assim como *E. uvalha* (9,85%) e *A. minor* (9,13%) (F=5,41, df=74, p=1,00e⁻³).

Para a concentração de 5ppm *E. uniflora* (26,01%) novamente se apresentou como o óleo com maior repelência diferindo estatisticamente dos demais óleos analisados que apresentaram perfis similares (F=8,18, df=74, p=0,00).

Com o aumento da concentração para 50ppm os óleos *E. uniflora* (26,85%), *X. sericea* (19,65%) e *M. peruiferum* (19,26%) apresentaram perfis similares, sendo os dois últimos estatisticamente semelhantes a *E. uvalha* (18,33%) e diferentes de *A. minor* (11,02%) (F=8,11, df=74, p=0,00).

Por fim, na concentração de 500ppm os óleos de *E. uniflora* (27,96%), *E. uvalha* (28,12%), *X. sericea* (25,62%) e *M. peruiferum* (23,49%) apresentaram repelências estatisticamente similares diferindo apenas de *A. minor* (11,83%) (F=14,72, df=74, p=0,00).

4. DISCUSSÃO

Por se tratar de misturas complexas os compostos presentes nos óleos essenciais podem interagir através de múltiplas ações mecanicistas podendo haver ações coordenadas gerando um sinergismo ou efeitos de retração das atividades biológicas gerando efeitos antagônicos (MAHANTA; SARMA; KHANIKOR, 2019).

Classes de sesquiterpenos são produzidos como metabólitos de plantas e devido a sua alta volatilidade são comumente eficazes como repelentes, agindo no sistema olfativo do mosquito provocando uma mudança comportamental frente ao hospedeiro. Dentre os sesquiterpenos encontrados como compostos majoritários dos óleos essenciais analisados, β -cariofileno e germacreno D tem relatos na literatura de eficácia repelente contra mosquitos *Ae. aegypti* (AZEEM et al., 2019).

O óleo de *E. uniflora* apresentou 21 picos nos quais foram detectados como majoritários os compostos curzereno (31,3%), germacrona (16,3%), germacreno B (7,22%), β - elemeno (4,83%) e atractilona (4,46%), onde foi possível identificar um total de 83,97% de compostos voláteis. Segundo Ogunwande et al (2005) o óleo de *E. uniflora* apresentou como majoritários os componentes curzereno (19.7%), selina-1,3,7(11)-trien-8-ona (17.8%), atractilona (16.9%) e furanodieno (9.6%). Já os dados apresentados por Santos et al (2018) mostraram que os componentes majoritários desse óleo foram epóxido de selina-1,3,7 (11) -trien-8-ona (36,37%) e selina-1,3,7 (11) -trien-8-ona (27,32%). Chang et al (2011) relatam que durante o processo de extração o furanodieno pode sofrer rearranjo em temperaturas elevadas resultando num aumento do teor de curzereno.

No óleo de *E. uvalha* foram encontrados 34 picos que representam 87% da sua composição química. Os componentes majoritários foram óxido de cariofileno (38,76%) e α -copaeno (6,23%). Outros componentes encontrados foram epóxido de humuleno II (5,77%), espatulenol (4,43%), β - bourboneno (4,79%) e β -cariofileno (3,79%). Medeiros et al (2019) identificaram 32 compostos presentes no óleo de *E. uvalha* que apresentou espatulenol (43,65%), óxido de cariofileno (12,17%), viridiflorol (5,00%), epi- α -cadinol (4,29%) e epi- α -muurolol (4,18%). Já Apel et al (2004) descreveram 30 compostos, tendo como principais constituintes α -cadinol (14,0%), σ

- cadineno (12,4%), T-cadinol (11,9%), biciclogermacreno (10,2%) e β -cariofileno (7,2%).

No óleo de *X. sericea* foram encontrados 36 picos equivalendo a 96,65% do total de compostos identificados. Os compostos majoritários foram: espatulenol (27,33%) e β -cariofileno (19,23%), além dos sesquiterpenos α -copaeno (3,37%), germacreno D (2,49%) e biciclogermacreno (3,41%). Pontes et al (2007) descreveram como majoritários presentes no óleo de *X. sericea* os compostos cubenol (57,43%), epi-muurolol (26,09%), γ -elemeno (3,26%), β -oplopenona (2,67%) e α -cedreno (2,00%). Enquanto Câmara, Alencar e Silveira (1996) relataram a presença dos sesquiterpenos β -elemeno (11,48%), β -cariofileno (11,55%), γ -muuroleno (12,22%), γ -elemene (16,67%) e do monoterpeno β -ocimeno (22,78%) como componentes majoritários.

No óleo da *A. minor* foram identificados 29 picos representando 99,86% da composição química dos voláteis encontrados, cujos majoritários foram os sesquiterpenos δ -elemeno (40,36%), germacreno D (25,17%), α -copaeno (4,92%), β -bourboneno (4,86%) e β -elemeno (4,33%). Veras et al (2019) relataram em seus estudos que foram identificados 15 componentes no óleo de *A. minor* apresentando como majoritários β -pineno (56,99%), α -pineno (16,57%), germacreno D (4,67%), biciclogermacreno (4,66%), β -cariofileno (3,76%) e limoneno (1,71%).

Por fim, para o óleo de *M. peruiferum* foram encontrados 29 picos o que equivale a 85,28% da sua composição. Seus compostos majoritários foram os sesquiterpenos δ -cadineno (14,18%), α -cubebeno (7,81%) e β -bourboneno (4,94%), além dos monoterpenos α -pineno (18,03%), β -pineno (3,50%) e do sesquiterpeno oxigenado espatulenol (8,84%). Pereira et al (2019) identificaram 24 compostos no óleo de *M. peruiferum*, totalizando 85,50% da composição química, cujos majoritários foram germacreno D (17,10%), α -pineno (14,80%), β -cariofileno (10,80%), γ -elemeno (6,50%), β -felandren (5,80%) e β -pineno (4,80%).

As diferenças na composição química dos óleos estudados frente aos descritos na literatura podem ocorrer devido inúmeros fatores como localização geográfica da planta, época de colheita, temperatura e umidade durante a extração, além de fatores genéticos e formas de armazenamento tanto do material vegetal quanto do óleo essencial extraído (NAZARI et al., 2018).

O DEET apesar de ser considerado o repelente comercial mais eficaz contra picadas de *Ae. aegypti*, pode causar irritação na pele, neurotoxicidade, dermatites de contato e encefalopatia, seu uso não é recomendado para crianças, pois o mesmo pode causar convulsões em menores de 2 anos (LEGEAY et al., 2018). Assim, pesquisas com óleos essenciais de plantas são cada vez mais importantes, pois são uma alternativa segura e eficaz no combate ao *Ae. aegypti* (LI et al., 2019).

5. CONCLUSÕES

Nossos resultados mostraram que todos os óleos essenciais testados apresentaram respostas sensoriais que variaram de acordo com a sua concentração.

De uma maneira geral o óleo de *E. uniflora* apresentou maior percentual de repelência em comparação com os demais óleos essenciais, porém os óleos de *E. uvalha* e *X. sericea* demonstraram resultados mais promissores em concentrações mais elevadas

REFERÊNCIAS

- APEL, M. A. et al. Chemical composition of the essential oils of *Eugenia beaurepaireana* and *Eugenia pyriformis*: Section Dichotomae. **Journal of Essential Oil Research**, v. 16, n. 3, p. 191-192, june. 2004.
- AUGUSTO, L. G. S. et al. *Aedes aegypti* control in Brazil. **The Lancet**, v. 387, p. 1052-1053, mar. 2016.
- AZEEM, M. et al. Chemical composition and repellent activity of native plants essential oils against dengue mosquito, *Aedes aegypti*. **Industrial Crops and Products**, v. 140, p. 1-7, nov. 2019.
- CÂMARA, C. A. G.; ALENCAR, J. W.; SILVEIRA, E. R. Volatile constituents of *Xylopia sericea* St. Hill.. **Journal of Essential Oil**, v. 8, n. 1, p. 75-78, may. 1996.
- CHANG, R. et al. A new approach for quantifying furanodiene and curzerene. A case study on the essential oils of *Eugenia uniflora* L., Myrtaceae (pitangueira) leaves. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 3, p. 392-396, mar. 2011.
- DENNIS, E. J.; GOLDMAN, O. V.; VOSSHALL, L. B. *Aedes aegypti* mosquitoes use their legs to sense DEET on contact. **Current Biology**, v. 29, n. 9, p. 1551-1556, may. 2019.
- LEGEAY, S. et al. Unusual modes of action of the repellent DEET in insects highlight some human side effects. **European Journal of Pharmacology**, v. 825, p. 92-98, apr. 2018.
- LI, Z. et al. Repellent activities of essential oils rich in sesquiterpenoids from *Saussurea amara* (L.) DC. and *Sigesbeckia pubescens* Makino against two stored-product insects. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 35, p. 36048–36054, dec. 2019.
- MAHANTA, S.; SARMA, R.; KHANIKOR, B. The essential oil of *Lippia alba* Mill (Lamiales:Verbenaceae) as mosquitocidal and repellent agent against *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae) and *Aedes aegypti* Linn (Diptera: Culicidae). **The Journal of Basic and Applied Zoology**, v. 80, n. 64, p. 1-7, dec. 2019.
- MATTHEWS, B. J. et al. Improved reference genome of *Aedes aegypti* informs arbovirus vector control. **Nature**, v. 563, p. 501 - 507, nov. 2018.
- MEDEIROS, J. P. et al. Biocidal potential of *Eugenia pyriformis* essential oil in the control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in the free-living cycle. **Brazilian Journal of Veterinary Research**, v. 39, n. 11, p. 879-888, nov. 2019.
- MOTA, R. N. Adaptação de um olfatômetro de dupla escolha para estudos de orientação de fêmeas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1972) (Diptera: Culicidae) à semioquímicos., Belo Horizonte, p. 88, 2003.

NAZARI, M. et al. Direct analysis of terpenes from biological buffer systems using SESI and IR-MALDESI. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 410, p. 953–962, aug. 2018.

OGUNWANDE, I. A. et al. Studies on the essential oils composition, antibacterial and cytotoxicity of *Eugenia uniflora* L. **The International Journal of Aromatherapy**, v. 15, p. 147–152, july. 2005.

PAIXÃO, K. S. Ecologia química de machos de *Aedes (Stegomyia) aegypti* Linnaeus, 1762 (Diptera: Culicidae) e identificação química de compostos presentes na cutícula de adultos. **Tese de doutorado**, Belo Horizonte, v. Universidade Federal de Minas Gerais, n. Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, 2011.

PEREIRA, R. et al. Evaluation of the antimicrobial and antioxidant activity of 7-hydroxy-4', 6-dimethoxy-isoflavone and essential oil from *Myroxylon peruiferum* L.f. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 91, n. 2, p. 1-13, june. 2019.

PONTES, W. J. T. et al. Atividade acaricida dos óleos essenciais de folhas e frutos de *Xylopia sericea* sobre o ácaro rajado (*Tetranychus urticae* Koch). **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 838-841, mar. 2007.

POSEY, K. H.; SCHRECK, C. E. An airflow apparatus for selecting female mosquitoes for use in repellent and attraction studies. **Mosquito news**, v. 41, n. 3, p. 566-568, 1981.

RODRIGUEZ, S. D. et al. The efficacy of some commercially available insect repellents for *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). **Journal of Insect Science**, v. 15, p. 140, oct. 2015.

SANTOS, J. F. S. et al. Chemical composition, antifungal activity and potential antivirulence evaluation of the *Eugenia uniflora* essential oil against *Candida* spp. **Food Chemistry**, v. 261, p. 233-239, sept. 2018.

SARMA, R. et al. Combinations of plant essential oil based terpene compounds as larvicidal and adulticidal agent against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Nature**, v. 9471, n. 9, p. 1-12, july. 2019.

SOUZA, M. A. et al. Adulticide and repellent activity of essential oils against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) – A review. **South African Journal of Botany**, v. 124, p. 160-165, aug. 2019.

UNIYAL, A. et al. Behavioral response of *Aedes aegypti* mosquito towards essential oils using olfactometer. **Journal of Arthropod-Borne Diseases**, v. 10, n. 3, p. 370-380, jan. 2016.

VERAS, B. O. et al. *Algrizea Minor* Sobral, Faria & Proença (Myrteae, Myrtaceae): chemical composition, antinociceptive, antimicrobial and antioxidant activity of essential oil. **Natural Product Research**, p. 1-5, apr. 2019.

XU, P. et al. Mosquito odorant receptor for DEET and methyl jasmonate. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 111, n. 46, p. 16592–16597, oct. 2015.

**5 ATIVIDADE DETERRENTE DE OVIPOSIÇÃO DO ÓLEO DE *Eugenia uniflora* L.
E SEUS COMPOSTOS MAJORITÁRIOS CURZERENO E GERMACROMA FRENTE
AO MOSQUITO *Aedes aegypti* (CULICIDAE, DIPTERA)**

EDNA BARBOZA DE LIMA*, GEANNE KARLA NOVAIS SANTOS, JÚLIO CÉSAR
RIBEIRO DE OLIVEIRA FARIAS DE AGUIAR, DANIELA MARIA DO AMARAL
FERRAZ NAVARRO

Departamento de Química Fundamental, Universidade Federal de Pernambuco,
Recife-PE, Brasil

CLÁUDIO AUGUSTO GOMES DA CÂMARA

Departamento de Química, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife-PE,
Brasil

RESUMO

O mosquito *Aedes aegypti* é o responsável pela transmissão das arboviroses dengue, zika e chikungunya, que levam uma a cada três pessoas no mundo ao risco de contaminação, causando milhões de óbitos anualmente. No presente estudo analisamos a composição química do óleo de *Eugenia uniflora*, suas respostas eletroantenográficas e bioensaios, afim de verificar os efeitos de oviposição e os componentes capazes de impedir a postura de ovos. A caracterização do óleo foi realizada por cromatografia gasosa e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, a eletroantenografia foi analisada por cromatografia gasosa com detector eletroantenográfico e os bioensaios de oviposição foram realizados com microemulsões do óleo essencial e dos seus voláteis majoritários curzereno e germacrona. O óleo essencial e o curzereno mostraram atividade deterrente sendo capazes de inibir a oviposição em mais de 65%. Já o germacrona não foi eficaz na inibição da oviposição. Portanto, o curzereno é possivelmente o componente ativo responsável pelo efeito deterrente de oviposição no óleo essencial de *E. uniflora*.

PALAVRAS-CHAVE: Óleo essencial. Deterrência de oviposição. Eletroantenografia. *Aedes aegypti*.

1.0 INTRODUÇÃO

O mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) é o vetor dos arbovírus causadores da dengue (DENV), chikungunya (CHIKV) e zika (ZIKV) (KAMGANG et al., 2020; CAMPOS et al., 2020; KAZMI et al., 2020). Estima-se que uma a cada três pessoas corram risco de contaminação mundialmente (ARISTA-JALIFE et al., 2020) e que a transmissão de doenças causadas por esses vetores é responsável por mais de sete milhões de mortes por ano (SENTHIL-NATHAN, 2020).

As elevadas taxas de incidência global dessas doenças podem estar associadas a diversos fatores, tais como, aumento da mobilidade humana, fenômenos de aquecimento global e armazenamento de água inadequado por populações urbanas e rurais durante épocas de seca (SALAMI, et al 2020; ARISTA-JALIFE et al., 2020). Todos esses fatores aumentam os índices de contaminação, visto que ocasionam um ambiente ideal de proliferação ou propagação (MACCORMACK-GELLES et al., 2020).

Atualmente a única vacina disponível no mercado para combater arboviroses, relacionadas a tripla epidemia dengue, zika e chikungunya, transmitidas pelo *Ae. aegypti* é a CYD-TDV comercializada com o nome de Dengvaxia, desenvolvida pelo laboratório Sanofi no ano de 2015 para casos clínicos de dengue, porém o seu uso é restrito a adultos com histórico de infecção (SWAMINATHAN; KHANNA, 2019). A imunização em indivíduos que não tiveram contato com o vetor pode desencadear formas graves da doença quando picados pelo mosquito e expostos ao vírus (ANVISA, 2018).

Para evitar a proliferação do vetor, o uso de pesticidas e larvicidas sintéticos foi bastante utilizado no passado, porém o excesso dessas substâncias causou resistência em populações de mosquitos (KAMGANG et al., 2020).

Assim, o uso de componentes naturais, como óleos essenciais, passou a ser visto como uma alternativa ecologicamente correta, eficaz e segura no combate a proliferação e eliminação de criadouros devido sua baixa toxicidade e longo histórico de uso (ARAÚJO et al., 2020, LI et al., 2019, DAI et al., 2020).

Os metabólitos secundários de plantas, da qual os óleos essenciais são resultantes, possuem em sua composição química uma vasta quantidade de

componentes bioativos capazes de criar efeitos deletérios em mosquitos sugadores reduzindo assim a eclosão de ovos e o desenvolvimento do seu ciclo de vida com rápida degradação no meio ambiente e sem causar processos de resistência (MATURI et al., 2020; SANTOS et al., 2012)

A família Myrtaceae é conhecida como fonte de óleos essenciais com propriedades deletérias sobre populações de mosquitos (NÉRIO; OLIVERO-VERBEL, STASHENKO, 2010). Na família Myrtaceae, o gênero *Eugenia* possui relatos na literatura descrevendo sua eficácia contra insetos vetores (STIEVEN; MOREIRA; SILVA, 2009; ZOGHBI et al., 2011; GARMUS et al., 2014) e a espécie *Eugenia uniflora* possui estudos que comprovam a sua eficácia como larvicida no combate ao *Ae. aegypti* (GUARDA et al., 2016).

Nesse trabalho analisamos a composição química do óleo essencial de *E. uniflora*, seu potencial como deterrente de oviposição e sua resposta eletroantenográfica frente ao mosquito *Ae. aegypti*. Os compostos ativos na eletroantenografia foram isolados e testados em bioensaios, afim de elucidar seus possíveis efeitos deletérios frente a postura de ovos desses artrópodes sugadores.

2.0 MATERIAIS E MÉTODOS

Mosquitos. Foram utilizados mosquitos fêmeas de *Ae. aegypti* (cepa Rockfeller), oriundos de colônia do Laboratório de Ecologia química (LEQ), localizado no Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, Brazil, desde 2003. Os mosquitos eram mantidos à temperatura $27\pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa $70\pm 5\%$ com fotoperíodo de 14h e alimentação a base de sacarose à 10%.

Material Vegetal. As folhas de *E. uniflora* foram coletadas em janeiro de 2018 na Universidade Federal Rural de Pernambuco, localizada na Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Recife-PE e foram autenticadas por Câmara, C. A. G, sendo uma exsicata depositada no Herbário Professor Vasconcelos Sobrinho da Universidade Federal Rural de Pernambuco de voucher nº 48490.

Extração do óleo essencial. As folhas frescas de *E. uniflora* foram trituradas e submetidas a hidrodestilação em aparato de Clevenger por 3h a temperaturas entre 160 e 170°C . O óleo essencial obtido foi seco usando sulfato de sódio anidro e mantido sob refrigeração à -24°C . O rendimento foi de 1,021%.

Condições Analíticas. A identificação dos componentes presentes no óleo de *E. uniflora* foi realizada pela técnica de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas CG/EM, em instrumento Agilent 5975C, equipado com coluna apolar HP-5 (30mX0,25mm, 0,25 μm , Agilent), injetor split/splitless e detector do tipo quadrupolo sob temperatura inicial do forno de 40°C (mantida por 2min) com aquecimento a uma taxa de $4^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até a temperatura final de 230°C , mantida por 5min. A temperatura do injetor foi mantida em 250°C e hélio foi usado como gás de arraste, com fluxo de 1 mL/min. As temperaturas do detector quadrupolo e da fonte de íons foram 230°C e 150°C , respectivamente, com potencial de ionização a 70eV e faixa de varredura de 35-350m/z e 1.0scan/s. Em cada análise foi utilizado 1 μL de solução à 1000ppm de óleo essencial diluído em acetona. Essa alíquota foi inserida no equipamento em modo split 1:50. Em paralelo uma alíquota de uma solução com padrões de hidrocarbonetos, contendo uma série homóloga de alcanos (C9 a C30), foi analisada nas mesmas condições cromatográficas usadas para o óleo essencial. Para cada composto foi calculado o índice de retenção, através da análise dos tempos de

retenção de cada componente da amostra e dos padrões de hidrocarbonetos, segundo equação de Kratz (ADAMS, 2007).

Análise eletrofisiológica. Nesse tipo de análise, investigamos quais compostos presentes no óleo essencial apresentaram estímulo na antena dos mosquitos. Os testes foram realizados em um cromatógrafo gasoso com detector de ionização de chama (Thermo Trace GC Ultra, Thermo Scientific, Milan, Italy) acoplado a um detector eletroantenográfico (Syntech, Kirchzarten, Germany) o qual inclui um módulo controlador da temperatura da linha de transferência (TC-02), um módulo controlador de estímulos (CS-55), um módulo que controla a aquisição de dados captados pelos eletrodos (IDAC4) e um divisor de fluxo que permite que os compostos que saem da coluna cromatográfica cheguem ao mesmo tempo ao detector DIC e à antena do mosquito.

O cromatógrafo gasoso foi equipado com uma coluna apolar HP-5 (50mx0.25mmx0.25µm, Agilent). Nitrogênio foi usado como gás de arraste, mantido a fluxo constante de 1mL/min. A temperatura inicial do forno foi de 100°C (mantida por 1 min), programada para aumentar até 210°C a uma velocidade de aquecimento de 7°C/min. A temperatura final foi mantida por 2 minutos. O injetor e o detector foram mantidos a 250°C e a linha de transferência para o DEA foi aquecida a 220°C. Um fluxo de ar limpo e umidificado direcionado à antena montada carrega os estímulos químicos. A antena foi montada entre dois capilares de vidro preenchidos com solução de Ringer (solução salina contendo 8.0g/L NaCl, 0.4g/L KCl, 0.4g/L CaCl₂ em água destilada). Um eletrodo de fio de prata foi inserido em cada capilar, permitindo o fechamento do circuito elétrico (Figura 1).

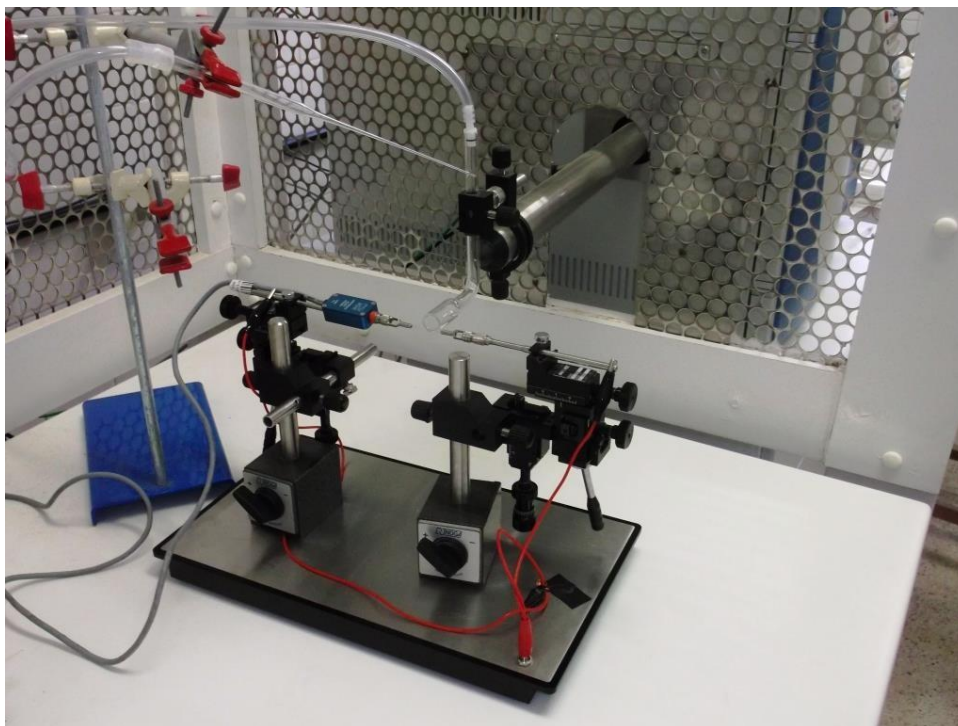


Figura 1- Detector eletroantenográfico acoplado ao cromatógrafo gasoso (CG-DEA).

Para montagem das antenas foram utilizados mosquitos fêmeas com idades entre 2 e 7 dias, em jejum por 24h. Os insetos foram postos em estado de dormência através de refrigeração (4°C durante 15 a 20 minutos) para posterior decapitação de sua cabeça com lâmina de bisturi. A cabeça do mosquito foi então colocada num capilar contendo solução de Ringer e a ponta distal de uma das antenas foi cortada. O capilar contendo a cabeça do mosquito foi inserido em um dos eletrodos do detector eletroantenográfico (DEA) e a ponta cortada da antena foi conectada ao capilar presente no segundo eletrodo, fechando o circuito (Figura 2). Foram considerados compostos eletrofisiologicamente ativos aqueles para os quais foi observada resposta em pelo menos cinco indivíduos. Para os ensaios eletrofisiológicos foram preparadas soluções do óleo essencial de *E. uniflora* na concentração de 6000ppm, usando acetona como veículo. Pelo menos 50 testes eletroantenográficos foram realizados no total.



Figura 2- Eletroantenografia da cabeça do *Ae. aegypti* acoplada ao capilar contendo os eletrodos de trabalho e referência, juntamente com solução de Ringer, para fechar o circuito. O sistema age como um biossensor na detecção de componentes ativos eletrofisiologicamente.

Isolamento e identificação dos compostos majoritários. O óleo essencial de *E. uniflora* foi diluído em clorofórmio, padrão analítico, na proporção 1:10(v/v) e seus compostos majoritários foram separados em uma placa de sílica gel (cromatofolha de alumínio com sílica gel 60 e indicador UV254, dimensões de 20x20cm, espessura de 0,20mm, marca Macherey-Nagel), com dicloro-hexano na proporção 1,5:1(v/v) como eluente e revelação em lâmpada ultravioleta com $\lambda=294\text{nm}$. Foram obtidas 6 frações (F1-F6) e cada fração foi analisada em cromatógrafo gasoso (CG) no modo split 1:10, com programação similar a descrita nas condições analíticas. A fração F5 correspondeu ao curzereno e a fração F6 ao germacrona, ambos com mais de 85% de pureza.

Bioensaios. Foram preparadas duas soluções estoque à 100ppm, sendo uma usada como controle e a outra como teste. A solução teste continha a amostra, hexano e Tween® 80 formando uma microemulsão, enquanto a solução controle continha os mesmos componentes da solução teste excluindo a amostra. Ambas soluções estoque foram diluídas para uso nos testes de oviposição. Para o óleo de *E. uniflora* foram usadas as concentrações de 50 e 5 ppm. Para os compostos isolados foi utilizada apenas a concentração de 5ppm. Nos experimentos de oviposição, 25 mL das soluções controle e teste foram postos em copos de vidro contendo papel de filtro

em seu interior no tamanho (12x12)cm. Os copos foram distribuídos de forma randômica em 8 gaiolas de metal e acrílico (33x21x30)cm, cobertas com tecido, contendo 10 fêmeas em seu interior que haviam sido alimentadas com sangue há 3 dias. As fêmeas foram deixadas no escuro por um período de 16h, para posterior contagem do número de ovos em cada gaiola.

Análise de dados. O percentual de deterrência de oviposição em cada gaiola foi calculado a partir da contagem do número de ovos no papel de filtro de cada amostra, dividido pelo número de ovos totais. De posse de todos os percentuais, foi calculada a média geral em cada amostra e aplicado o teste t de student, não pareado, no programa MINITAB® 19, para avaliar se havia diferença significativa entre as médias à 95% de confiabilidade.

3.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os componentes voláteis do óleo essencial de *E. uniflora* foram analisados a partir da técnica de cromatografia gasosa (CG) e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) (Tabela 1). Foi possível identificar 83,97% desses voláteis, sendo a maior parte deles pertencentes à classe dos sesquiterpenos oxigenados, representando 65,07% do total.

Tabela 1- Composição química do óleo essencial de *Eugenia uniflora*.

Componente	IR		Área (%)
	cal	lit	<i>Eugenia uniflora</i>
σ - Elemeno	1338	1335	0,52
β – Elemeno	1393	1389	4,83
β -Cariofileno	1421	1417	2,23
γ - Elemeno	1435	1434	0,82
β - Chamigrene	1477	1476	0,83
β - Selineno	1487	1489	1,04
Curzereno	1498	1499	31,30
α - Bulneseno	1506	1509	0,43
trans - Calameneno	1525	1521	0,29
σ - Cadineno	1525	1522	0,29
Selina-3,7(11)-dieno	1544	1545	0,40
Germacreno B	1559	1559	7,22
Espatulanol	1580	1577	2,09
Óxido de cariofileno	1583	1582	1,78
Viridiflorol	1594	1592	0,20
trans- β - Elemenone	1606	1602	0,84
Eremoligenol	1628	1629	0,20
Selin-11-en-4- α -ol	1657	1658	1,62
Atractilona	1664	1657	10,24
Germacrona	1698	1693	16,80
Grupos			
Monoterpenos			0,00
Sesquiterpenos			18,90
Sesquiterpenos oxigenados			65,07
Total			83,97

No óleo essencial de *E. uniflora* foram detectados como majoritários os sesquiterpenos oxigenados curzereno (31,3%) e germacrona (16,3%). Outros

compostos identificados nesta espécie incluem β - elemeno (4,83%), germacreno B (7,22%), β -cariofileno (2,23%), β - selineno (1,04%), atractilona (4,46%), espatulenol (2,09%), óxido de cariofileno (1,78%) e selin11-en-4- α -ol (1,62%). Segundo Cunha et al (2015) e Rodrigues et al (2013), o óleo de *E. uniflora* apresentou como majoritários os compostos curzereno, γ -elemeno e trans- β -elemenone. Enquanto que os dados apresentados por Victoria et al (2012) mostraram que os voláteis majoritários nesse óleo são os compostos germacreno B, selina-1,3,7-trien-8-ona, β -cariofileno, germacreno A, germacreno D, selina-1,3,7-trien-8-ona e curzereno. Ambos autores realizaram as extrações do óleo essencial a partir das folhas de *E. uniflora* usando a técnica de hidrodestilação e relataram que a maior parte dos compostos encontrados pertenciam a classe dos sesquiterpenos oxigenados, concordando com os achados nessa pesquisa. Costa et al (2009) usaram análise multivariada para mostrar que os óleos extraídos a partir de biotipos distintos de folhas de *E. uniflora* apresentaram composições químicas variadas. Os autores descreveram essas variações em três grupos principais, sendo o grupo I composto por germacreno B, germacrona e atractilona, grupo II com presença de curzereno, germacreno D, germacreno A e grupo III com predominância de selina-1,3,7(11)-trien-8-ona e epóxido de selina1,3,7(11)-trien-8-ona.

Os testes de eletroantenografia no óleo essencial de *E. uniflora* demonstraram que os componentes majoritários curzereno e germacrona causaram despolarização na antena das fêmeas de *Ae. aegypti*, indicando que tais substâncias puras poderiam exercer atividade biológica contra mosquitos (Figura 3).

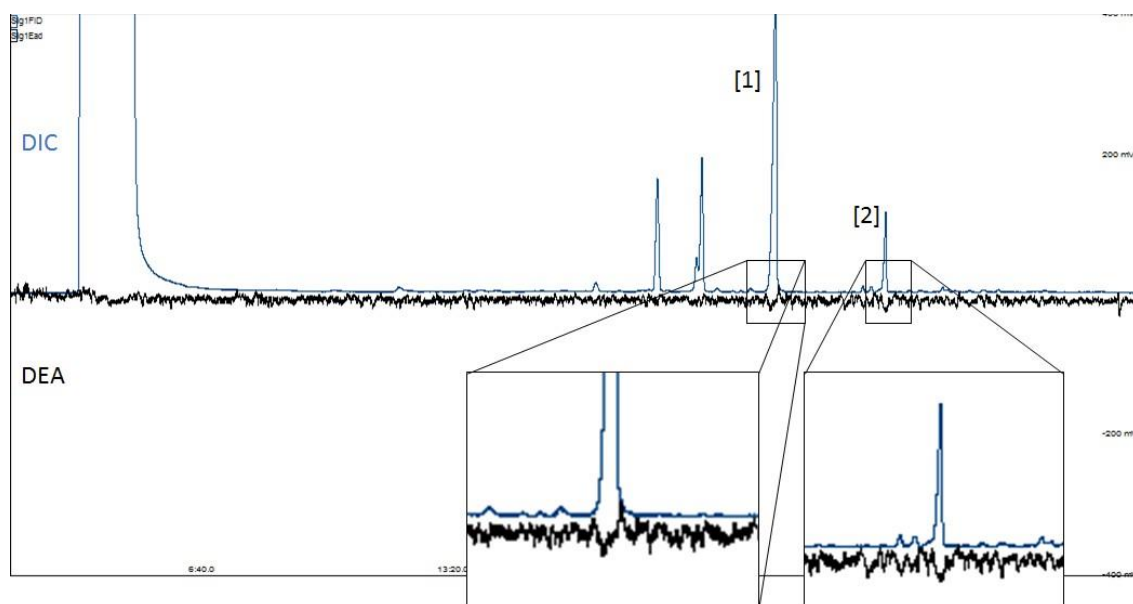


Figura 3- Resposta eletrofisiológica de fêmea de mosquito *Aedes aegypti* aos compostos curzereno [1] e germacrona [2] presentes no óleo essencial de *Eugenia uniflora*. Os traços em azul mostram os picos cromatográficos registrados pelo detector DIC, enquanto que os traços em preto mostram o sinal eletroantenográfico DEA (escala 10 μ V).

Como dito anteriormente, as respostas eletrofisiológicas podem indicar uma possível atividade do composto, porém apenas os bioensaios serão capazes de indicar a eficácia do componente analisado frente a oviposição.

Apesar de se mostrarem ativos em testes eletroantenográficos, tanto o curzereno quanto o germacrona não possuem estudos com atividades deterrentes de oviposição frente a mosquitos *Ae. aegypti* descritos na literatura. No entanto, Govindarajan et al (2018) demonstraram que o curzereno foi ativo no combate à larvas de *Anopheles subpictus*, *Aedes albopictus* e *Culex tritaeniorhynchus* com valores de LC 50 entre 4,14 e 5,01 μ g/ml, sendo considerado muito baixo quando comparados com demais compostos botânicos. Os autores também realizaram testes de toxicidade para duas espécies de peixes (*Gambusia affinis* e *Poecilia reticulata*, Poeciliidae) e duas espécies de insetos aquáticos (*Anisops bouvieri*, Notonectidae; e *Diplonychus indicus*, Belostomatidaela), verificando que estas espécies não sofreram danos ao serem expostas ao curzereno, assim os autores descreveram que tal composto pode ser considerado como um promissor larvicida ecológico com baixa ecotoxicidade.

Para o germacrona, no entanto, não há trabalhos na literatura que relatem sua atividade, como composto puro, contra artrópodes hematófagos. Liu et al (2012) relataram que no óleo essencial extraído dos rizomas de *Curcuma wenyujin*, tal composto foi encontrado como um dos voláteis mais abundantes, apresentando atividade inseticida contra a praga de cereais *Liposcelis bostrychophila*. Enquanto Hung et al (2020) descreveram que o germacrona foi o principal componente encontrado no óleo essencial da casca de *Callicarpa rubella* e que tal planta apresentou atividade larvicida contra mosquitos *Ae. aegypti*.

Nos bioensaios, vimos que o óleo essencial de *E. uniflora* se mostrou um potencial deterrente de oviposição para fêmeas de *Ae. aegypti*, assim como o seu componente majoritário curzereno, em todas as concentrações testadas. Já o germacrona não apresentou eficácia na inibição da oviposição (Figura 4).

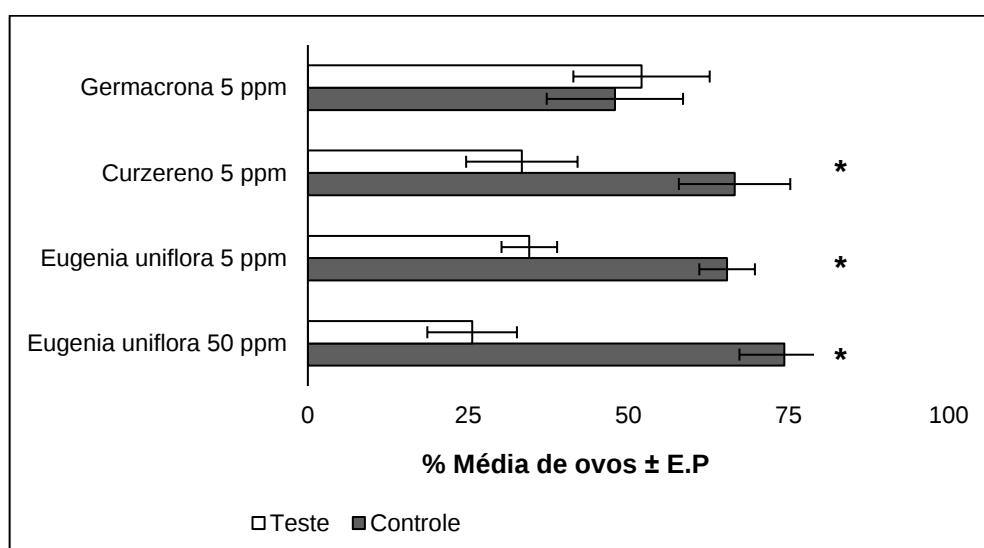


Figura 4- Respostas dos bioensaios de oviposição às fêmeas de *Aedes aegypti*. Barras pretas indicam a percentagem de ovos no controle e as barras brancas a percentagem de ovos no teste. O teste consistia numa microemulsão formada pelo composto ou óleo essencial com hexano e emulsificante Tween® 80, enquanto o controle era apenas a microemulsão sem amostra. O gráfico mostra a média do número de ovos e seus respectivos erro padrão. Os asteriscos indicam quais tratamentos apresentaram diferenças significativas entre controle e teste (teste t, $p < 0,05$).

O óleo essencial à 50ppm apresentou deterrência de oviposição de 73,66% ($p=0,00$), quando diluído à 5ppm o percentual de deterrência foi de 65,50% ($p=0,00$).

Enquanto o curzereno à 5ppm obteve uma deterrência de 66,60% ($p=0,02$). O germacrona ao contrário das demais amostras não foi eficaz na inibição da postura de ovos e obteve um percentual de deterrência de apenas 47,92% ($p=0,786$). Com isso, podemos dizer que possivelmente o curzereno é o responsável pelas variações sensoriais causadas no *Ae. aegypti*, pelo óleo essencial de *E. uniflora*, que os impede de ovipor nos locais contendo esse óleo. Vimos também que na concentração de 5 ppm o óleo essencial e o curzereno apresentam valores muito próximos, indicando que quando em contato com os demais componentes do óleo, tal composto não atua de forma sinérgica nem antagônica e age como se estivesse isolado.

Podemos concluir que o óleo essencial de *E. uniflora* é alternativa no combate ao *Ae. aegypti*, visto que é capaz de impedir o seu desenvolvimento desde o início do ciclo de vida, evitando a oviposição. Além de ser facilmente encontrado o óleo de *E. uniflora* apresenta baixa toxicidade, bons rendimentos no processo de extração e boa biodegradabilidade no meio ambiente.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. 4^a. ed. [S.I.]: Allured Publishing Corp, 2007.
- ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Vacina dengue: esclarecimentos**, 2018. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/vacinadengueesclarecimentos/219201. Acesso em: 26 mar. 2020.
- ARAÚJO, I. F. et al. Larvicidal activity of the methanolic, hydroethanolic and hexanic extracts from *Acmella oleracea*, solubilized with silk fibroin, against *Aedes aegypti*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 24, p. 1-6, mar. 2020.
- ARISTA-JALIFE, A. et al. *Aedes* mosquito detection in its larval stage using deep neural networks. **Knowledge-Based Systems**, v. 189, n. 15, p. 1-16, feb. 2020.
- CAMPOS, E. V. R. et al. Recent developments in nanotechnology for detection and control of *Aedes aegypti* borne diseases. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, n. 102, p. 1-17, feb. 2020.
- COSTA, L. C. B. et al. Variação no rendimento e composição química do óleo essencial de folhas de atroveran (*Ocimum selloi* Benth.) inteiras e moídas sob condições de armazenamento. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 11, n. 1, p. 43-48, 2009.
- CUNHA, F. A. B. et al. *Eugenia uniflora* leaves essential oil induces toxicity in *Drosophila melanogaster*: involvement of oxidative stress mechanisms. **Toxicology Research**, v. 4, n. 3, p. 634–644, may. 2015.
- DAI, D. N. et al. Chemical compositions, mosquito larvicidal and antimicrobial activities of essential oils from five species of *Cinnamomum growing* Wild in North Central Vietnam. **Molecules**, v. 23, n. 1303, p. 1-12, mar. 2020.
- GARMUS, T. T. et al. Extraction of phenolic compounds from pitanga (*Eugenia uniflora* L.) leaves by sequential extraction in fixed bed extractor using supercritical CO₂, ethanol and water as solvents. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 86, p. 4-14, feb. 2014.
- GOVINDARAJAN, M. et al. Curzerene, trans- β -elemenone, and γ -elemene as effective larvicides against *Anopheles subpictus*, *Aedes albopictus*, and *Culex tritaeniorhynchus*: toxicity on non-target aquatic predators. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, p. 10272–10282, apr. 2018.
- GUARDA, C. et al. Atividade larvicida de produtos naturais e avaliação da susceptibilidade ao inseticida temefós no controle do *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Interciência**, v. 41, n. 4, p. 243-247, abr. 2016.
- HUNG, N. H. et al. Callicarpa species from Central Vietnam: essential oil compositions and mosquito larvicidal activities. **Plants**, v. 9, n. 1, p. 1-32, jan. 2020.

KAMGANG, B. et al. Contrasting resistance patterns to type I and II pyrethroids in two major arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in the Republic of the Congo, Central Africa. **Infectious Diseases of Poverty**, v. 9, n. 23, p. 1-10, mar. 2020.

KAZMI, S. S. et al. A review on zika virus outbreak, epidemiology, transmission and infection dynamics. **Journal of Biological Research-Thessaloniki**, v. 27, n. 5, p. 1-11, mar. 2020.

LI, Z. et al. Repellent activities of essential oils rich in sesquiterpenoids from *Saussurea amara* (L.) DC. and *Sigesbeckia pubescens* Makino against two stored-product insects. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 35, p. 36048–36054, dec. 2019.

LIU, Z. L. et al. Identification of insecticidal constituents of the essential oil of *Curcuma wenyujin* rhizomes active against *Liposcelis bostrychophila* Badonnel. **Molecules**, v. 17, n. 10, p. 12049–12060, oct. 2012.

MACCORMACK-GELLES, B. et al. Evaluation of the usefulness of *Aedes aegypti* rapid larval surveys to anticipate seasonal dengue transmission between 2012–2015 in Fortaleza, Brazil. **Acta Tropica**, v. 205, p. 1-43, feb. 2020.

MATURI, E. J. et al. *Leptospermum scoparium* essential oil is a promising source of mosquito larvicide and its toxicity is enhanced by a biobased emulsifier. **PlosOne**, p. 1-14, feb. 2020.

NÉRIO, L. S.; OLIVERO-VERBEL, J.; STASHENKO, E. Repellent activity of essential oils: a review. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 372–378, 2010.

RODRIGUES, K. A. F. et al. *Eugenia uniflora* L. essential oil as a potential anti-Leishmania agent: effects on *Leishmania amazonensis* and possible mechanisms of action. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 1-10, jan. 2013.

SALAMI, D. et al. Dengue importation into Europe: a network connectivity-based approach. **PlosOne**, v. 15, n. 3, p. 1-19, mar. 2020.

SANTOS, N. D. L. et al. Oviposition-stimulant and ovicidal activities of *Moringa oleifera* lectin on *Aedes aegypti*. **PlosOne**, v. 7, n. 9, p. 1-8, sep. 2012.

SENTHIL-NATHAN, S. A review of resistance mechanisms of synthetic insecticides and botanicals, phytochemicals, and essential oils as alternative larvicidal agents against mosquitoes. **Frontiers in Physiology**, v. 10, n. 1591, p. 1-21, feb. 2020.

STIEVEN, A. C.; MOREIRA, J. J. S.; SILVA, C. F. Óleos essenciais de uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess): avaliação das atividades microbiana e antioxidante. **Eclética Química**, v. 34, n. 3, p. 7 - 13, 2009.

SWAMINATHAN, S.; KHANNA, N. Dengue vaccine development: Global and Indian scenarios. **International Journal of Infectious Diseases**, jan. 2019.

VICTORIA, F. N. et al. Essential oil of the leaves of *Eugenia uniflora* L.: Antioxidant and antimicrobial properties. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 8, p. 2668-2674, aug. 2012.

ZOGHBI, M. G. B. et al. Chemical variability of the volatiles from the leaves of *Eugenia protenta* McVaugh (Myrtaceae) growing wild in the North of Brazil. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 39, p. 660-665, dec. 2011.

6 CONCLUSÕES

- Através da técnica de hidrodestilação foi possível extrair, com bons rendimentos de extração, os óleos essenciais de *E. uniflora*, *E. uvalha*, *X. sericea*, *A. minor* e *M. peruiferum*, bem como, obter suas análises químicas pelas técnicas analíticas de Cromatografia Gasosa (CG) e Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM)
- Os bioensaios de repelência em olfatômetro de dupla escolha com os óleos essenciais revelou variação no comportamentais do *Ae. aegypti* em diversas intensidades de acordo com a concentração utilizada.
- O óleo essencial de *E. uniflora* apresentou o maior percentual de repelência e, em concentrações mais baixas houve uma maior diferença honestamente significativa (DHS) em teste de Turkey, indicando um maior destaque em sua eficácia, seguido do óleo de *E. uvalha* com percentuais próximos aos do óleo *E. uniflora* nas amostras mais concentradas. Os óleos de *X. sericea* e *M. peruiferum* foram similares em todas as concentrações, não havendo diferença estatística entre ambos; o óleo de *A. minor* apresentou a menor eficácia, estatisticamente diferente das demais amostras testadas.
- Através da técnica de cromatografia em camada delgada foi possível separar os majoritários curzereno e germacrona do óleo de *E. uniflora*, os quais juntamente com o óleo apresentaram despolarização na antena do *Ae. aegypti*.
- Microemulsões formadas pelo óleo de *E. uniflora* (em diferentes concentrações) e curzereno apresentaram percentuais de deterrência de oviposição muito próximos entre si e superiores a 65%, enquanto a microemulsão do germacrona não foi eficaz em apresentar deterrência de oviposição, indicando o curzereno como componente ativo do óleo de *E. uniflora*, responsável pelas variações sensoriais causadas no *Ae. aegypti*.

REFERÊNCIAS

- ACHEE, N. L. et al. Spatial repellents: from discovery and development to evidence-based validation. **Malaria Journal**, may. 2012.
- ACIOLE, S. D. G. et al. Insecticidal activity of three species of Guatteria (Annonaceae) against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Revista Colombiana de Entomología**, v. 37, n. 2, p. 262-268, 2011.
- AL-ABDELY, H. M. Zika an emerging teratogenic virus. **Saudi Medical Journal**, Saudi Arabia, v. 37, n. 8, p. 831-833, 2016.
- ALMEIDA, A. P. G. Os mosquitos (Diptera, Culicidae) e a sua importância médica em Portugal. Desafios para o século XXI. **Acta Médica Portuguesa**, Lisboa, v. 24, p. 961-974, out. 2011.
- AMMAR, A. H.; MENIAI, A.; ZAGROUBA, F. Experimental study and modeling of essential oil extraction from plants by hydrodistillation. **Chemical Engineering & Technology**, v. 37, n. 7, p. 1235–1242, june. 2014.
- ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Sobre o uso de repelentes de inseto durante a gravidez**, 2015. Disponível em: <https://www.saude.gov.br/images/pdf/2015/dezembro/04/NotaAnvisaRepelentes-e-Saneantes-02dez2015.pdf>. Acesso em: 07 abr. 2020.
- ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Vacina dengue: esclarecimentos**, 2018. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/vacinadengueesclarecimentos/219201. Acesso em: 26 mar. 2020.
- ARMSTRONG, L.; DUARTE, M. R.; MIGUEL, O. G. Morfo-anatomia da folha e caule de *Eugenia pyriformis*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 3, p. 475-481, jun. 2012.
- BARRETO, C. F. et al. Estudo das alterações morfo-histológicas em larvas de *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) submetidas ao extrato bruto etanólico de *Sapindus saponaria* Lin (Sapindaceae). **DSpace/Manakin Repository**, 06 fev. 2006.
- BARRETO, R. W.; JOHNSTON, P. R.; EVANS, H. C. A new species of the lenticel fungal genus *Claviradulomyces* (Ostropales) from the Brazilian Atlantic forest tree *Xylopia sericea* (Annonaceae). **The International Mycological Association**, v. 3, n. 2, p. 135-141, dec. 2012.
- BECK, J. J.; LIGHT, D. M.; GEE, W. S. Electroantennographic bioassay as a screening tool for host plant volatiles. **Journal of Visualized Experiments**, v. 63, p. 3931, 2012.
- BENELLI, G. et al. Larvicidal and ovideterrent properties of neem oil and fractions against the filariasis vector *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae): a bioactivity survey across production sites. **Parasitology Research**, v. 114, p. 227–236, oct. 2014.

BENELLI, G.; JEFFRIES, C. L.; WALKER, T. Biological control of mosquito vectors: past, present, and future. **Insects**, v. 7, n. 52, p. 1-18, sep. 2016.

BENELLI, G.; RAJESWARY, M.; GOVINDARAJAN, M. Towards green oviposition deterrents? Effectiveness of *Syzygium lanceolatum* (Myrtaceae) essential oil against six mosquito vectors and impact on four aquatic biological control agents. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, p. 10218–10227, dec. 2016.

BERGSTRÖM, L. G. W. Chemical communication by behaviour-guiding olfactory signals. **Chemical Communications**, n. 34, p. 3959-3979, july. 2008.

BOHBOT, J.; VOGT, R. G. Antennal expressed genes of the yellow fever mosquito (*Aedes aegypti* L.); characterization of odorant-binding protein 10 and takeout. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 35, n. 9, p. 961-979, sep 2005.

BRAUD, D. et al. An update on zika virus infection. **The Lancet**, v. 390, n. 10107, p. 2099-2109, nov. 2017.

BREZOLIN, A. N. et al. Tools for detecting insect semiochemicals: a review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 410, p. 4091–4108, june. 2018.

BRITO, C. A. A. Alerta: Casos graves e mortes associadas a chikungunya no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, n. 5, 2017.

BROWN, M.; HERBERT, A. A. Insect repellents: an overview. **Jornal of the American Academy of Dermatology**, v. 36, p. 243-9, fev. 1997.

BRUCE, T. J. A.; WADHAMS, L. J.; WOODCOCK, C. M. Insect host location: a volatile situation. **Trends in Plant Science**, v. 10, n. 6, p. 269-274, june. 2005.

BURNETT, M. W. Chikungunya. **Journal of Special Operations Medicine**, v. 14, n. 4, p. 129-130, 2014.

CABRINI, I.; ANDRADE, C. F. S. Resposta de fêmeas de mosquitos ao hospedeiro - busca por alimentação sanguínea - uma revisão. **Unicamp**, Novembro 2006. Disponível em: https://www2.ib.unicamp.br/profs/eco_aplicada/arquivos/artigos_tecnicos/AtracaoFemeasMosquitos.pdf. Acesso em: 15 out. 2019.

CARMO, E. S.; LIMA, E. O.; SOUZA, E. L. The potential of *Origanum vulgare* L.(lamiaceae) essential oil in inhibiting the growth of some food-related aspergillus species. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 2, p. 362-367, 2008.

CASTILHO, R. M.; STASHENKO, E.; DUQUE, J. E. Insecticidal and repellent activity of several plant-derived essential oils against *Aedes aegypti*. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 33, n. 1, p. 25-35, mar. 2017.

CHADEE, D. D.; SUTHERLAND, J. M.; GILLES, J. R. L. Diel sugar feeding and reproductive behaviours of *Aedes aegypti* mosquitoes in Trinidad: With implications for mass release of sterile mosquitoes. **Acta Tropica**, v. 132, p. S86-S90, apr. 2014.

CHEAH, S. et al. Larvicidal, oviposition, and ovicidal effects of *Artemisia annua* (Asterales: Asteraceae) against *Aedes aegypti*, *Anopheles sinensis*, and *Culex*

quinquefasciatus (Diptera: Culicidae). **Parasitology Research**, v. 112, p. 3275–3282, july. 2013.

CIPRANDI, A.; HORN, F.; TERMIGNONI, C. Saliva de animais hematófagos: fonte de novos anticoagulantes. **Rev. bras. hematol. hemoter**, v. 25, n. 4, p. 250-262, 2003.

COELHO, A. G.; LEAL, E. R.; VASCONCELOS, J. F. S. Emprego de óleos essenciais como matéria-prima para a produção de repelentes de insetos. **Revista Contexto & Saúde**, v. 19, n. 37, p. 178-182, dez. 2019.

COELHO, J. S. et al. Effect of *Moringa oleifera* lectin on development and mortality of *Aedes aegypti* larvae. **Chemosphere**, v. 77, n. 7, p. 934-938, nov. 2009.

CONSOLI, R. A. G. B.; OLIVEIRA, L. Morfologia externa. In: CONSOLI, R. A. G. B.; OLIVEIRA, R. L. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. [S.l.]: FIOCRUZ, 1994. p. 19-37.

COSTA, M. C. S. et al. Arbovirus investigation in patients from Mato Grosso during Zika and chikungunya virus introduction in Brazil, 2015–2016. **Acta Tropica**, v. 190, p. 395-402, feb. 2019.

DANIS-LOZANO, R. et al. Clinical characterization of acute and convalescent illness of confirmed chikungunya cases from Chiapas, S. Mexico: A cross sectional study. **PlosOne**, p. 1-15, oct. 2017.

DEBBOUN, M.; FRANCES, S. P.; STRICKMAN, D. **Insect repellents**. 2ª. ed. London: CRC, Taylor e Francis group, 2007.

DIAS, C. N. et al. Chemical composition and larvicidal activity of essential oils extracted from Brazilian legal Amazon plants against *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p. 1-8, apr. 2015.

EMMERICH, T. et al. Intoxicação espontânea e experimental por frutos de *Eugenia uvalha* Cambess. (Myrtaceae) em ovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 5, p. 438-442, maio. 2014.

EPA. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2020. Disponível em: <https://www.epa.gov/insect-repellents/deet>. Acesso em: 14 jan. 2020.

FAMUYIWA, F. G.; ADEBAJO, A. C. Larvicidal properties of *Eugenia uniflora* leaves. **Agriculture and Biology Journal of North America**, v. 3, n. 10, p. 400-405, 2012.

FARNESI, L. C. et al. Embryonic development of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): influence of different constant temperatures. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, n. 1, p. 124-126, fev. 2009.

FELIPE, L. O.; BICAS, J. L. Terpenos, aromas e a química dos compostos naturais. **Química nova na escola**, v. 39, n. 2, p. 120-130, maio. 2016.

FERRAZ, R. P. C. et al. Antitumour properties of the leaf essential oil of *Xylopia frutescens* Aubl. (Annonaceae). **Food Chemistry**, v. 141, n. 1, p. 196-200, nov. 2013.

FIGUEIREDO, P. L. B. et al. Composition, antioxidant capacity and cytotoxic activity of *Eugenia uniflora* L. chemotype-oils from the Amazon. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 232, n. 25, p. 30-38, mar. 2019.

FIOCRUZ. FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. *Aedes aegypti*, introdução aos aspectos científicos do vetor. **Instituto Oswaldo Cruz**, 2019. Disponível em: <http://auladengue.ioc.fiocruz.br/?p=68>. Acesso em: 14 maio. 2019.

FONSECA, D. S. R.; BRAZ, C. K. R. Investigação epidemiológica da distribuição geográfica do *Aedes aegypti* na cidade de Montes Claros (MG) com uso de geotecnologias. **Revista Brasileira de Cartografia**, v. 62, n. 03, p. 489-503, 2010.

FORATTINI, O. P. Entomologia médica. **Edusp**, São Paulo, v. 2, 2002.

FOSTER, W. A.; TAKKEN, W. Nectar-related vs. human-related volatiles: behavioural response and choice by female and male *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) between emergence and first feeding. **Bull. of Entomol. Res**, v. 94, n. 2, p. 145-157, apr. 2004.

FOX, A. N. et al. Candidate odorant receptors from the malaria vector mosquito *Anopheles gambiae* and evidence of down-regulation in response to blood feeding. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 25, p. 14693-14697, oct. 2001.

FRANZ, C. M. Essential oil research: past, present and future. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 25, p. 112–113, feb. 2010.

FRITEL, X. et al. Chikungunya Virus Infection during Pregnancy, Réunion, France, 2006. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 3, p. 418–425, mar. 2010.

GANESAN, K. et al. Studies of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) ovipositional responses to newly identified semiochemicals from conspecific eggs. **Australian Journal of Entomology**, p. 75–80, 2006.

GARMUS, T. T. et al. Extraction of phenolic compounds from pitanga (*Eugenia uniflora* L.) leaves by sequential extraction in fixed bed extractor using supercritical CO₂, ethanol and water as solvents. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 86, p. 4-14, feb. 2014.

GÉRARDIN, P. et al. Multidisciplinary prospective study of mother-to-child chikungunya virus infections on the island of La Réunion. **Plos Med**, v. 5, n. 3, mar. 2008.

GOMES, P. R. B. et al. Avaliação da atividade larvívica do óleo essencial do *Zingiber officinale* Roscoe. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 18, n. 2, p. 597-604, 2016.

GOVINDARAJAN, M. et al. Curzerene, trans- β -elemenone, and γ -elemene as effective larvicides against *Anopheles subpictus*, *Aedes albopictus*, and *Culex tritaeniorhynchus*: toxicity on non-target aquatic predators. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, p. 10272–10282, apr. 2018.

GRUBOR-BAUK, B. et al. NS1 DNA vaccination protects against Zika infection through T cell-mediated immunity in immunocompetent mice. **Science Advances**, v. 5, n. 12, dec. 2019.

GUENTHER, E. **The Essential Oils**. New York: Krieger Publishing Company, 1972.

GURUGAMA, P. et al. Dengue viral infections. *Indian Journal of Dermatology*, v. 55, n. 1, p. 68-78, jan. 2010.

HALLBERG, E.; HANSSON, B. S. Arthropod sensilla: morphology and phylogenetic considerations. **Microscopy researche and technique**, v. 47, n. 6, p. 428-439, dec. 1999.

HAMILTON, C. E.; BERESFORD, D. V.; SUTCLIFFE, J. F. Effects of natal habitat odour, reinforced by adult experience, on choice of oviposition site in the mosquito *Aedes aegypti*. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 25, p. 428–435, may. 2011.

HEILMAN, J. M. et al. Dengue fever: a Wikipedia clinical review. *Open Medicine*, v. 8, n. 4, p. 105-115, oct. 2014.

HIGUERA, A.; RAMÍREZ, J. D. Molecular epidemiology of dengue, yellow fever, Zika and chikungunya arboviruses: An update. **Acta Tropica**, v. 190, p. 99-111, feb. 2019.

HORWOOD, P. F.; BUCHY, P. Chikungunya. **Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz**, v. 34, n. 2, p. 479-489, 2015.

INDACOCHEA, B. et al. Evaluación de medios de cultivo in vitro para especies forestales nativas en peligro de extinción en Ecuador. **Agronomía Costarricense**, v. 42, n. 1, p. 63-89, 2018.

INGKANINAN, K. et al. Screening for acetylcholinesterase inhibitory activity in plants used in Thai traditional rejuvenating and neurotonic remedies. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 89, n. 2, p. 261-264, dec. 2003.

JANKOWSKA, M. et al. Molecular Targets for Components of Essential Oils in the Insect Nervous System—A Review. **Molecules**, v. 23, n. 1, dec. 2018.

KATZ, T. M.; MILLER, J. H.; HEBERT, A. A. Insect repellents: historical perspectives and new developments. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 58, n. 5, p. 865-71, maio. 2008.

KAUR, J. S.; LAI, Y. L.; GIGER, A. D. Learning and memory in the mosquito *Aedes aegypti* shown by conditioning against oviposition deterrence. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 17, p. 457–460, dec. 2003.

KESARI, A. S. et al. Zika virus NS5 localizes at centrosomes during cell division. **Virology**, v. 541, p. 52-62, feb. 2020.

KING, J. G. Developmental and comparative perspectives on mosquito immunity. **ScienceDirect**, v. 103, feb. 2020.

KLEIN, E. J. et al. Use of supercritical CO₂ and ultrasound-assisted extractions to obtain α/β -amyrin-rich extracts from uvaia leaves (*Eugenia pyriformis* Cambess.). **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 137, p. 1-8, july. 2018.

KOVENDAN, K. et al. Estudos sobre a atividade larvívica e pupívica de *Leucas aspera* Willd. (Lamiaceae) e insetívica bacteriana *Bacillus sphaericus* contra o vetor da malária *Anopheles stephensi* Liston. (Diptera: Culicidae). **Parasitol Res**, v. 110, p. 195–203, 2012.

LEYVA, M. et al. Actividad repelente de formulaciones del aceite esencial de *Melaleuca quinquenervia* (Cav.) S.T. Blake (Myrtales: Myrtaceae) en mosquitos. **Anales de Biología**, v. 34, p. 49-58, 2012.

LI, Z. et al. Repellent activities of essential oils rich in sesquiterpenoids from *Saussurea amara* (L.) DC. and *Sigesbeckia pubescens* Makino against two stored-product insects. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 35, p. 36048–36054, dec. 2019.

LING, L.; RAIKHEL, A. S. Serotonin signaling regulates insulin-like peptides for growth, reproduction, and metabolism in the disease vector *Aedes aegypti*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 115, n. 42, oct. 2018.

LIU, J. L. et al. Selection and characterization of protective anti-chikungunya virus single domain antibodies. **Molecular Immunology**, v. 105, p. 190-197, jan. 2019.

LOAYZA-CABEZAS, S. et al. Effect of light, temperature and scarification on the germinative capacity and initial growth of *Myroxylon balsamum* (L.) Harms. **Revista Caatinga**, v. 31, n. 2, p. 415-423, june. 2018.

LOMBARDO, F. et al. Deciphering the olfactory repertoire of the tiger mosquito *Aedes albopictus*. **BMC Genomics**, p. 1-23, oct. 2017.

LOPES, J. M. M. et al. A preliminary exploration of the potential of *Eugenia uvalha* Cambess juice intake to counter oxidative stress. **Food Research International**, v. 105, p. 563-569, mar. 2018.

LUPLERTLOP, N. et al. Induction of a peptide with activity against a broad spectrum of pathogens in the *Aedes aegypti* salivary gland, following infection with dengue virus. **PLOS PATHOGENS**, v. 7, n. 1, p. 1-15, jan. 2011.

MARK, S.; FRADIN, M. D. Mosquitoes and mosquito repellents: a clinician's guide. **Annals of Internal Medicine**, 1 jun. 1998.

MARK, S.; FRADIN, M. D.; DAY, J. F. Comparative efficacy of insect repellents against mosquito bites. **The Journal of the American Medical Association**, p. 347, jul. 2002.

MATHIAS, L. et al. A new pentacyclic triterpene isolated from *Myroxylon balsamum* (syn. *Myroxylon peruiferum*). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 11, n. 2, apr. 2000.

MEIJERINK, J.; VANLOON, J. J. A. Sensitivitics of antennal olfactory neurons of the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*, to carboxylic acids. **Journal of Insect Physiology**, v. 45, p. 365-373, 1999.

MENDES, R. F. et al. The essential oil from the fruits of the Brazilian spice *Xylopia sericea* A. St.-Hil. presents expressive in-vitro antibacterial and antioxidant activity. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 69, p. 341–348, 2017.

MENDES, S. S. et al. Evaluation of the analgesic and anti-inflammatory effects of the essential oil of *Lippia gracilis* leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 129, p. 391-397, 2010.

MS. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas. **Boletim Epidemiológico**, v. 50, n. 22, set. 2019.

MS. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus zika até a Semana Epidemiológica 32, 2016. **Boletim Epidemiológico**, v. 47, n. 33, 2016.

MIRANDA, C. A. S. F. et al. Óleos essenciais de folhas de diversas espécies: propriedades antioxidantes e antibacterianas no crescimento espécies patogênicas. **Revista Ciência Agronômica**, v. 47, n. 1, p. 213-220, mar. 2016.

MISNI, N.; NOR, Z. M.; AHMAD, R. New candidates for plant-based repellents against *Aedes aegypti*. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 2, n. 32, p. 117-123, 2016.

MORAES, M. C. B. et al. **EMBRAPA**, 2008. Disponível em: https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CENARGEN-2009-09/31607/1/doc270_1008.pdf. Acesso em: 30 jan. 2020.

MORAIS, L. A. S. INFLUÊNCIA DOS FATORES ABIÓTICOS NA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS. **Horticultura Brasileira**, v. 27, n. 2, ago. 2009.

MORSY, N. F. S. Chemical structure, quality indices and bioactivity of essential oil constituents. In: EL-SHEMY, H. A. **Active Ingredients from Aromatic and Medicinal Plants**. [S.l.]: IntechOpen, 2017.

MOTA, R. N. Adaptação de um olfatômetro de dupla escolha para estudos de orientação de fêmeas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1972) (Diptera: Culicidae) à semioquímicos., Belo Horizonte, p. 88, 2003.

MYRICK, A. J.; BAKER, T. C. Increasing signal-to-noise ratio in gas chromatography -electroantennography using a deans switch effluent chopper. **Journal of Chemical Ecology**, v. 44, n. 2, p. 111–126, jan. 2018.

NAIME, J. M. et al. Eletroantenograma para estudo comportamental de insetos. **Comunicado Técnico**, v. 74, n. 1, p. 1-5, nov. 2006.

NAZARI, M. et al. Direct analysis of terpenes from biological buffer systems using SESI and IR-MALDESI. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 410, p. 953–962, aug. 2018.

NERIO, L. S.; OLIVERO-VERBEL, J.; STASHENKO, E. Repellent activity of essential oils: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 372–378, 2010.

NEVES, I. A. et al. Composição e atividade larvicide do óleo essencial de *Eugenia candolleana* DC. (MYRTACEAE) against *Aedes aegypti*. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 6, p. 2305-2315, dez. 2017.

OLIFERENKO, P. V. et al. Promising *Aedes aegypti* repellent chemotypes identified through integrated QSAR, virtual screening, synthesis, and bioassay. **PlosOne**, sep., v. 8, p. 1-13, 2013.

OLIVEIRA, J. H.; BAHIA, A. C.; VALE, P. F. How are arbovirus vectors able to tolerate infection? **ScienceDirect**, v. 103, feb. 2020.

OPAS. ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE. **Dengue nas Américas atinge o maior número de casos já registrado**, 2019. Disponível em: https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=6059:dengue-nasamericasatingeomaiornumerodecasosjaregistrado&Itemid=812. Acesso em: 08 abr. 2020.

OMS. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Chikungunya. **World Health Organization**, 2017. Disponível em: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/chikungunya>. Acesso em: 09 maio. 2019.

OSBOURN, A. E.; LANZOTTI, V. **Plants-derived natural products: synthesis, function, and application**. [S.l.]: Springer, 2009.

OUSSALAH, M. et al. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, v. 18, n. 5, p. 414-420, may. 2007.

PAIXÃO, K. S. Ecologia química de machos de *Aedes (Stegomyia) aegypti* Linnaeus, 1762 (Diptera: Culicidae) e identificação química de compostos presentes na cutícula de adultos. **Tese de doutorado**, Belo Horizonte, v. Universidade Federal de Minas Gerais, n. Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, 2011.

PATRICIO, E. F. L. R. A.; CRUZ-LÓPEZ, L.; MORGAN, E. D. Electroantennography in the study of two stingless bee species (Hymenoptera: Meliponini). **Brazilian Journal of Biology**, v. 64, n. 4, p. 827-831, nov. 2004.

PATTERSON, J.; SAMMON, M.; GARG, M. Dengue, zika and chikungunya: emerging arboviruses in the new world. **Western Journal of Emergency Medicine**, v. 17, n. 6, p. 671-679, nov. 2016.

PEREIRA, R. et al. Diversidade estrutural e potencial biológico dos metabólitos secundários de espécies do gênero *Myroxylon* L.f. (Fabaceae): uma revisão da literatura. **Hoehnea**, v. 46, n. 1, mar. 2019.

PEZZI, L. et al. GloPID-R report on chikungunya, o'nyong-nyong and mayaro virus, part 5: Entomological aspects. **Antiviral Research**, v. 174, feb. 2020.

PONTES, W. J. T. et al. Atividade acaricida dos óleos essenciais de folhas e frutos de *Xylopia sericea* sobre o ácaro rajado (*Tetranychus urticae* Koch). **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 838-841, jul. 2007.

POSEY, K. H.; SCHRECK, C. E. An airflow apparatus for selecting female mosquitoes for use in repellent and attraction studies. **Mosquito news**, v. 41, n. 3, p. 566-568, 1981.

PRAJAPATI, V. et al. Insecticidal, repellent and oviposition-deterrent activity of selected essential oils against *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 16, p. 1749-1757, nov. 2005.

PRATHIBHA, K. P.; RAGHAVENDRA, B. S.; VIJAYAN, V. A. Larvicidal, ovicidal, and oviposition-deterrent activities of four plant extracts against three mosquito species. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, p. 6736–6743, feb. 2014.

RAJKUMAR, S.; JEBANESAN, A. Chemical composition and larvicidal activity of leaf essential oil from *Clausena dentata* (Willd) M. Roam. (Rutaceae) against the chikungunya vector, *Aedes aegypti* Linn. (Diptera: Culicidae). **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 13, p. 107-109, 2010.

RASHAD, A. A. et al. A reassessment of mycophenolic acid as a lead compound for the development of inhibitors of chikungunya virus replication. **Tetrahedron**, v. 74, n. 12, p. 1294-1306, mar. 2018.

RAULT, L. C. et al. Age- and sex-related ABC transporter expression in pyrethroid-susceptible and –resistant *Aedes aegypti*. **Scientific Reports**, v. 9, Dec. 2019.

RIBEIRO, J. M. C. Blood-feeding in mosquitoes: probing time and salivary gland anti-haemostatic activities in representatives of three genera (*Aedes*, *Anopheles*, *Culex*). **Medical and Veterinary Entomology**, v. 14, p. 142-148, dec. 2001.

RIBEIRO, J. M. C. et al. A deep insight into the sialome of male and female *Aedes aegypti* mosquitoes. **PlosOne**, p. 1-20, mar. 2016.

RODRIGUES, L. C. Microcephaly and zika virus infection. **The Lancet**, v. 387, n. 10033, p. 2070-2072, may. 2016.

SAAVEDRA, L. M. et al. The quantitative structure–insecticidal activity relationships from plant derived compounds against chikungunya and zika *Aedes aegypti* (Diptera:Culicidae) vector. **Science of The Total Environment**, v. 610-611, p. 937-943, jan. 2018.

SALGADO, D. M. et al. Clinical, laboratory and immune aspects of zika virus-associated encephalitis in children. **ScienceDirect**, International Journal of Infectious Diseases, v. 90, p. 104-110, jan. 2020.

SANTOS, N. D. L. et al. Oviposition-stimulant and ovicidal activities of *Moringa oleifera* lectin on *Aedes aegypti*. **PlosOne**, v. 7, n. 9, p. 1-8, sep. 2012.

SANTOS, G. K. N. et al. Essential oils from *Alpinia purpurata* (Zingiberaceae): chemical composition, oviposition deterrence, larvicidal and antibacterial activity. **Industrial Crops and Products**, v. 40, p. 254-260, nov. 2012.

SCALON, S. P. Q.; FILHO, H. S.; RIGONI, M. R. Armazenamento e germinação de sementes de uvaia *Eugenia uvalha* Cambess. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 28, n. 6, p. 1228-1234, dez. 2004.

SCHIEST, F. P.; MARION-POLL, F. Detection of physiologically active flower volatiles using gas chromatography coupled with electroantennography. In: JACKSON, J. F.; LINSKENS, H. F. **Analysis of Taste and Aroma**. [S.l.]: Springer, v. 21, 2002.

SCHWARTZ, L. M. et al. The dengue vaccine pipeline: Implications for the future of dengue control. *Vaccine*, v. 33, n. 29, p. 3293-3298, june. 2015.

SILVA, N. M. et al. Vigilância de chikungunya no Brasil: desafios no contexto da saúde pública. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 27, n. 3, p. 1-10, set. 2018.

SILVA, R. C. S. et al. (E)-Caryophyllene and α -Humulene: *Aedes aegypti* oviposition deterrents elucidated by gas chromatography-electrophysiological assay of *Commiphora leptophloeos* Leaf oil. **PlosOne**, p. 1-14, dec. 2015.

SILVA, A. G. et al. Chemical composition and larvicidal activity of the essential oil from leaves of *Eugenia brejoensis* Mazine (Myrtaceae). **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 18, n. 6, p. 1441-1447, dec. 2015.

SILVA, D. M. et al. Ent-kaurane diterpenoids and other constituents from the stem of *Xylopia laevigata* (Annonaceae). **Química Nova**, v. 35, n. 8, p. 1570-1576, 2012.

SILVA, J. S.; MARIANO, Z. F.; SCOPEL, S. A dengue no Brasil e as políticas públicas de combate ao *Aedes aegypti*: da tentativa de erradicação às políticas de controle. **Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde**, v. 3, n. 6, p. 163-175, mar. 2008.

SILVA, S. L. et al. Cytotoxic evaluation of essential oil from *Casearia sylvestris* Sw on human cancer cells and erythrocytes. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 31, n. 1, 2008.

SILVA-JÚNIOR, E. F. et al. The medicinal chemistry of chikungunya virus. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 25, n. 16, p. 4219-4244, aug. 2017.

SIM, S.; RAMIREZ, J. L.; DIMOPOULOS, G. Dengue virus infection of the *Aedes aegypti* salivary gland and chemosensory apparatus induces genes that modulate infection and blood-feeding behavior. **PLOS PATHOGENS**, v. 8, n. 3, p. 1-15, mar. 2012.

SIMAS, N. K. et al. Produtos naturais para o controle da transmissão da dengue — atividade larvicida de *Myroxylon balsamum* (óleo vermelho) e de terpenóides e fenilpropanóides. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 46-49, fev. 2004.

SOBRAL, M.; FARIA JR, E. Q.; PROENÇA, C. E. B. A new species of *Algrizea* (Myrtaceae) from Bahia, Brazil. **Neodiversity**, v. 5, p. 1-6, dec. 2010.

SOONWERA, M. Efficacy of essential oil from *Cananga odorata* (Lamk.) Hook.f. & Thomson (Annonaceae) against three mosquito species *Aedes aegypti* (L.), *Anopheles dirus* (Peyton and Harrison), and *Culex quinquefasciatus* (Say). **Parasitology Research**, v. 114, p. 4531–4543, 2015.

SOUZA, M. A. et al. Adulticide and repellent activity of essential oils against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) – A review. **South African Journal of Botany**, v. 124, p. 160-165, aug. 2019.

STANCZYK, N. M. et al. *Aedes aegypti* mosquitoes exhibit decreased repellency by DEET following previous exposure. **PlosOne**, 2013.

STANCZYK, N. M. et al. Behavioral insensitivity to DEET in *Aedes aegypti* is a genetically determined trait residing in changes in sensillum function. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 19, p. 8575-8580, May. 2010.

STEFANELLO, M. E. A.; PASCOAL, A. C. R. F.; SALVADOR, M. J. Essential oils from neotropical Myrtaceae: chemical diversity and biological properties. **Chemistry and Biodiversity**, v. 8, p. 73-94, jan. 2011.

STIEVEN, A. C.; MOREIRA, J. J. S.; SILVA, C. F. Óleos essenciais de uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess): avaliação das atividades microbiana e antioxidante. **Eclética Química**, v. 34, n. 3, p. 7 - 13, 2009.

SUMITHA, K. V.; THOPPIL, J. E. Larvicidal efficacy and chemical constituents of *O. gratissimum* L. (Lamiaceae) essential oil against *Aedes albopictus* Skuse (Diptera: Culicidae). **Parasitology Research volume**, v. 115, p. 673–680, oct. 2015.

SUWANMANEE, S.; LUPLEETLOP, N. Dengue and zika viruses: lessons learned from the similarities between these *Aedes* mosquito-vectored arboviruses. **Journal of Microbiology**, v. 55, n. 2, p. 81-89, feb. 2017.

SWALE, D. R. et al. Neurotoxicity and Mode of Action of N,N-Diethyl-Meta-Toluamide (DEET). **PlosOne**, v. 9, n. 8, p. 1-11, aug. 2014.

SWAMINATHAN, S.; KHANNA, N. Dengue vaccine development: Global and Indian scenarios. **International Journal of Infectious Diseases**, jan. 2019.

SYED, Z.; LEAL, W. S. Mosquitoes smell and avoid the insect repellent DEET. **Proceedings of the National Academy of the Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 36, p. 13598-13603, sep. 2008.

SYLVESTRE, G.; GANDINI, M.; MACIEL-DE-FREITAS, R. Age-dependent effects of oral infection with dengue virus on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) feeding behavior, survival, oviposition success and fecundity. **PlosOne**, v. 8, n. 3, p. 1-8, mar. 2013.

TABANCA, N. et al. Characterization and comparison of five eucalyptus essential oils and their repellent activity against *Aedes aegypti*. **Planta Medica**, v. 76, p. 49, 2010.

TAUIL, P. L. Aspectos críticos do controle da dengue no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 18, n. 3, p. 867-871, jun. 2002.

TEIXEIRA, M. G.; BARRETO, M. L.; GUERRA, Z. Epidemiologia e medidas de prevenção do Dengue. **Informe Epidemiológico do Sus**, Brasília, 8, n. 4, dez. 1999.

TENNYSON, S. et al. Effect of *Ageratum houstonianum* Mill. (Asteraceae) leaf extracts on the oviposition activity of *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **Parasitology Research**, v. 111, n. 6, p. 2295–2299, dec. 2012.

THAVARA, U. et al. Laboratory and field evaluations of the insect repellent 3535 (ethyl butylacetylaminopropionate) and deet against mosquito vectors in Thailand. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 17, n. 3, p. 190-5, set. 2001.

TUETUN, B. et al. Comparative repellency of *A. graveolens* and commercial products. **Tropical and medicine & international health: TM & IH**, Oxford, v. 10, p. 1190-1198, nov. 2005.

UTSUNOMUYA, H. S. M. et al. Influência do Parque da Biquinha como foco de *Aedes (Stegomyia) aegypti* em relação a área urbana. **Revista Eletrônica de Biologia**, v. 1, n. 3, p. 21-30, 2008.

VARGAS, M. **El mosquito un enemigo peligroso (Diptera: Culicidae)**. 2. ed. [S.l.]: Editora de la universidad de Costa Rica, 1998.

VENTURA, C. V. et al. Zika virus in Brazil and macular atrophy in a child with microcephaly. **The Lancet**, v. 387, n. 10015, p. 228, jan. 2016.

VERAS, B. O. et al. *Algrizea Minor* Sobral, Faria & Proença (Myrteae, Myrtaceae): chemical composition, antinociceptive, antimicrobial and antioxidant activity of essential oil. **Natural Product Research**, p. 1-5, apr. 2019.

VIEIRA, C. J. et al. Ecological aspects of potential arbovirus vectors (Diptera: Culicidae) in an urban landscape of Southern Amazon, Brazil. **ScienceDirect**, v. 202, feb. 2020.

VILAR, W. T. S. et al. Determination of N, N-diethyl-3-methylbenzamide and ethyl-butyl-acetylaminopropionate in insect repellent using near infrared spectroscopy and multivariate calibration. **Microchemical Journal**, v. 152, jan. 2020.

VINAUGER, C. et al. Modulation of host learning in *Aedes aegypti* mosquitoes. **CellPress**, v. 28, p. 333–344, feb. 2018.

VOGEL, K. J.; BROWN, M. R.; STRAND, M. R. Ovary ecdysteroidogenic hormone requires a receptor tyrosine kinase to activate egg formation in the mosquito *Aedes aegypti*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 16, p. 5057–5062, apr. 2015.

WANNES, W. A. et al. Antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts from myrtle (*Myrtus communis* var. *italica* L.) leaf, stem and flower. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 1362-1370, 2010.

WARIKOO, R.; WAHAB, N.; KUMAR, S. Oviposition-altering and ovicidal potentials of five essential oils against female adults of the dengue vector, *Aedes aegypti* L. **Parasitology research**, v. 109, n. 8, p. 1125–1131, oct. 2011.

WARIKOO, R.; KUMAR, S. Impact of the *Argemone mexicana* stem extracts on the reproductive fitness and behavior of adult dengue vector, *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). **International Journal of Insect Science**, v. 6, p. 71-78, sep. 2014.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Dengue control. **World Health Organization**, 2016. Disponível em: <https://www.who.int/denguecontrol/epidemiology/en/>. Acesso em: 15 maio. 2019.

ZHANG, L.; WANG, S. A time-periodic and reaction–diffusion Dengue fever model with extrinsic incubation period and crowding effects. **ScienceDirect**, v. 51, feb. 2020.

ZOGHBI, M. G. B. et al. Chemical variability of the volatiles from the leaves of *Eugenia protenta* McVaugh (Myrtaceae) growing wild in the North of Brazil. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 39, p. 660-665, dec. 2011.

ZWIEBEL, L. J.; TAKKEN, W. Olfactory regulation of mosquito–host interactions. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 34, n. 7, p. 645–652, may. 2011.

APÊNDICE A – PATENTE

DETERRENTE DE OVIPOSIÇÃO PARA O *Ae. aegypti* DA MICROEMULSÃO DO ÓLEO DE *Eugenia uniflora*

[01] A presente invenção refere-se a uma microemulsão constituída por um sistema isotrópico termodinamicamente estável na qual o óleo da *Eugenia uniflora* encontra-se disperso entre meio aquoso, solvente e surfactante, essa microemulsão formada é capaz de inibir a postura de ovos do mosquito fêmea *Ae. aegypti* em ambientes contendo água parada.

[02] A microemulsão formada impede que fêmeas grávidas de *Ae. aegypti* depositem seus ovos no ambiente, reduzindo assim o número de criadouros e consequentemente o número de larvas e mosquitos no meio ambiente.

[03] O produto desenvolvido atinge a fase inicial de propagação do vetor *Ae. aegypti* com isso tal microemulsão ajudará a reduzir o número de insetos vetores no ambiente e com isso reduzirá o número de casos futuros de enfermidades causadas por tais insetos, assim poderá ser um grande aliado das vigilâncias epidemiológica, entomológica e ambiental e um nicho de mercado para as indústrias de inseticidas e repelentes.

[04] Atualmente o que temos no mercado são produtos larvicidas, inseticidas e repelentes tópicos para o mosquito *Ae. aegypti*, porém não foi encontrado nenhum produto feito a partir de microemulsão de óleo de *Eugenia uniflora* como deterrente de oviposição para *Ae. aegypti*.

[05] Após copularem, as fêmeas do mosquito *Ae. aegypti* depositam seus ovos em ambientes aquáticos e dão início a um novo ciclo biológico.

[06] Cada fêmea de *Ae. aegypti* é capaz de por até 200 ovos por postura e os mesmos podem permanecer no ambiente por até 1 ano sem eclodirem, isso se dá devido fenômeno de diapausa na qual mesmo em ambientes secos, ovos permanecem ativos até que surja um ambiente favorável para seu desenvolvimento.

[07] Com o intuito de inibir a postura de ovos de fêmeas grávidas de *Ae. aegypti* desenvolveu-se uma microemulsão formada a partir do óleo de *Eugenia uniflora*, através do qual o processo de oviposição é reduzido em níveis significativos,

proporcionando assim uma diminuição do número de mosquitos *Ae. aegypti* acarretando futuramente na diminuição do número de enfermidades como: dengue, chikungunya, zika, microcefalia e febre amarela.

[08] A microemulsão do óleo de *Eugenia uniflora* age no sistema nervoso periférico da fêmea do mosquito *Ae. aegypti* na qual estão inseridos os órgãos de sentido, assim ao captar o odor dos compostos presentes na microemulsão os transformam em impulsos nervosos que conduzirão a mudanças comportamentais frente a oviposição.

[09] O processo de obtenção da microemulsão inicia-se com a coleta de folhas frescas de *Eugenia uniflora*; posteriormente tais folhas são trituradas e postas em aparelho de Clevenger para realização da hidrodestilação a temperatura de 100°C; após extração do óleo o mesmo é disperso num sistema isotrópico formado por hexano, água destilada e Tween® 80 (tensoativo).

[10] A identificação e caracterização do óleo foi realizada através das técnicas de Cromatografia Gasosa (GC) e Cromatografia Gasosa acoplada com espectrômetro de massa (GC-MS).

[11] Foram realizados testes de eletroantenografia (EAD) com o óleo de *Eugenia uniflora* em antenas de mosquitos fêmeas de *Ae. aegypti* e os resultados obtidos mostraram que alguns compostos presentes no óleo foram eletrofisiologicamente ativos, ou seja, a fêmea do *Ae. aegypti* através das sensilas reconhece os receptores químicos a que estão sendo submetidas, com isso transformam esses estímulos em impulsos nervosos na qual irão mudar o seu comportamento frente a oviposição.

[12] No teste de deterência de oviposição, foi preparada uma solução estoque de concentração 100ppm, usando 10mg do óleo de *Eugenia uniflora*, solubilizado em 1 mL de hexano e 0,5g de Tween® 80; posteriormente foi acrescida água destilada até volume final de 100mL em balão volumétrico.

[13] A solução utilizada como controle também foi preparada em balão volumétrico de 100mL adicionando-se 1mL de hexano, 0,5g de Tween® 80 e água destilada até marca do menisco.

[14] Foram testadas concentrações da microemulsão do óleo de *Eugenia uniflora* que variam de 5 a 50 ppm.

[15] Os bioensaios de deterrência de oviposição foram realizados com 80 fêmeas grávidas de *Ae. aegypti* acondicionadas em gaiolas de metal e acrílico no tamanho (33x21x30 cm), cobertas com tecido, conforme mostrado na Figura 1.

[16] Foram utilizadas 8 gaiolas nos bioensaios de deterrência de oviposição, cada gaiola continha 10 fêmeas grávidas de *Ae. aegypti* e 2 copos de vidro com papel filtro em seu interior contendo 25mL de solução dispostos lateralmente no interior de cada gaiola (cada papel de filtro possuía 12cm de comprimento e largura).

[17] Os copos contidos no interior das gaiolas foram distribuídos de forma randômica, sendo sempre um copo contendo uma solução controle e um copo contendo uma solução teste (microemulsão).

[18] Durante os bioensaios as fêmeas de *Ae. aegypti* ficaram no escuro por 16h, sendo aclimatizadas a temperatura de $27\pm1^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de $70\pm5\%$.

[19] Após término das 16h, no escuro, os copos contendo as soluções controle e teste, foram retirados do interior das gaiolas e o número de ovos, contidos em cada papel filtro foram contabilizados, conforme mostrado na Figura 2.

[20] Todos os dados foram estatisticamente analisados utilizando o teste t de Student, onde valores com $p<0,05$ dão evidência a hipótese alternativa, ou seja, o conjunto de dados analisados possuem diferenças significativas entre os valores médios.

[21] Os bioensaios foram realizados com intuito de analisar o comportamento das fêmeas grávidas de *Ae. aegypti* frente a oviposição quando os mosquitos são submetidos ao odor gerado pelos compostos voláteis presentes na microemulsão do óleo de *Eugenia uniflora*.

[22] Os resultados encontrados mostraram que houve uma diferença significativa entre o número de ovos presentes no controle e o número de ovos presentes no teste (microemulsão).

[23] Tanto a concentração de 5 ppm quanto a concentração de 50ppm apresentaram redução do número de ovos postos pela fêmea no copo com a microemulsão frente o copo com a amostra controle.

[24] Na concentração de 5ppm a microemulsão apresentou um percentual de deterrência na oviposição de 65,5%, enquanto que na concentração de 50ppm a mesma apresentou uma deterrência na oviposição de 73,66%.

[25] A Figura 3 mostra o gráfico do resultado obtido para a microemulsão na concentração de 5ppm e a Figura 4 mostra o gráfico do resultado obtido para a microemulsão na concentração de 50ppm.

[26] Ambas amostras testadas mostraram um percentual de deterência de mais de 65% para oviposição e a microemulsão na concentração de 50ppm apresentou uma deterência de mais de 70% para oviposição, isso indica que a microemulsão do óleo de *Eugenia uniflora* é capaz de inibir em mais de 65% a postura de ovos para fêmeas grávidas de *Ae. aegypti*.

[27] A microemulsão do óleo de *Eugenia uniflora* além de ser capaz de inibir a postura de ovos de mosquitos fêmeas de *Ae. aegypti* possui um baixo custo de produção, fácil manuseio, toxicidade baixa e elevada possibilidade na aplicabilidade comercial.

REIVINDICAÇÕES

[01] DETERRENTE DE OVIPOSIÇÃO PARA O *Ae. aegypti* DA MICROEMULSÃO DO ÓLEO DE *Eugenia uniflora*, caracterizado por ser uma solução obtida a partir do óleo de *Eugenia uniflora* e extraída pelo processo de hidrodestilação.

[02] DETERRENTE DE OVIPOSIÇÃO PARA O *Ae. aegypti* DA MICROEMULSÃO DO ÓLEO DE *Eugenia uniflora* de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela dispersão entre meio aquoso, solvente e surfactante.

[03] DETERRENTE DE OVIPOSIÇÃO PARA O *Ae. aegypti* DA MICROEMULSÃO DO ÓLEO DE *Eugenia uniflora* de acordo com as reivindicações 1 e 2, caracterizado por ser um sistema isotrópico, termodinamicamente estável.

[04] DETERRENTE DE OVIPOSIÇÃO PARA O *Ae. aegypti* DA MICROEMULSÃO DO ÓLEO DE *Eugenia uniflora* de acordo com as reivindicações 1, 2 e 3, caracterizado pela solução ser adicionada ou incorporada a materiais nano-estruturados, poliméricos e ou cerâmicos.

[05] DETERRENTE DE OVIPOSIÇÃO PARA O *Ae. aegypti* DA MICROEMULSÃO DO ÓLEO DE *Eugenia uniflora* de acordo com as reivindicações 1, 2 e 3, caracterizado pela produção de um sistema opticamente transparente, isotrópico e de baixa viscosidade.

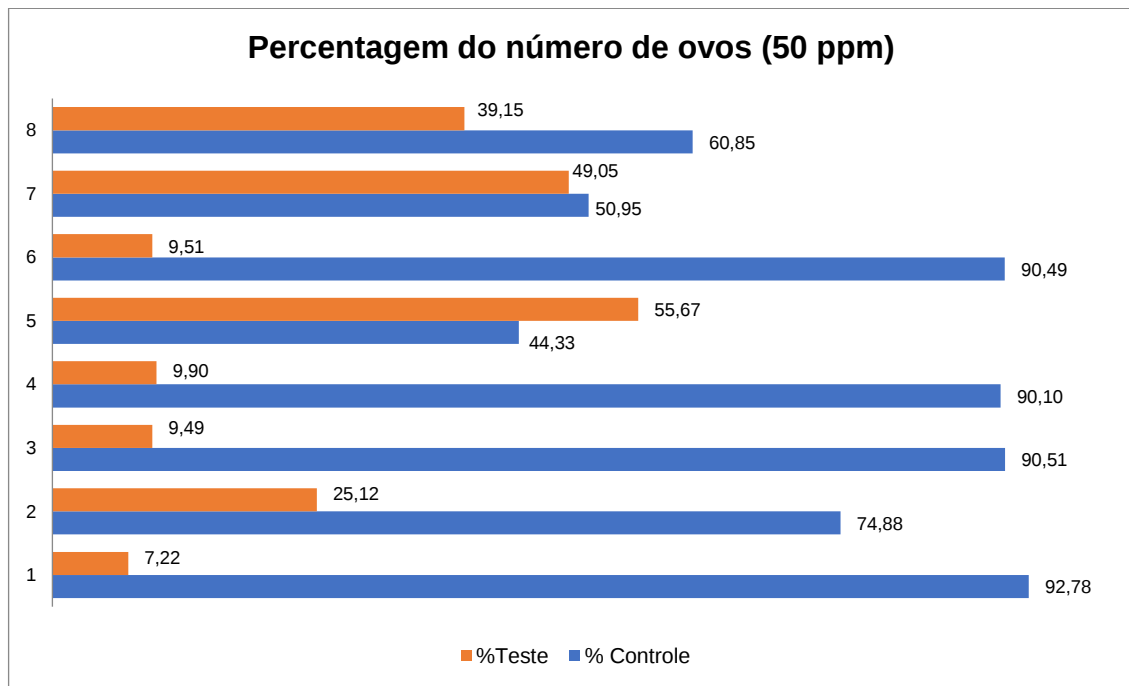
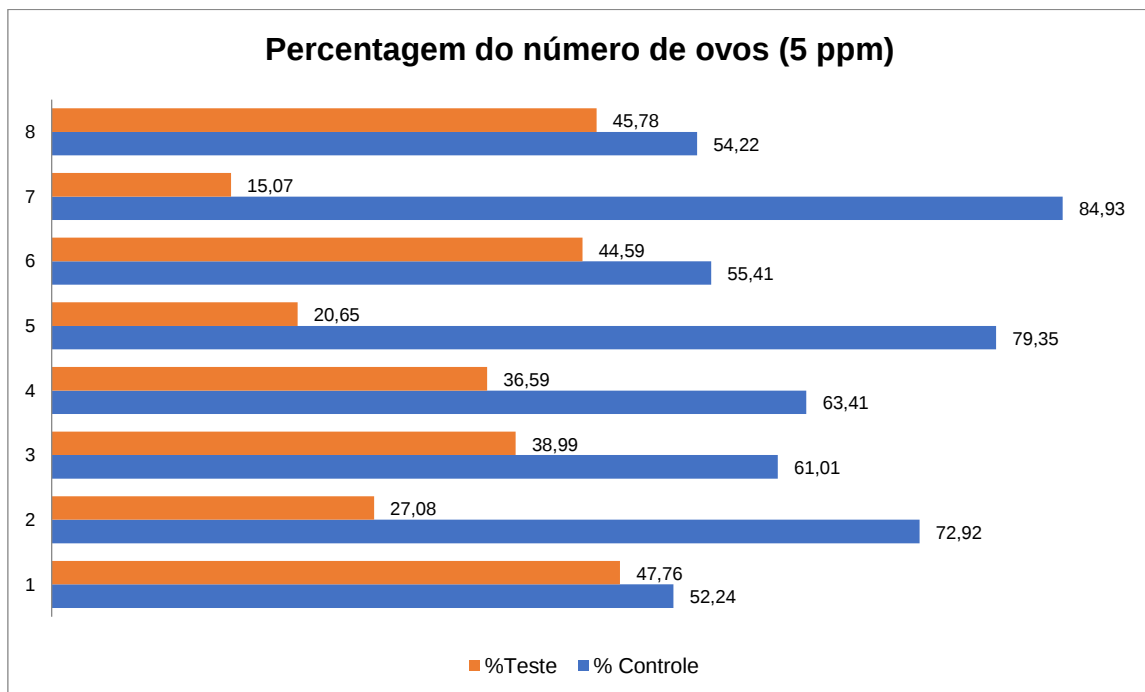
FIGURAS

Figura 1:



Figura 2:



Figura 3:**Figura 4:**

RESUMO

DETERRENTE DE OVIPOSIÇÃO PARA O *Ae. aegypti* DA MICROEMULSÃO DO ÓLEO DE *Eugenia uniflora*

Uma microemulsão capaz de inibir a postura de ovos de mosquitos fêmeas de *Ae. aegypti*. A extração do óleo essencial foi realizada pela técnica de hidrodestilação. A identificação e caracterização do óleo essencial de *Eugenia uniflora* foi realizada através das técnicas de Cromatografia Gasosa (GC) e Cromatografia Gasosa acoplada com espectrômetro de massa (GC-MS). No bioensaio de oviposição foi utilizada uma solução estoque de 100ppm que posteriormente foi diluída até a concentração desejada. Na oviposição foram utilizadas 8 gaiolas nos experimentos sendo que cada gaiola continha uma quantidade de 10 fêmeas grávidas de *Ae. aegypti*. Dentro de cada gaiola havia dois copos contendo papel de filtro em seu interior juntamente com as soluções controle e teste (microemulsão). Os resultados obtidos mostraram que na concentração de 5 ppm a microemulsão foi capaz de inibir a postura de ovos de mosquitos fêmeas de *Ae. aegypti* em 65,5% e na concentração de 50ppm essa deterrência na oviposição foi de 73,66%, o que mostra que a micromulsão testada foi capaz de inibir a postura de ovos de fêmeas de *Ae. aegypti* em mais de 65%.

APÊNDICE B – COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

Tabela 1- Composição química dos óleos essenciais de *Eugenia uniflora*, *Eugenia uvalha*, *Xylopia sericea*, *Algrizea minor* e *Myroxylon peruiferum*

Componente	Área (%)						
	IR _{cal}	IR _{lit}	<i>E. uniflora</i>	<i>E. uvalha</i>	<i>X.sericea</i>	<i>A. minor</i>	<i>M. peruiferum</i>
α - pineno	932	932	0,00	0,00	0,20	0,00	18,03
σ - Elemeno	1338	1335	0,52	0,00	0,29	0,00	0,00
α - Cubebeno	1351	1348	0,00	0,75	0,52	0,16	7,81
α -Ylangeno	1372	1373	0,00	0,07	0,26	1,19	0,00
α -Copaeno	1377	1374	0,00	6,23	3,37	4,92	2,07
β - Bourboneno	1386	1387	0,00	4,79	0,00	4,86	4,94
β - Cubebeno	1391	1387	0,00	0,00	1,21	0,00	1,90
β – Elemeno	1393	1389	4,83	1,31	1,68	4,33	0,23
α - Gurjuneno	1411	1409	0,00	0,00	0,45	0,01	0,00
β-Cariofileno	1421	1417	2,23	3,79	19,23	3,61	0,38
β – Copaeno	1430	1430	0,00	0,63	0,23	0,39	0,31
Υ - Elemeno	1435	1434	0,82	0,00	0,00	0,96	0,00
Aromadendreno	1440	1439	0,00	1,07	0,65	0,38	0,00
6,9 - guaiadieno	1445	1442	0,00	0,49	0,00	1,59	0,50
α - Humuleno	1455	1452	0,00	1,64	1,76	0,00	0,00
allo-Aromadendreno	1462	1458	0,00	0,51	0,91	0,53	0,20
trans-Muurolo-4(14),5-dieno	1468	1465	0,00	0,24	0,00	0,00	0,00
β - Chamigrene	1477	1476	0,83	0,00	0,00	0,00	0,00
Υ - Muuroleno	1478	1478	0,00	1,69	0,84	1,04	0,24
Germacreno D	1482	1484	0,00	0,00	2,49	25,17	0,00
β - Selineno	1487	1489	1,04	0,35	0,00	0,01	0,96
Valenceno	1496	1496	0,00	0,29	0,00	0,00	0,00
Curzereno	1498	1499	31,30	0,00	0,00	0,00	0,00
Biciclogermacreno	1497	1500	0,00	0,00	3,41	3,95	0,00
α - Muuroleno	1501	1500	0,00	0,83	0,65	0,01	2,43
α - Bulneseno	1506	1509	0,43	0,00	0,00	0,00	0,00
Υ - Cadineno	1515	1513	0,00	0,96	0,53	0,29	2,69
trans - Calameneno	1525	1521	0,29	1,01	1,67	0,00	0,00
σ - Cadineno	1525	1522	0,29	0,00	0,00	0,00	0,00
Selina-3,7(11)-dieno	1544	1545	0,40	0,00	0,00	0,00	0,00

Germacreno B	1559	1559	7,22	0,00	0,16	0,01	0,00
β - Calacoreno	1565	1564	0,00	0,00	0,26	0,00	0,00
Maaliol	1569	1566	0,00	0,50	0,61	0,00	0,00
Caryolan-8-ol	1572	1571	0,00	0,43	0,00	0,00	0,00
Espatulanol	1580	1577	2,09	4,43	27,33	0,01	8,84
Óxido de cariofileno	1583	1582	1,78	38,76	16,20	0,00	1,30
Globulol	1594	1590	0,00	1,12	0,00	0,01	0,00
Viridiflorol	1594	1592	0,20	0,00	1,38	0,00	0,00
Salvia-4(14)-em-1-ona	1596	1594	0,00	0,00	0,74	0,00	0,74
Ledol	1605	1602	0,00	0,00	0,89	0,00	0,00
trans- β - Elemenone	1606	1602	0,84	0,00	0,00	0,00	0,00
Epóxido de Humuleno II	1612	1608	0,00	5,77	0,76	0,00	0,00
2-(7Z)-Bisaboladien-4-ol	1621	1618	0,00	0,00	0,34	0,00	0,00
Junenol	1621	1618	0,00	0,32	0,00	0,00	0,00
1-epi - Cubenol	1630	1627	0,00	1,60	0,39	0,00	0,00
Eremoligenol	1628	1629	0,20	0,00	0,00	0,00	0,00
Guaia-6,10(14)-diene-4- β -ol	1641	1631	0,00	0,00	1,59	0,00	0,00
epi- α - Muurulol	1644	1640	0,00	1,73	2,27	0,00	0,00
α - Muurulol	1648	1644	0,00	0,73	0,45	0,00	0,96
α - Cadinol	1657	1652	0,00	1,65	1,59	0,00	1,38
Selin-11-en-4- α -ol	1657	1658	1,62	0,00	0,00	0,00	0,00
Atractilona	1664	1657	10,24	0,00	0,00	0,00	0,00
cis-Calamenen-10-ol	1661	1660	0,00	1,19	0,00	0,00	0,00
trans-Calamenen-10-ol	1670	1668	0,00	0,77	0,00	0,00	0,00
Cadaleno	1677	1675	0,00	0,48	0,00	0,00	0,00
Mustakone	1681	1676	0,00	0,59	0,00	0,00	0,00
Germacra-4(15),5,10(14)trien-1- α -ol	1688	1685	0,00	0,51	0,00	0,00	0,00
(Z)- α -trans-Bergamotol	1688	1690	0,00	0,00	1,08	0,00	0,00
5-neo - Cedranol	1693	1684	0,00	0,00	0,26	0,00	0,00
Germacrona	1698	1693	16,80	0,00	0,00	0,00	0,00
δ - Elemenol	1335	1339	0,00	0,00	0,00	40,36	0,00
Trans - Cadinol-1(6),4-diene	1475	1475	0,00	0,00	0,00	1,46	0,26
δ - Selineno	1492	1493	0,00	0,00	0,00	1,23	0,00

Germacreno A	1508	1507	0,00	0,00	0,00	0,86	0,00
δ - Cadineno	1522	1525	0,00	0,00	0,00	2,55	14,18
Trans - Cadina-1,4-dieno	1533	1534	0,00	0,00	0,00	0,01	2,26
α - Cadineno	1537	1539	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00
Elemol	1548	1551	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00
β - Pineno	974	974	0,00	0,00	0,00	0,00	3,50
ρ - Cimeneno	1020	1023	0,00	0,00	0,00	0,00	2,60
Limoneno	1024	1027	0,00	0,00	0,00	0,00	0,94
ρ - Cimeneno	1089	1089	0,00	0,00	0,00	0,00	1,43
Europelargono A	1538	1542	0,00	0,00	0,00	0,00	1,89
α - Calacoreno	1544	1545	0,00	0,00	0,00	0,00	1,37
1- Epi-Cubenol	1627	1630	0,00	0,00	0,00	0,00	0,96
Grupos							
Monoterpenos			0,00	0,00	0,20	0,00	26,49
Sesquiterpenos			18,90	27,13	40,57	99,86	42,72
Sesquiterpenos oxigenados			65,07	60,10	55,88	0,03	16,07
Total			83,97	87,23	96,65	99,89	85,28

IR calc: Índice de retenção calculado

IR lit: Índice de retenção da literatura (Adams, 2007)