



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM
CIÊNCIAS AMBIENTAIS

HEURISONGLEY SOUSA TEIXEIRA

Caracterização química e avaliação da atividade repelente contra o *Aedes aegypti* L. dos óleos essenciais de *Croton argyrophyllus* Kunth e *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle

Itapetinga, Bahia

Abril – 2021

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM
CIÊNCIAS AMBIENTAIS

Caracterização química e avaliação da atividade repelente contra o *Aedes aegypti* L. dos óleos essenciais de *Croton argyrophyllus* Kunth e *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Ambientais da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - Área de concentração: Sociedade Meio Ambiente e Desenvolvimento, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS.

Orientadora: Profa. Dra. Simone Andrade Gualberto
Co-orientadora: Profa. Dra. Débora Cardoso da Silva

Itapetinga - Bahia
Abril – 2021

632.9517 Teixeira, Heurisongly Sousa
T266c Caracterização química e avaliação da atividade repelente contra o *Aedes aegypti* L. dos óleos essenciais de *Croton argyrophyllus* Kunth e *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle. / Heurisongly Sousa Teixeira. – Itapetinga, BA: UESB, 2021.

75fl.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Ambientais da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - Área de concentração: Sociedade Meio Ambiente e Desenvolvimento, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS. Sob a orientação da Prof^a. D. Sc. Simone Andrade Gualberto e coorientação da Prof^a. D. Sc. Débora Cardoso da Silva.

1. Citronela e cróton – Repelente - *Aedes aegypti* L. 2. Óleos essenciais - Repelente espacial - *Aedes aegypti* L. 3. Cróton e citronela – Repelente – Característica química. I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Ambientais, *Campus* de Itapetinga. II. Gualberto, Simone Andrade. III. Silva, Débora Cardoso da. IV. Título.

CDD(21): 632.9517

Catálogo na Fonte:

Adalice Gustavo da Silva – CRB 535-5^a Região
Bibliotecária – UESB – Campus de Itapetinga-BA

Índice Sistemático para desdobramentos por Assunto:

1. *Aedes aegypti* L.
2. *Croton argyrophyllus*
3. *Cymbopogon nardus*

HEURISONGI EY SOUZA TEIXEIRA

“Caracterização química e atividade repelente contra o *Aedes aegypti* L. dos óleos essenciais de *Croton argyrophyllus* Kunth e *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle”

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Campus de Itapetinga, BA. Área de Concentração: Meio Ambiente e Desenvolvimento.

Aprovado em: 26/08/2019

BANCA EXAMINADORA



Prof.^a. Dr.^a. Simone Andrade Gualberto (Orientadora/UESB)



Dr.^a. Messulan Rodrigues Meira (PNPD/UESB)



Prof.^a. Dr.^a. Débora Cardoso da Silva (UESB)

No matter who you are, no matter where you go in life.
No matter how much money you got, or the friends you got,

You go need somebody.

(Ben King / Jerry Leiber / Mike Stoller)

Dedico esta dissertação à minha mãe Cenilda pela incansável dedicação, ao meu Pai José Alves (*in memoriam*), meu filho Pedro e aos meus irmãos Gheu, Nátila e Késsio.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por todos os caminhos percorridos, todas as coisas conquistadas e por todas as pessoas próximas a mim.

À minha família, em especial à minha mãe, que incansavelmente me apoiou e sozinha se dedicou a todos os afazeres de casa. À minha irmã Gheu, que sempre foi minha inspiração.

À minha orientadora, Dra. Simone, que tanto se dedicou e proporcionou que este trabalho fosse construído, mostrando os caminhos e passos a seguir.

Às professoras Dra. Sandra Lúcia da Cunha e Silva e Débora Cardoso da Silva, por seus ensinamentos e contribuições.

Aos colegas de turma de mestrado, sempre presentes, dispostos a escutar e abertos à novas ideias, além de saberem me valorizar como pessoa.

Ao grupo da carona pelas nossas *viajens* e viagens. Obrigado, meus novos amigos de hoje e sempre.

À Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, *Campus* de Itapetinga por esta oportunidade. Ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Ambientais por proporcionar o aperfeiçoamento científico em uma área de grande relevância para a região e para o país.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) que realizou as análises químicas dos óleos essenciais.

Ao Centro Universitário de Guanambi, que me apoiou no início desta caminhada, em especial aos amigos e professores Ricardo, Gustavo, Gabriela, Pablo, Daniel Santana e Cássio.

À Ferraz Martinelli farmácia de manipulação (Vittaflora), nas pessoas de Karol e Rose pelo apoio na etapa final deste trabalho.

A todos os integrantes dos Laboratórios LAPIN e LAPRON, em especial Daniel, Sara, Thaymara, Erica e Erlon, que tanto me ajudaram e se dedicaram a este trabalho.

Ao meu amigo Willian Viriato por todo o apoio e pelos momentos de conversas intermináveis. Também ao meu amigo Dr. Roberto, que sempre com palavras e gestos de carinho mostrou como é forte nossa amizade.

Aos meus amigos inseparáveis, Kleber Porto e Marcela, Edilmar (Dinho), Maurício e Marcos Cortes, por toda a ajuda concedida. Devo lembrar-lhes: grato é quem recebe e humilde é aquele que acha normal ou nem percebe que ajudou.

À Romário e Jussy, por quanto carinho e dedicação ao meu filho Pedro, estes agradecimentos seriam pouco, muito obrigado!

Agradeço ao meu amigo Willian Oliveira, por grandes momentos juntos e também aos meus eternos amigos e professores, Zé Dias e Belarmino.

Aos membros da banca examinadora pela disposição suas contribuições e com sugestões construtivas.

Enfim, a todos os meus amigos, principalmente os de infância e juventude (Os fila boias): sou o que sou por causa de vocês.

O meu muito obrigado!

Sumário

1	INTRODUÇÃO GERAL	14
	CAPÍTULO I	16
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1	Caatinga.....	16
2.2	O gênero <i>Croton</i>	17
2.2.1	Distribuição geográfica	17
2.2.2	Morfologia do <i>Croton argyrophyllus</i> Kunth	18
2.2.3	Atividade farmacológica de <i>Croton argyrophyllus</i> Kunth	19
2.2.4	Atividade inseticida e repelente do gênero <i>Croton</i>	20
2.3	<i>Cymbopogon nardus</i> (L.) Rendle (Citronela).....	21
2.4	Características dos Óleos essenciais	22
2.5	Características e controle do mosquito <i>Aedes aegypti</i>	23
2.6	Características e propriedades dos repelentes	27
2.6.1	Tipos de repelentes	28
2.6.2	Testes de repelência espacial.....	30
	CAPÍTULO II.....	32
3	ABSTRACT	33
4	INTRODUCTION	34
5	MATERIALS AND METHODS	36
5.1	Collection and identification of plant material	36
5.2	Obtaining the emulsions and preparing the samples	38
5.3	Spatial repellency tests.....	39
5.4	Data analysis of the spatial repellency tests	41
6	RESULTS.....	42
7	DISCUSSION.....	46
8	CONCLUSION	53

9	ACKNOWLEDGMENT.....	53
10	AUTHORS 'CONTRIBUTIONS	53
11	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54
12	SUBTITLE	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentrações e tempos de ação estimados de repelentes disponíveis comercialmente no Brasil.....	29
--	----

FIGURAS

Figura 1. Distribuição mundial de <i>A. aegypti</i>	14
Figura 2. Distribuição geográfica do <i>Croton argyrophyllus</i> Kunth na America do Sul.....	17
Figura 3. Distribuição geográfica do <i>Croton argyrophyllus</i> no Brasil	18
Figura 4. Espécie de <i>Croton argyrophyllus</i> Kunth no seu habitat natural	18
Figura 5. Imagem do mosquito <i>A. aegypti</i> . A) macho; B) fêmea não alimentada;	24
Figura 6. Ciclo de vida do <i>Aedes aegypti</i>	25
Figura 7. Modelo esquemático do dispositivo usado no ensaio de repelência espacial	31

RESUMO

TEIXEIRA, H. S. Caracterização química e avaliação da atividade repelente contra o *Aedes aegypti* L. dos óleos essenciais de *Croton argyrophyllus* Kunth e *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle. Itapetinga-BA: UESB, 2018. 89 p. (Dissertação – Mestrado em Ciências Ambientais - Área de Concentração em Meio Ambiente e Desenvolvimento).

A disseminação das doenças transmitidas por vetores vem aumentando cada vez mais e alcançando novos continentes e países ao redor do mundo. Os insetos estão criando resistência aos inseticidas e repelentes sintéticos já conhecidos, principalmente o mosquito *Aedes aegypti*, que apresenta grande interesse na área médica, por ser o vetor de doenças como dengue e zica. Por estes motivos, vem aumentando no mundo o interesse por plantas que possam ser usadas como agentes de controle químico, como inseticidas e repelentes. O objetivo deste estudo será caracterizar quimicamente os óleos essenciais do *Croton argyrophyllus* Kunth (velame falso) e do *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle (citronela) e avaliar o potencial de repelência dos mesmos contra o mosquito *Aedes aegypti* L. As plantas foram coletadas na Região Sudoeste do Estado da Bahia, Brasil. Os óleos essenciais das folhas dessas espécies foram extraídos por hidrodestilação e seus constituintes químicos foram identificados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. Para a realização dos testes de repelência espacial, foi utilizado um dispositivo de acrílico indicado por Who (2013), adaptado e os insetos foram oriundos de colônias estabelecidas a partir de ovos da linhagem Rockefeller (foram utilizadas 20 fêmeas por repetição). Os óleos essenciais obtidos foram incorporados em uma emulsão não iônica, nas concentrações de 1, 2, 4 e 5%, usando como controle positivo formulações com o DEET nas mesmas concentrações. O rendimento na extração do óleo essencial de *Croton argyrophyllus* foi de 0,37% e o mesmo apresentou os seguintes componentes majoritários: E-cariofileno (18,23%), biciclogermacreno (16,24%), α -pineno (12,58%) e espatulenol (10,33%). O rendimento na extração do óleo essencial de *Cymbopogon nardus* foi de 1,06% e foram identificados como componentes químicos majoritários: citronelal (42,93%), geraniol (19,89%), citronelol (11,18%), elemol (6,57%) e limoneno (2,33%). Os testes de repelência espacial realizados com as emulsões incorporadas com os óleos essenciais de citronela e de velame falso nas concentrações de 1, 2, 4%, mostraram índices de atividade espacial (IAE), superiores ou próximos aos resultados das amostras com o DEET. As amostras com os óleos essenciais de cróton nas concentrações de 5% apresentaram inferiores ao DEET, esses resultados indicam que a saturação das câmaras com o óleo essencial em maiores concentrações pode ter interferido no senso de deslocamento e fuga dos mosquitos. Os óleos essenciais de citronela e de Croton, nas concentrações até 4% em emulsão não iônica, demonstraram ter atividade de repelência espacial, com índices calculados acima de 69%.

Palavras-Chaves: Compostos voláteis, citronela, CGMS, cróton, dengue, repelência espacial.

ABSTRACT

TEIXEIRA. H. S. Chemical characterization and repellent activity against *Aedes aegypti* L. mosquito of essential oils of *Croton argyrophyllus* Kunth e *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle. Itapetinga-BA: UESB, 2018. 89 p.

The spread of vector-borne diseases is increasing more and more and reaching new continents and countries around the world. These insects, particularly the *Aedes aegypti*, have created resistance to known insecticides and synthetic repellents. They have been object of interest to medical field as the vector for diseases such as malaria, dengue and zica. For these reasons, worldwide interest in plants that can be used as chemical control agents, such as insecticides and repellents. The aim of this study will be chemically characterize the essential oils of *Croton argyrophyllus* Kunth (velame falso) and *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle (citronella) and evaluate their repellency potential against the *Aedes aegypti* L. mosquito. The plants were collected in the southwestern region of Bahia State, Brazil. The essential oils of the leaves of the species were extracted by hydrodistillation and their chemical constituents were identified by gas chromatography coupled to mass spectrometry. For the performance of the spatial repellency tests, an acrylic device indicated by Who (2013) was used, adapted, and the insects came from colonies established from eggs of the Rockfelle lineage (20 females were used per repetition). The obtained essential oils were incorporated into a nonionic emulsion, second edition, at concentrations of 1, 2, 4 and 5% using as a positive control formulations with DEET in the same concentrations. The extraction yield of *Croton argyrophyllus* essential oil was 0.37% and it had the following major components: E-caryophyllene (18.23%), bicyclogermacrene (16.24%), α -pinene (12.58%) and spathulenol (10.33%). The extraction yield of *Cymbopogon nardus* essential oil was 1.06% and the major chemical components were identified as citronellal (42.93%), geraniol (19.89%), citronelol (11.18%), elemol (6.57%) and limonene (2.33%). Spatial repellency tests performed with emulsions incorporated with citronella and velame falso essential oils at concentrations of 1, 2 e 4% showed spatial activity index (SAI), higher or close to the sample results with DEET.

These samples with *Croton* essential oils at concentrations of 5% showed lower than DEET, these results indicate that the saturation of the chambers with the essential oil in higher concentrations may have interfered with the mosquito's sense of displacement and escape. Citronella and *Croton* essential oils, at concentrations up to 4% in non-ionic emulsion, have been shown to have spatial repellent activity, with calculated rates above 69%.

Keywords: Volatile compounds, citronella, CGMS, croton, dengue, spatial repellency.

1 INTRODUÇÃO GERAL

Segundo a Organização Mundial de Saúde, a distribuição das doenças transmitidas por vetores é determinada por uma complexa rede de fatores, tanto ambientais como sociais. A globalização das viagens e do comércio, a urbanização não planejada e os desafios ambientais, como as alterações climáticas, são os principais motivos para o aparecimento destas doenças em países que não possuem em seu histórico casos de contaminação (WHO, 2016).

Os mosquitos da ordem Díptera e, principalmente, da família Culicidae são reconhecidos como uma ameaça para milhões de pessoas e animais em todo mundo. Eles são os vetores para a transmissão de diversas doenças, como malária, febre amarela, filariose, encefalite japonesa, dengue, chikungunya, febre do Nilo e Vírus Zika (WHO, 2016; ISLAM et al., 2017b).

No relatório da Organização Mundial de Saúde (WHO, 2019), estima-se que 390 milhões de infecções por dengue ocorrem a cada ano, e o número de países que relataram a doença mostra que 75% da população mundial está exposta à doença. Outros estudos de prevalência de dengue apontam que 3,9 milhões de pessoas, em 128 países, estão em risco de infecção pelo vírus transmitido pelo vetor da dengue (BECKER et al., 2012; BRADY et al., 2012).

O mosquito *Aedes aegypti* está se espalhando cada vez mais e alcançando novos continentes e países ao redor do mundo (Figura 1).

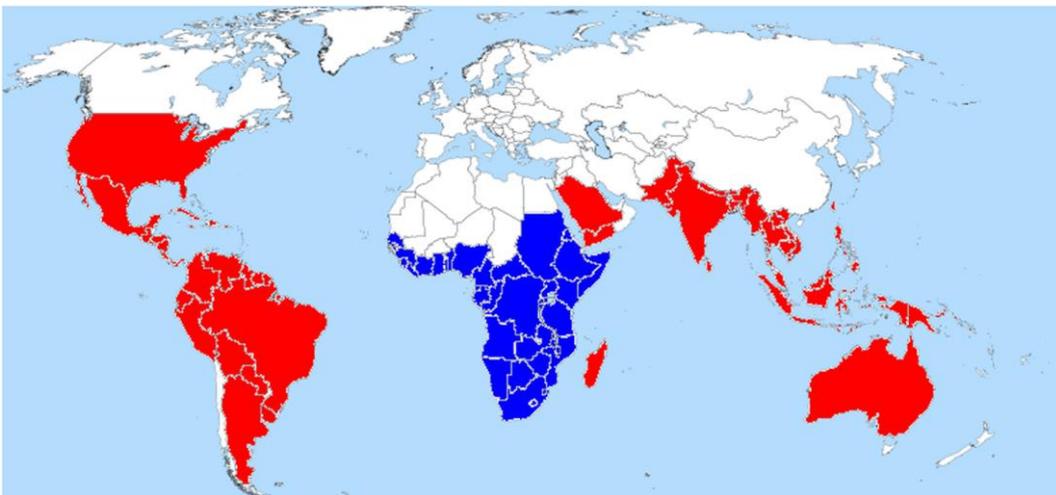


Figura 1. Distribuição mundial de *A. aegypti*

Nota: Azul = países com populações nativas; Vermelho = países com populações não nativas

Fonte: Becker et al (2012).

Outra situação que contribuiu para a proliferação desses vetores ao redor do mundo foi o desenvolvimento da resistência dos mosquitos aos inseticidas. Após 21 anos da descoberta do primeiro inseticida sintético eficaz, o diclorodifeniltricloroetano (DDT), em 1955, a Organização Mundial de Saúde (OMS) reconheceu problemas de intoxicação humana e resistências do mosquito *Anopheles* ao inseticida (WHO, 2008). Problemas estes, também, apontados para os inseticidas mais modernos, como os organofosforados, carbamatos e piretroides (HEMINGWAY, RANSON, 2000). Os mesmos autores descrevem pontos desfavoráveis à utilização dos inseticidas sintéticos, como o seu modo de uso extensivo e sem controle, o que gerou uma grande quantidade de resíduos e contribuiu para o aumento poluição ambiental. Com todos estes pontos negativos citados e ainda somados ao aumento do interesse por produtos orgânicos, o constante debate a preservação ambiental e saúde coletiva houve um aumento pelo interesse, no mundo inteiro, na busca de inseticidas botânicos (THACKER, 2002; ISMAN, 2006).

Mais recentemente, o interesse por “tecnologias verdes” está influenciando de maneira positiva às pesquisas e desenvolvimento de inseticidas e repelentes de origem vegetal, na tentativa de minimizar, retroagir ou impedir o avanço destes vetores pelo mundo. Muitas são as técnicas estudadas, dentre as quais podemos citar: o uso de repelentes naturais, redes inseticidas de longa duração (LLIN), introdução de insetos estéreis e mosquitos transgênicos, pesquisas que vem produzindo resultados encorajadores (ISLAM, 2017b).

A busca por inseticidas ou repelentes botânicos tem a vantagem de fornecer novos modos de ação contra insetos, reduzir riscos de intoxicação humana e de outros seres vivos não alvos, reduzir a possibilidade de resistência adquirida, além de proteção ambiental por gerar menos resíduos (COPPING, MENN, 2000; ISMAN, 2006).

Em vista disso, objetivou-se com este trabalho caracterizar quimicamente os óleos essenciais do *Croton argyrophyllus* Kunth (velame falso) e do *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle (citronela) e avaliar o potencial de repelência dos mesmos contra o mosquito *Aedes aegypti* L.

CAPÍTULO I

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Caatinga

A caatinga é o único bioma restrito ao território brasileiro; ele abrange 9,92% do território nacional, ocupando uma área de 844.453 km² e conta com aproximadamente 27 milhões de pessoas vivendo na região (ARAÚJO et al., 2005). Ocupa quase todo o Nordeste do país, com pequenas partes no norte do estado de Minas Gerais. Apresenta características de clima semiárido, com temperaturas médias anuais compreendidas entre 27 e 29°C e precipitações anuais entre 300 e 900 mm, com distribuição irregular, possuindo meses com 125 mm de chuva e meses com apenas 30 mm, distribuídas da seguinte maneira, estação chuvosa restrita a um período de 3-4 meses (durante o verão e outono), seguida de uma estação de seca prolongada de 8 a 9 meses (entre inverno e primavera), (PAGOTTO et al. 2015; OLIVEIRA et al., 2017; CPTEC/INPE, 2018).

A flora e a fauna da Caatinga são adaptadas às condições específicas do ambiente. Em que suas características ecofisiológicas influenciam a fitofisionomia da vegetação, o que faz deste bioma um *Hot spot* para conservação da biodiversidade, devido à alta taxa de endemismo (LEAL et al., 2003; FAHN, CUTLER, 1992; SNYDER, TARTOWSKI, 2006).

A Caatinga tem características heterogêneas e um habitat ocupado por espécies resistentes. Dentre as principais espécies estão as da família Euphorbiaceae, tendo o gênero *Croton* como o predominante dessa família, por ser o segundo maior e mais diverso, com cerca de 1.200 espécies. No Brasil ocorrem cerca de 316 espécies e 6 variedades, sendo 252 endêmicas (CORDEIRO et al., 2015).

As plantas encontradas nesse ecossistema podem produzir classes variadas de metabólitos secundários e apresentam mudanças morfológicas bem particulares, que podem ser interpretadas como adaptações ao ambiente semiárido da caatinga, como, por exemplo, as características do marmeleiro (*Croton blanchetianus*) e do velame (*Croton heliotropiifolius*), duas espécies comuns desta região (BARROS, SOARES, 2013).

2.2 O gênero *Croton*

2.2.1 Distribuição geográfica

O gênero *Croton*, um dos mais diversos da família Euphorbiaceae, pertence à subfamília Crotonoideae. Possui 1.200 espécies difundidas em regiões tropicais e subtropicais (BERRY et al., 2005). No Brasil, ocorrem mais de 300 das espécies desse gênero, muitas das quais com propriedades químicas e ou farmacológicas conhecidas (CRUZ et al., 2007; ZAPPI et al., 2015). No bioma Caatinga foram catalogadas 68 espécies (CARNEIRO-TORRES, 2009), sendo o *Croton argyrophyllus* Kunth, conhecido popularmente como marmeleiro ou velame falso, umas das espécies mais abundantes (GARIGLIO et al., 2010).

Muitas espécies do gênero *Croton* encontradas na Caatinga têm potencial antifúngico, antimicrobiano, antioxidante e inseticida comprovados. Esses atributos se devem aos compostos bioativos, produtos do metabolismo secundário das plantas, pertencentes a várias classes químicas. Dentre os principais compostos, podem-se citar os terpenoides, fenilpropanoides, flavonoides, alcaloides e tocoferóis, muitos dos quais possuem interesse farmacológico de alto valor econômico (MIRANDA et al., 2019; FONTENELLE et al., 2008; SILVA et al., 2011; AMARAL et al., 2018; COSTA et al., 2017; DE MOURA SILVA et al., 2018; DA CRUZ, 2016).

O *Croton argyrophyllus* Kunth é uma espécie arbustiva, encontrada em países da América do Sul, como Brasil (SILVA et al., 2010), bastante distribuído na caatinga, Colômbia, Bolívia e Venezuela (GBIF, 2018) (Figura 2).



Figura 2. Distribuição geográfica do *Croton argyrophyllus* Kunth na América do Sul

Fonte: GBIF- Global Biodiversity Information Facility (2018)

No Brasil, o *Croton argyrophyllus* está distribuído entre os estados do nordeste e norte (Roraima e Rondônia), conforme dados do Sistema de Informação sobre a Biodiversidade Brasileira (SiBBr, 2018) (Figura 3).



Figura 3. Distribuição geográfica do *Croton argyrophyllus* no Brasil

Fonte: SiBBr, 2018

2.2.2 Morfologia do *Croton argyrophyllus* Kunth

O gênero *Croton* apresenta uma taxonomia complexa, devido ao grande número de espécies, sua vasta distribuição geográfica e diversidade morfológica. Por isso, para a distinção da espécie, é necessário além das características morfológicas, utilizar as características anatômicas dos órgãos reprodutivos (METCALFE, CHALK, 1983). Portanto, se faz necessário uma identificação mais criteriosa e especializada de cada espécie estudada.

A espécie *Croton argyrophyllus* Kunth é um arbusto com altura entre 1,6 a 5 metros (Figura 4) e possui dispersão autocórica (CAMPOS, 2018).



Figura 4. Espécie de *Croton argyrophyllus* Kunth no seu habitat natural

Fonte: Cruz et al. (2015)

As folhas de *Croton argyrophyllus* Kunth possuem a face abaxial com coloração prateada, dada pelo adensamento dos tricomas lepidotos. Esta espécie pode ser facilmente confundida com o *Croton tricolor*, diferenciando-se, principalmente, pelos tricomas uniformemente prateados, disco das flores pistiladas cupuliforme, lepidoto em ambas as flores e sementes com testa lisa (SILVA et al., 2010).

2.2.3 Atividade farmacológica de *Croton argyrophyllus* Kunth

A utilização de plantas para a prevenção de doenças é uma das mais antigas práticas da medicina humana (PASA, ÁVILA, 2010). Este conhecimento passado de geração em geração pode trazer informações importantes, auxiliando pesquisadores na escolha de espécies para seus estudos botânicos, farmacológicos e fitoquímicos (MACIEL et al., 2002), sendo algumas espécies do gênero *Croton* muito utilizadas na medicina popular na África, Ásia e América do Sul, como tranquilizantes, inseticidas, vermífugos e analgésicos (BARRERA et al., 2016).

Na caatinga, existe uma variedade muito grande de plantas utilizadas pelas comunidades tradicionais para o tratamento de diversas patologias. Estudos mais aprofundados tanto fitoquímicos quanto farmacológicos, são necessários para isolar, elucidar a estrutura dos componentes e determinar as propriedades biológicas, bem como seus benefícios para os seres vivos. Neste contexto, o *Croton argyrophyllus* é uma das espécies em potencial para tal finalidade (DE ALBUQUERQUE, 2007). Esta espécie apresenta propriedades medicinais comprovadas, como anti-inflamatória, anti-úlceras gástricas, antidiabetes, antidiarréico, antireumático, cicatrizante e anticarcinogênica (COMPAGNONE et al., 2010; SALATINO et al., 2007; AMARAL et al., 2018).

Dentre as propriedades dos óleos essenciais de *Croton argyrophyllus*, estudos reportam seu efeito na redução de edema induzido por carragenina 3 a 4 h após sua administração, resultados similares ao da dexametasona usada como controle, comprovando assim sua ação anti-inflamatória, pois o mesmo inibiu a liberação do radical óxido nítrico relacionando o efeito anti-inflamatório com sua atividade antioxidante (RAMOS et al., 2013). Além disso, o óleo essencial desta espécie possui a capacidade de inibir a bomba de prótons em camundongos, evidenciando uma atividade gastropotetora, contrário da maioria dos anti-inflamatórios não esteroidais (AMORIM, 2017). Outras propriedades biológicas da espécie são a atividade antimicrobiana em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, bem como seu

potencial antioxidante também já foram reportados, sendo os compostos fenólicos e terpenóides, tais como os flavonoides totais, os principais responsáveis por essa atividade (DA SILVA BRITO et al., 2018).

2.2.4 Atividade inseticida e repelente do gênero *Croton*

Assim como as propriedades terapêuticas, os produtos naturais de origem vegetal têm demonstrado potencial na elaboração de bioprodutos alternativos de uso agrícola, a exemplo dos óleos essenciais para fabricação de inseticidas naturais (COSTA, COSTA, 2009). Essa é uma alternativa para o controle de insetos de interesse tanto na medicina popular quanto para a agricultura. O reconhecimento de seu uso, se deu após observação de que os inseticidas sintéticos além de contaminarem o ambiente, estavam eliminando os inimigos naturais das lavouras e estavam desenvolvendo resistência aos insetos que acometiam prejuízo econômico. Esse fato levou aos fabricantes de defensivos agrícolas a aumentarem a concentração da fórmula, tornando os inseticidas comerciais cada vez mais tóxicos para os seres humanos com consequente contaminação do ecossistema (KIM et al., 2003; AGUIAR-MENEZES, 2005).

Exemplo de inseticida prejudicial à saúde humana está o diclorodifeniltricloroetano (DDT). Este foi o primeiro inseticida comercial de uso amplo. Após sua descoberta a resistência dos insetos à fórmula, começou a atingir várias populações de insetos (BROWN, 1986). Atualmente existe mais de 100 espécies de mosquitos resistentes a um ou mais inseticidas, em que mais de 50 destes são anofelinos (HEMINGWAY, RANSON, 2000). No Brasil já foram relatados casos de resistência dos mosquitos *Aedes aegypti* aos organofosforados, piretróides, carbamatos e organoclorados em diversos estados (PAEPORN et al., 2005).

Por isso, os óleos essenciais vêm se destacando nas pesquisas como alternativa aos inseticidas sintéticos devido à sua biodegradabilidade e por apresentar baixo impacto ambiental, além de possuir maior seletividade. Dessa forma, os óleos essenciais têm contribuído com o manejo de pragas e vetores (SIMAS, 2004; DE ALBUQUERQUE, 2007; TAPP et al., 2009; OLIVEIRA, 2014). Como exemplo de sua aplicabilidade, está a atividade biocida dos óleos essenciais extraídos das folhas de *Croton heliotropiifolius* Kunth e *Croton pulegiodorus* Baill os quais eliminaram 100% das larvas do mosquito *Aedes aegypti* (DÓRIA et al, 2010). Resultados semelhantes foram observados para os óleos essenciais extraídos das espécies de *Croton zehntneri* Pax e Hoffm, *Croton nepetaefolius* Baill e *Croton*

argyrophyloides Mull Arg e *Croton argyrophyllus* Kunth, respectivamente (LIMA et al., 2006; OLIVEIRA, 2014; CRUZ et al., 2017). De igual teor, os extratos etanólico de *Croton linearifolius* Müll Arg., também alcançaram 99,17% de letalidade contra as larvas de *Aedes aegypti* (CUNHA et al., 2014).

2.3 *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle (Citronela)

O gênero *Cymbopogon* possui aproximadamente 140 espécies, das quais se destacam duas principais espécies, por sua importância comercial na área farmacêutica e cosmética: *C. winterianus* (citronela de Java) e *C. nardus* (citronela do Ceilão) (SHASANY et al., 2000; SAHOO, DEBATA, 1995). Embora sejam morfologicamente diferentes, estas duas espécies vêm trazendo confusão, principalmente no seu uso popular (AZAMBUJA, 2011). A citronela de Java (*Cymbopogon winterianus*) possui folhas menores e mais largas em comparação com a citronela do Ceilão (*C. nardus*), esta possui folhas planas, inteiras, estreitas, longas, de 0,5 a 1 m de altura, possui margens ásperas, ápice agudo, cor verde, com aspecto curvo e aromática, com odor característico de eucalipto (CASTRO, RAMOS, 2003).

Conhecido como capim Citronela, o *C. nardus* é sensível à baixas temperaturas, sendo bem adaptado ao clima tropical e subtropical.. É uma planta que exige muita água para seu crescimento, porém, por se tratar de uma espécie aromática, o excesso de umidade por irrigação ou precipitação, reduz o teor do óleo essencial produzido pela planta (CASTRO, CHEMALE, 1995).

Dentre as atividades biológicas do *C. nardus*, destacam-se a atividade antimicrobiana (KOBAYASHI et al., 2009; DUARTE et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2011). Os monoterpenos presentes no óleo, agem diretamente na membrana celular das bactérias, que por afinidade lipofílica se ligam à membrana citoplasmática comprometendo suas funções como barreira seletiva e local de ação enzimática e geração de energia (SIKKEMA et al., 1995). Além dessa ação biológica nas células, o gênero *Cymbopogon*, atua também como repelente, sendo este o mais usado com esta finalidade em todo mundo (TRONGTOKIT et al., 2005). Dois trabalhos de revisão sobre o tema destacaram a importância deste tipo de pesquisa para a busca de repelentes biológicos e citaram espécies *Cymbopogon nardus* Rendle, *Cymbopogon citratus* Stapf e *Cymbopogon winterianus* Jowitt, como as principais espécies da família *Poaceae* utilizadas como repelentes (NERIO et al., 2010; DE SOUZA et al., 2019). Em que a primeira espécie, *C. nardus*, objeto do presente estudo, apresenta destaque em pesquisas de atividade

larvicida contra larvas dos mosquitos adultos do vetor *Aedes aegypti* (CASTRO, RAMOS et al., 2003; TRONGTOKIT et al., 2005; PHASOMKUSOLSIL, SOONWERA, 2011; SRITABUTRA, SOONWERA, 2013).

2.4 Características dos Óleos essenciais

Os óleos essenciais são produtos do metabolismo secundário dos vegetais que conferem vantagens adaptativas contra fatores ambientais adversos e proteção contra danos químico e mecânico. Atuando ecologicamente na fotoproteção, proteção contra fitopatógenos e injúria por herbivoria. Não obstante sua composição química complexa, também possui efeito alelopático no controle de espécies competidoras bem como na atração de agentes polinizadores e dispersores (VIEGAS-JUNIOR et al., 2006; GARCIA, CARRIL, 2011; DELORY et al., 2016). Entretanto, os fatores edáficos e climáticos, associados aos fatores ambientais, influenciam na biossíntese dos constituintes fitoquímicos. Em quem sua produção e rota metabólica pode ser modificada em resposta adaptativa de acordo o estímulo recebido, podendo este ser de natureza, química (alelopátia), mecânica (herbivoria) ou climática (estresse ambiental), provocados naturalmente ou por manipulação agrícola como mecanização agrícola, defensivos químico bem como cortes ou arranquio (ROCKENBACH et al., 2018).

A composição dos óleos também está relacionado com o órgão da planta onde o óleo é produzido e armazenado. folhas, flores, caule, raiz, sementes, cascas), nestes órgãos são encontradas as células secretoras que podem ser classificadas em: tricomas, canais e cavidades secretoras (TAIZ; ZEIGER, 2013). Os tricomas podem ser constituídos por uma única célula ou multicelulares, caracterizando assim em vários tipos como os tricomas tectores, os tricomas radiculares, os tricomas glandulares e os tricomas mistos (TAIZ et al., 2017; KERBAUY, 2012). A parte da planta onde concentra os tricomas depende da espécie. Em *Cymbopogon nardus* e *Croton argyrophyllus*, concentra-se nas folhas com tamanhos variados na forma de bolsa e estrela, respectivamente na face abaxial, (BARBOSA, 2007; GOMES, 2010) Portanto identificar em qual órgãos da planta é produzido e armazenado os óleos essenciais é importante para o processo de extração adequado (APEZZATO-DA-GLÓRIA, CARMELLO-GUERREIRO et al., 2006; TAIZ et al., 2017).

Existe vários métodos de extração de óleos essenciais em que cada técnica tem a sua especificidade. Dentre essas estão a hidrodestilação, destilação por arraste a vapor, cujas técnicas são aplicadas em espécies em que o óleo é armazenado nas folhas. Sendo o arraste a vapor, o método recomendado pela Farmacopeia Brasileira por não ter contato com a água, assim evitando a oxidação e perda de alguns componentes químicos além de possuir baixo custo (BRASIL, 2012).

A extração por solventes orgânicos é outra técnica que pode ser aplicada para a extração de óleos da parte aérea, porém, embora garante a extração de todos os compostos químicos e mantém a integridade dos mesmos, tem a desvantagem de utilizar substâncias tóxicas como o hexano, benzeno, tolueno e éter de petróleo, os quais são altamente nocivos para o homem. Diferente dessa, o fluido supercrítico é uma técnica que utiliza o CO₂ na dissolução dos compostos químicos, sendo a mais tecnológica entre as técnicas, garantindo separação do óleo do gás carbônico sem que ocorra perda de compostos e alterações químicas quer seja por hidrólises, esterificação, caramelização ou alterações térmicas.

Já a enfleuragem é utilizada para extração de óleos de matéria prima delicada como as pétalas de flores. Trata-se da prensagem dessas em contato com uma gordura inodora que, após o processo de saturação da gordura com o óleo das mesmas, esta é filtrada, posteriormente o concentrado aromático é diluído em álcool e destilado, obtendo então o óleo essencial com alto teor de pureza. Ao passo que a prensagem a frio é utilizada para extração de óleos essenciais de pericarpo de citros devido aos seus óleos serem ricos de compostos nutracêuticos altamente termolábeis (ANVISA, 2010; PINHEIRO, 2003; SILVEIRA et al., 2012).

2.5 Características e controle do mosquito *Aedes aegypti*

O *Aedes aegypti* tem características bem peculiares, tamanho que pode variar de 0,4 a 0,7 cm de comprimento, cor negra e com listas brancas no dorso, pernas e cabeça. Possui dimorfismo sexual, visto que o macho é caracterizado pela antena plumosa e a fêmea por uma antena pilosa. Possui três pares de patas e no abdômen contém o órgão excretor e digestivo (CONSOLI, OLIVEIRA, 1998). O abdômen do macho é mais fino que os das fêmeas, pois esta necessita de um abdômen maior para armazenar os ovos até ficarem aptos para serem postos (Figura 5).

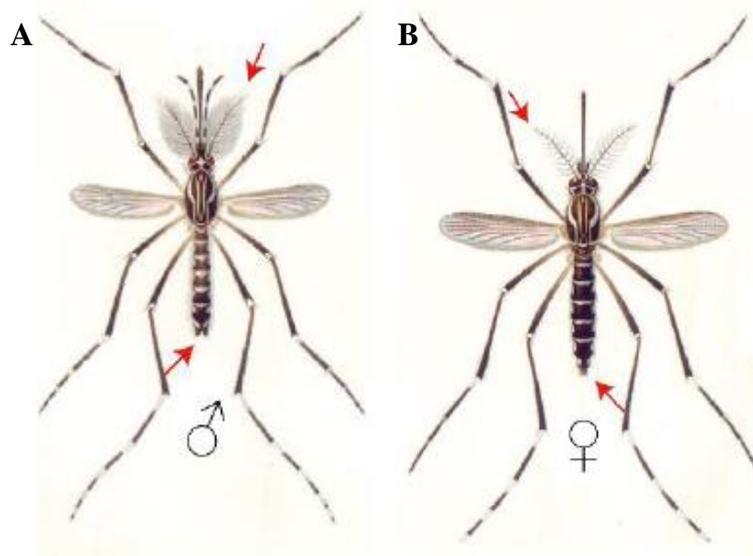


Figura 5. Imagem do mosquito *A. aegypti*. A) macho; B) fêmea não alimentada;
 Fonte: Goeldi (1905) apud Sanjad (2003)

Apresentam quatro fases em seu desenvolvimento: de ovo ou embrionária, a fase larval, a de pupa e a fase adulta, chamadas de holometabólicas ou metabolismo completo; as fases de larva e pupa são aquáticas; a fase adulta é a do inseto voador (ALMEIDA, 2011).

As fêmeas realizam o repasto sanguíneo, responsável pelo desenvolvimento dos ovos, que são depositados em ambientes úmidos e próximos a lâminas d'água de algum recipiente ou água limpa e parada. Cada fêmea pode depositar de 150 a 200 ovos (MARQUES et al, 2013; VARGAS et al., 2014). É importante destacar que, caso as condições de umidade não sejam adequadas, os ovos podem adquirir resistência ao ressecamento muito rápido. Em aproximadamente 15 horas após a postura, eles já são capazes de resistir a longos períodos em condições secas, ficando de um ano até 450 dias sem água (FIOCRUZ, 2016; COSTA, 2001).

Em condições adequadas, os ovos podem eclodir em três dias, iniciando a fase larval, que dura em torno de sete dias, possuindo quatro estágios evolutivos. Nesta fase, a larva precisa de condições ótimas com alimento e temperatura entre 25° a 29°C, para uma maturação ideal e se transformar em pupa (ALMEIDA, 2011; BESERRA et al., 2009).

A pupa é essencialmente aquática, possui um par de tubos respiratórios ou "trompetas", que atravessam a água e permitem a respiração; não se alimenta e se mantém na superfície da água flutuando até a completa metamorfose, que dura de dois a três dias (BESERRA et al., 2010).

A utilização de predadores também mostra um potencial para diminuir a população destes mosquitos, a exemplo da planta chamada de Crotalária, que atrai a libélula predadora natural de insetos como o *Aedes aegypti* (COSTA, SANTOS, OLDRINI, 2012).

Outra forma de combate, é a utilização de agentes biológicos, como a bactéria *Bacillus thuringiensis israelenses*, eficaz no controle das larvas do mosquito (AHMED, 2019). Os fungos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*, também são exemplo de medidas profiláticas. Esses liberam endotoxinas e, quando ingeridas pelo mosquito, provocam toxicidade ao aparelho digestório e respiratório da larva (DENG, 2019).

Embora existe essas medidas alternativas, o controle químico ainda é uma das técnicas mais utilizadas para eliminar o vetor em todas as fases de vida. Inseticida a base de organoclorados, foi a principal forma de combate do vetor até o final dos anos 70. Sendo o DDT o mais utilizado e, posteriormente proibido devido à alta intoxicação animal e humana (ALDRID, 1979). Porém mesmo proibidos na maioria dos países do mundo, estes compostos ainda são utilizados no continente africano para o combate à malária (WHO, 2018).

Os organofosforados, principalmente o temefós, são os inseticidas mais utilizado na fase larval e os piretróides, derivados na estrutura das piretrinas, para a fase adulta (CARNEIRO, 2006). Estes também apresentam problemas de resistência múltiplas do *Aedes aegypti* à fórmula (KOOU, 2014; OPAS/OMS, 2016).

A ação repelente como uma forma de controle, tendo como exemplos roupas e telas impregnadas com inseticidas, tem sido utilizado por gestantes e por crianças. Essa medida apresenta a vantagem de fácil execução e ainda poder combinar com outras estratégias (ZARA, 2016). O conjunto das técnicas no combate e ou controle do vetor tem apresentado deficiácia pois, além de diminuir a utilização de agentes tóxicos, também melhora a qualidade de vida das pessoas, sem provocar riscos para a saúde de outros organismos no meio ambiente (BRASIL, 2009; WHO, 2009). Contudo, o uso de técnicas em conjunto para combater a ovoposição, o desenvolvimento na fase aquática e a fase adulta dos mosquitos, tem apresentado eficácia sendo ainda a melhor estratégia (ZHANG, 2016).

Fora do combate ao mosquito, outra linha de pesquisa promissora, mas para o controle da doença dengue ou zika, seria as vacinas. Porém algumas destas vacinas ainda estão em fase de testes. Onde a única vacina comercialmente distribuída no Brasil, é tetravalente, recombinante, denominada de CYD-TDV (BRASIL, 2016). Esta ainda não apresenta eficácias garantidas de imunidade (DA SILVEIRA, 2019; DIAMOND, 2019). Não obstante outras vacinas estão sob investigação pelo Instituto Butantã em parceria com a National Institutes of Health (EUA). Em que experiências com a CYD-TDV tem aprimorado em

estudo dessa última, a qual aspira resultado promissor podendo alcançar eficácia de até 90% de proteção ao humano contra o vírus da dengue (DA LUZ et al., 2019).

2.6 Características e propriedades dos repelentes

O desenvolvimento de repelentes evoluiu com a história do homem; foram do simples hábito de passar folhas na pele, fazer fumaça para espantar os insetos, ao uso de óleos como de eucaliptos ou de menta, que eram passados diretamente no corpo, até chegar a produtos cosméticos, além do uso de velas com odores (KATZ et al., 2008). As pesquisas revelam que, para a busca por repelentes naturais menos tóxicos e mais eficazes, será necessário identificar e isolar sua substância ativa com maior poder de repelência, como, por exemplo, o *p*-mentano-3,8-diol (PMD), extraído do óleo de eucalipto (LEAL, 2014). Portanto, a caracterização dos óleos essenciais utilizados por diversos pesquisadores (OLIVEIRA, 2014; RAMOS et al., 2013; RAMOS, 2016) pode trazer pistas de quais são as substâncias presentes para um futuro isolamento e realização de testes de repelência.

Neste sentido, o desenvolvimento de inseticidas e repelentes oriundos de plantas apresenta-se como uma proposta promissora (SILVA et al., 2014). Muitos extratos de plantas e/ou óleos essenciais têm sido testados para avaliar sua atividade repelente contra várias espécies de insetos, como os óleos essenciais das espécies: *Trichilia pallida* Swartz (baga de morcego), *Carapa guianensis* Aublet (andiroba), *Copaifera* sp. (óleo de copaíba), *Cymbopogon nardus* L. Rendle (citronela), *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf (capim-limão), *Ruta graveolens* Linnaeus (arruda), *Eucalyptus globulus* Labill (eucalipto), *Chenopodium ambrosioides* L. (erva-de-Santa-Maria), *Ocimum basilicum* L. (manjeriço), *Rosmarinus officinalis* L. (alecrim-de-cheiro), *Mentha pulegium* L. (poejo) e *Carapa guianensis* Aubl. (andiroba) (TISSOT, 2008; OLIVEIRA, 2008a; OLIVEIRA, 2008b; BUENO, 2010).

Entender a dinâmica e os mecanismos que atraem o mosquito até o local da picada é muito importante no estudo de repelentes. A descoberta dos alvos receptores no sistema olfativo de mosquitos é um grande desafio para a ciência, mas podem proporcionar a busca por repelentes mais eficazes, duradouros e seguros (RAY, 2015).

Para um repelente ser considerado efetivo é preciso que ele possua algumas características (ISLAM et al., 2017a):

- a) Impedir o pouso por um período de tempo (repelente espacial);
- b) Fazer com que o mosquito se oriente para longe após aterrisagem (irritante de contato);

- c) Provocar anti-alimentação, supressão e anorexia (Dissuasão);
- d) Bloquear atração para humanos (Odor maskers - também chamado de inibição de atração);
- e) Visual maskers que perturbam a indicação visual do mosquito, prevenindo a localização do hospedeiro (ISLAM et al., 2017a).

Dentre as características supracitadas, infelizmente ainda não existe um repelente que atenda todos estes requisitos (AMBROZIN et al., 2006). Porém, pesquisas recentes têm apresentado resultados promissores, salientando que a busca por repelentes naturais pode ser uma alternativa para o controle e proteção humana contra mosquitos sem prejuízo ao meio ambiente (DE SOUZA et al., 2019).

2.6.1 Tipos de repelentes

No Brasil, as opções de repelentes comerciais são poucas e os mais eficazes ou com comprovação de eficácia e com licença aceita pela ANVISA são os sintéticos, sendo que o N,N-Dietil-meta-Toluamida – DEET, ainda é o repelente mais eficaz e sua duração depende da concentração no produto (STEFANI, 2009) (Tabela 1), porém com restrição de uso relacionado com toxicidade na pele, ou seja, não são permitidos para crianças abaixo de 2 anos e, em concentrações acima de 10%, somente para crianças a partir de 12 anos. O mesmo autor considerou ainda os níveis de evidência já descritos para os repelentes e suas orientações descritas pelo Canadense Committee to Advise on Tropical Medicine and Travel (CATMAT, 2005).

O próprio Comitê (CATMAT, 2005) não recomenda o uso de repelentes naturais não registrados nos órgãos competentes para proteger contra picadas de insetos, ou seja, não recomendam o uso de repelentes sem evidências científicas comprovadas. Em vários países os inseticidas e repelentes devem ser revisados quanto à eficácia e segurança pela Agência Reguladora, levando em conta, também, os estudos randomizados que indicam se o seu uso reduz a incidência de doenças.

No Brasil os repelentes são classificados no grupo de Grau 2, que são produtos sujeitos a autorização para comercialização, a partir da concessão do registro publicado em Diário Oficial da União. Conforme RDC N° 07 (2015), a definição de produto grau 2 é:

Produtos Grau 2: são produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes cuja formulação cumpre com a definição adotada no item I do Anexo I desta Resolução e que possuem indicações específicas, cujas características exigem comprovação de

segurança e/ou eficácia, bem como informações e cuidados, modo e restrições de uso (Brasil, 2015).

Tabela 1. Concentrações e tempos de ação estimados de repelentes disponíveis comercialmente no Brasil

Princípio ativo	Produto (fabricante) e formas de apresentação	Concentração (%)*	Idade permitida*	Tempo de ação estimado*
DEET	Autan (Johnson Ceras) aerossol, loção, <i>spray</i>	6-9	>2 anos	Até 2 horas
	OFF (Johnson Ceras) loção, <i>spray</i>	6-9	>2 anos	Até 2 horas
	OFF kids (Johnson Ceras) loção	6-9	>2 anos	Até 2 horas
	OFF (Johnson Ceras) aerossol	14	>12 anos	Até 6 horas
	Super Repelex (Reckitt Benckis) <i>spray</i> , loção	14,5	>12 anos	Até 6 horas
	aerossol	11,05		
	Super Repelex kids gel (Reckitt Benckis)	7,34	>2 anos	Até 4 horas
Icaridina	Exopis adulto (Osler) gel, <i>spray</i>	50	> 12 anos	Até 5 horas
	Exopis Extreme (Osler) <i>spray</i>	25	>10 anos	Até 10 horas
	Exopis infantil (Osler) <i>spray</i>	25	> 2 anos	Até 10 horas
IR3535	Loção antimosquito (Johnson & Johnson)	**	> 6 meses	Até 4 horas
Óleo de citronela	Citromim <i>spray</i> (Weleda)	1,2	>2 anos	Até 2 horas

Fonte: STEFANI et al, 2009.

Notas: *informações fornecidas pelo fabricante; **informação não fornecida pela empresa fabricante.

Além disso, a Resolução de 19 de abril de 2013, que regulamenta o registro de repelentes de insetos, preconiza que alguns estudos sejam feitos no produto acabado: irritação primária e acumulativa, sensibilização cutânea e foto sensibilização. Seu artigo nº 4 orienta que estes estudos de repelência sejam realizados de acordo as diretrizes internacionais:

Para comprovação de eficácia de produtos cosméticos repelentes de insetos a empresa deverá apresentar, no ato da solicitação do registro, estudos de eficácia do produto, efetuados de acordo com as diretrizes da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos da América (EPA), da Organização Mundial de Saúde (OMS) ou outras metodologias validadas e reconhecidas internacionalmente. (BRASIL, 2013).

Portanto, para a aprovação e registro de repelentes, os testes seguem as normas da nota técnica Nº 01 de 2018 (ANVISA, 2018) e devem ser feitos em duas espécies de mosquitos antropofílicos, sendo uma dessas necessariamente *Aedes aegypti* e a outra *Culex* (preferencialmente *Culex quinquefasciatus*) ou *Anopheles* (preferencialmente *An. stephensi*, *An. gambiae* ou *An. albimanus*). Os repelentes aprovados terão que ter um tempo mínimo de 30 minutos de repelência frente ao *Aedes aegypti*, e ainda está condicionada à compatibilidade da frequência de reaplicação com a margem de segurança do ativo (STEFANI et al, 2009). A empresa deve indicar qual protocolo que seguiu, se foi o da EPA (Environmental Protection

Agency) ou o da OMS (Organização Mundial da Saúde); se os testes forem realizados em gaiolas, devem seguir as seguintes especificações mínimas: tamanho da gaiola de 35 cm x 35 cm x 35 cm (todos os lados devem ser maiores do que 35 cm); densidade de 1 mosquito por 1,160 cm³ (200 mosquitos por gaiola) para EPA e cerca de 200 a 250 mosquitos por gaiola para OMS (EPA, 2010; WHO, 2009).

No Brasil, as substâncias aprovadas como repelentes e registradas na ANVISA correspondem àquelas aprovadas nos Estados Unidos pela United States Environmental Protection Agency (EPA), são: N,N-Dietil-meta-Toluamida ou N,N-Dietil-3-Metilbenzamida (DEET), Carboxilato de hidroxietilisobutylpiperidina (Icaridin ou Picaridin) e Etilbutilacetilaminopropionato (EBAAP ou IR 3535), além de óleos essenciais, como Citronela. Nos Estados Unidos existem: Catnip oil; p-mentano-3,8-diol e 2-undecanona ou Metil-nonilcetone. Ainda existem no Brasil os repelentes de ambientes, classificados pela ANVISA como saneantes. Para estes produtos são usados diferentes substâncias sob a forma de espirais, líquidos e pastilhas utilizadas, por exemplo, em aparelhos elétricos, a maioria são piretroides. Para que esses sejam aprovados e comercializados, sua eficácia deve ser comprovada frente aos mosquitos da espécie *Aedes aegypti* (ANVISA, 2015).

2.6.2 Testes de repelência espacial

Os dois guias da Organização Mundial de Saúde, “As diretrizes para a eficácia de repelentes contra mosquitos na pele do homem” e “Diretrizes para testes de eficácia de repelentes espaciais” (WHO, 2009; WHO, 2013), têm como objetivos harmonizar testes realizados em diferentes laboratórios ou instituições, no intuito de gerar dados comparáveis entre si, para facilitar o registro destes tipos de produtos repelentes ou inseticidas, sempre lembrando que cada país tem suas legislações específicas para registrar e liberar estes produtos ao consumidor. O guia para o teste na pele em humanos orienta que testes preliminares de segurança e toxicidade devem ser avaliados antes dos testes aplicados na pele (WHO, 2013).

Conforme preconizado pelo WHO (2013), o termo repelência espacial estuda uma série de comportamentos dos mosquitos, frente a um estímulo químico ou substância química, que de alguma forma reduz o contato entre o vetor e o ser humano, causando assim repelência. O próprio documento citado preconiza que testes em laboratórios podem ser modificados ou adaptados à realidade de cada laboratório, mas sempre seguindo as normas

básicas de segurança e princípios de boas práticas laboratoriais para testes biológicos com inseticidas.

Normas que devem ser obedecidas (WHO, 2013):

- Criação de mosquitos padronizados, para garantir representatividade das amostras (boas condições ambientais);
- Observar a segurança da substância testada, principalmente se volátil, com teste de toxicidade por inalação ou ficar atento a efeitos adversos ou indesejáveis registrados durante o teste;
- Todo pessoal envolvido nos testes deve ser treinados sobre normas de segurança e procedimentos operacionais padrão adotados. cujos treinamentos deverão ser registrados;
- Realizar os experimentos dentro das normas éticas nacionais aplicáveis.

O principal objetivo de estudos de ingredientes ativos em testes de repelência espacial é determinar sua principal ação contra o mosquito estudado, medindo o movimento de afastamento do mosquito por estímulo químico, interferência na detecção do hospedeiro e ou resposta de alimentação, incluindo ainda duração da proteção em condições padrão bem controladas (WHO, 2013).

O modelo esquemático do dispositivo sugerido pela WHO (2013) está descrito na figura 7.

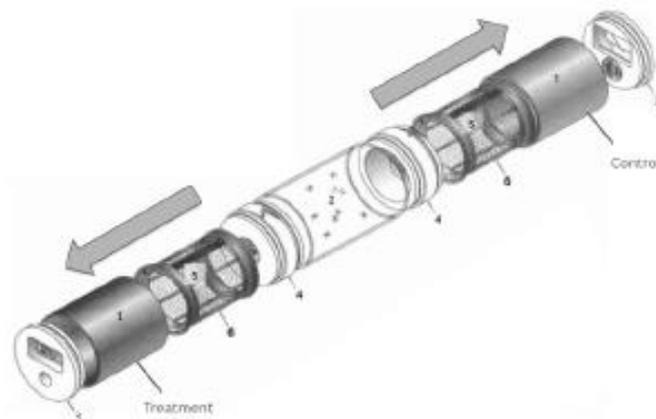


Figura 7. Modelo esquemático do dispositivo usado no ensaio de repelência espacial

Fonte: WHO (2013)

Os componentes são: 1- cilindro de tratamento (metal); 2 - cilindro central; 3 - tampa final; 4 - funil com válvulas borboleta; 5 - carretel de metal; 6 - compartimento para colocar o filtro de papel impregnado com a amostra.

CAPÍTULO II

Chemical composition and repellent action of the essential oils of croton and citronella ceylon against dengue mosquitoes

Heurissongley Sousa Teixeira¹

Simone Andrade Gualberto²

Débora Cardoso da Silva³

Thaimara Gomes Costa⁴

Daniel Lobo Sousa⁵

Messulan Rodrigues Meira^{6*}

¹ Master's degree student in Environmental Sciences. State University of Southwest Bahia,
Itapetinga Campus. BR 415, Km 04, S/N, CEP: 45.700-000, Itapetinga – BA

<https://orcid.org/0000-0003-2579-767x>

² Professor of the Postgraduate Program in Environmental Sciences, Coordinator of the
Natural Products Research Laboratory – LAPRON. Praça Primavera, 40, Bairro: Primavera,
CEP: 45.700-000, Itapetinga – BA

<http://orcid.org/0000-0002-1753-002X>

³ Professor of the Postgraduate Program in Environmental Sciences, Coordinator of the
Natural Insecticide Research Laboratory – LAPIN. State University of Southwest Bahia,
Itapetinga Campus Praça Primavera, 40, Bairro: Primavera, CEP: 45.700-000, Itapetinga –

BA

<https://orcid.org/0000-0001-9311-2084>

⁴ Master's degree student in Environmental Sciences. State University of Southwest Bahia,
Itapetinga Campus. BR 415, Km 04, S/N, CEP: 45.700-000, Itapetinga – BA

<https://orcid.org/0000-0001-8581-5564>

⁵ Master's degree student in Environmental Sciences. State University of Southwest Bahia, Itapetinga Campus. BR 415, Km 04, S/N, CEP: 45.700-000, Itapetinga – BA
<https://orcid.org/0000-0001-7637-2642>

⁶ Post Doctorate in Environmental Sciences and collaborating researcher at the Research Laboratories in Natural Products and Natural Insecticides - LAPIN / LAPRON. State University of Southwest Bahia, Itapetinga Campus. BR 415, Km 04, S/N, CEP: 45.700-000, Itapetinga – BA
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2447-342X>

Keywords: *Aedes aegypti*, *Croton argyrophyllus*, volatile compounds, *Cymbopogon nardus*, spatial repellency

Croton and citronella oils as natural repellents

Biological Sciences

* Corresponding author:

State University of Southwest Bahia, Itapetinga Campus. BR 415, Km 04, S/N, CEP: 45.700-000, Itapetinga – BA

3 ABSTRACT

The objective was to characterize the chemical composition of the essential oils of *Croton argyrophyllus* Kunth. and *Cymbopogon nardus* L. Rendle. and evaluate their spatial repellency activities against *Aedes aegypti* Linn. The essential oils were hydrodistilled for 2 h and 30 min, submitted to gas chromatography coupled to the mass spectrometer and to the repellency test with concentrations of 1, 2, 4 and 10%. DEET was incorporated into the emulsion in the same concentrations as a positive control and the pure non-ionic emulsion as

a negative control. The repellency tests were obtained from 20 adult females, arranged in cylindrical chambers and glass slides containing the samples. Each trial had 10 repetitions lasting 10 min. The essential oils of croton showed a yield of 0.37% with 20 compounds, with E-karyophyllene, bicyclogermacrene, α -Pinene and spatulenol representing 57.38% of the chemical composition. The citronella oil yielded 1.07% with 27 compounds, in which the citronelal, geraniol and citronellol compounds represented 74% of its composition. The best dose of repellency response was 2%. Croton showed a repellency rate of 57% and Citronella presented one higher than 70%. The essential oils of these species have a repellent action against the *Aedes aegypti* mosquitoes.

4 INTRODUCTION

Aedes aegypti Linn. is a diptera of the Culicidae family, discovered in Egypt in the 13th century and widespread in the African and American continents. This species was introduced in Brazil at the end of the 19th century by the arrival of slave ships, triggering many diseases. Among these diseases are Dengue and Zika, caused by the viruses that bear their respective names and that belong to the Flaviridae family and Chikungunya, caused by a virus of the Togaviridae family (Lopes, Nozawa, Linhares 2014). These arboviruses, even though they are from different families, have similar initial symptoms, a fact that makes clinical diagnosis and treatment difficult (Rodriguez-Morales et al. 2015).

Several strategies have been used to combat the vector. Ranging from mechanical control, such as the elimination of potential breeding grounds for mosquitoes, as well as the introduction of larvophagous fish for biological control to the use of insecticides in chemical control. At the beginning of the epidemiological outbreak these prophylactic measures were

considered efficient to the point of eradicating the vector between 1958 and 1973, however, it was reintroduced in 1976 (Zara et al. 2016).

There are many products with repellent action against mosquitoes available on the market, including Picaridin or KBR 3023, IR 3535 and p-methane-3,8-diol (PMD). These are considered less toxic, but with reduced protective effects (Frances et al. 2004). However, in order to make them potent in combating the vector, many repellents had their concentrations increased. This strategy, although considered efficient against the mosquito, has shown damage to human health, such as skin and eye mucosa irritation, in addition to irreversible environmental damage (Patel et al. 2012, Gokulakrishnan et al. 2013, Gill & Garg 2014). Therefore, it is believed that the epidemiological scenario of diseases transmitted by the vector is due to the resistance developed by mosquito populations during prolonged contact with these substances.

Due to their lack of efficacy, as well as the toxicity of the products available on the market, much research on natural products has been encouraged (Deletre et al. 2019, Yang et al. 2019). Out of the various existing natural resources, vegetables have stood out and the aromatic species lead the studies developed by research centers aiming at the development of biodegradable alternative products of low toxicity (Simas et al. 2004, Tapp et al. 2009, De Albuquerque 2007). Among the aromatic species that stand out in the studies are *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle and *Croton argyrophyllus* Kunth.

Cymbopogon Nardus (L.) Rendle, known as Citronella Ceylon, is a plant from the Poaceae family, of herbaceous size varying from 0.5 to 1 m tall (Shasany et al. 2000, Sahoo & Debata 1995). It has rough leaves, acute apex, green color, from tropical and subtropical climates, being well adapted to different environments due to its phenotypic plasticity (Araújo et al. 2017). This plant is an essential oil producer, whose oil has antimicrobial properties. It is also widely used as an air freshener and as a repellent (Trongtokit et al. 2005, Duarte et al.

2007, Koba et al. 2009, Oliveira et al. 2011). In traditional medicine, it is also used as an insecticide, dewormer and painkiller. (Barrera et al. 2016).

The *Croton argyrophyllus* Kunth species, belonging to the Euphorbiaceae family, is native to Africa, Asia and South America and well adapted to Brazil. In its region of origin it is consumed in folk medicine as a tranquilizer, an insecticide, a dewormer and analgesic (Barrera et al. 2016). Some of its therapeutic properties are scientifically proven, such as anti-inflammatory, anti-ulcerogenic, anti-diabetic, anti-diarrheal, anti-rheumatic, with anti-carcinogenic activities, for the relief of gastritis, abdominal pain, headache and healing (Compagnone et al. 2010, Salatino et al. 2007, Amaral et al. 2018, Ribeiro et al. 2018). In addition to these properties, its leaves have also shown potential as a natural insecticide against *Aedes aegypti* larvae (De Albuquerque 2007, Costa & Costa 2009, Cunha et al. 2014, Dória et al. 2010, Simas 2004, Tapp et al. 2009).

In view of the biological activities presented by the essential oils of these two species, the objective with this study was to characterize the chemical composition of the essential oils of *Croton argyrophyllus* Kunth and *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle, as well as to evaluate their spatial repellency activities against *Aedes aegypti* L.

5 MATERIALS AND METHODS

5.1 Collection and identification of plant material

The leaves of *Croton argyrophyllus* Kunth were collected in August 2018 at the conservation unit National Forest Contendas do Sincorá - FLONA, located in the municipality of Contendas do Sincorá - Bahia, geographic coordinates latitude 13°55'15.9" S and longitude 041°06'53.9" W, in the morning, between 8 am and 9 am. The leaves of *Cymbopogon nardus*

(L.) Rendle were collected in the garden of UESB, campus of Itapetinga, under the geographical coordinates latitude 15 ° 15'23"S and longitude 40 ° 15'27" W in the same period. The croton exsiccate was identified by the specialist curator Daniela Santos Carneiro-Torres from the Herbarium of the Federal University of Feira de Santana - HUEFS, where it was deposited under the number HUEFS 4662. Both species also been registered in the National System for the Management of Genetic Heritage and Associated Traditional Knowledge - SisGen, under the registration number A8C3C76 and AD5FE57, respectively.

The plant material was sent to the UESB Natural Products Laboratory (LAPRON), where it was subjected to a drying process for 18 h in an air circulation oven at 40 ° C. Subsequently, 100 grams of the dry leaves of each species were subjected, in triplicate, to hydrodistillation with deionized water for 2 h and 30 min, using a modified Clevenger apparatus. After the extraction process, the essential oils were collected and the residual water was eliminated through the addition of anhydrous sodium sulfate (Na₂SO₄). The oil yield was calculated based on the dry biomass, according to the equation:

$$\text{content\%} = \frac{\text{oil mass (g)}}{\text{mass of leaf biomass (g)}} \times 100$$

The essential oils were stored in amber glass bottles and kept refrigerated at 4°C until the moment of chemical characterization.

The chemical characterization of essential oils was carried out at the Chemistry Department of the Federal Rural University of Rio de Janeiro (ICE/UFRRJ). The analyzes were submitted to Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry (CG/EM). The chromatograph used was an HP 5890 - Series II, using an HP-5 column from the brand Agilent, with 30 m x 0.25 mm internal diameter x 0.25 µm film thickness. The carrier gas used was helium, with 99.999% purity, with a flow rate of 1 mL.min⁻¹ and a pressure of 12 psi. The furnace heating schedule was from 60 to 260°C (3 ° C.min⁻¹), then 10°C.min⁻¹ to 290°C, with injector temperature at 220°C, interface at 310°C and ion source at 250°C (FID).

Sample solutions were prepared in dichloromethane and injected 1 μ L into the chromatograph with a flow rate (Split) of 1:30.

In order to make the calculations of the retention indexes of the compounds possible, under the same operational conditions, a series of hydrocarbons were injected (C₈ a C₂₀). The retention index for each compound that presented relative abundance $\geq 0.5\%$ was calculated with the chromatograms of the detected constituents, applying the logarithmic equation proposed by Kovats conforme modelo:

$$KI = 100n + 100 \left(\frac{\log t'_{R(i)} - \log t'_{R(n)}}{\log t'_{R(n+1)} - \log t'_{R(n)}} \right)$$

Where, KI = Kovats index; T'_{R (i)} = retention time of the analyte; T'_{R(n)}= lower chain hydrocarbon retention time; T'_{R(n + 1)} = is the number of carbons in the adjacent pattern most retained and n = number of carbon atoms in the pattern (Adams 2007).

The calculated retention indexes were compared with those found in the NIST 2.1 library (Nist 2008), present in the equipment and, for better attribution, the spectra were also compared with the scientific literature data (Adams 2007).

5.2 Obtaining the emulsions and preparing the samples

The tests for evaluating the spatial repellency activity were carried out at the Natural Insecticides Research Laboratory at UESB (LAPIN). The basic non-ionic emulsion for sample preparation was composed of three phases, an aqueous one, an oily one and a complementary. The aqueous phase was composed of disodium EDTA (0.1g), paraben preservative solution (3.3g) and purified water q.s.p.100 mL. The oily phase was composed of 15 g of non-ionic self-emulsifying wax (cetearyl alcohol, cetareth-20, mineral oil, lanolin and vaseline alcohol), dimethicone (2 g), Butylhydroxytoluene (0.05 g) and octyl stearate (2 g). The complementary phase consisted of 0.6 g of a 50% imidazolidinylurea preservative solution. The phases were heated separately in a beaker at a temperature of approximately

75°C. The oil phase was added to the aqueous phase under gentle agitation at a temperature of 40°C to reduce the volume, and then the complementary phase was added. After mixing and homogenizing the phases, the emulsion had its pH adjusted to a range between 5.5 to 6.5 with 50% citric acid and 10% sodium hydroxide.

In possession of the basic non-ionic emulsion, formulations of essential oils of the species *Croton argyrophyllus* (Croton) and *Cymbopogon nardus* (Citronella) were prepared in concentrations of 1, 2, 4 and 10%. As a positive control, the non-ionic emulsion incorporated with N, N-diethyl-3-methylbenzamide (DEET) was used in the same concentrations as the essential oils and, as a negative control, the pure non-ionic emulsion was used. The formulations were stored in a refrigerator and only removed one hour before the bioassays were performed.

5.3 Spatial repellency tests

The spatial repellency tests were conducted under laboratory conditions, with an average temperature of 24.7°C and an average humidity of 71.5%. The spatial repellency tests were performed on an acrylic device developed by the LAPIN team of researchers, according to the recommendations of the World Health Organization - WHO. This device consists of three cylindrical chambers with dimensions of 12.2 cm in length and 4.2 cm in diameter (Figure I): the central chamber, where the *A. aegypti* females are placed and two lateral chambers. In one of the latter, the sample to be tested is placed in a small acrylic container and in the other it remains without any formulation. Before starting the experiment, the side chambers were covered with black oxford fabric.

Ae. aegypti females were separated by pupal sexing and placed in test tubes. After hatching, the females were transferred to different 16.5 x 25 cm polypropylene cages and fed with 10% sucrose solution until the bioassays were set up.

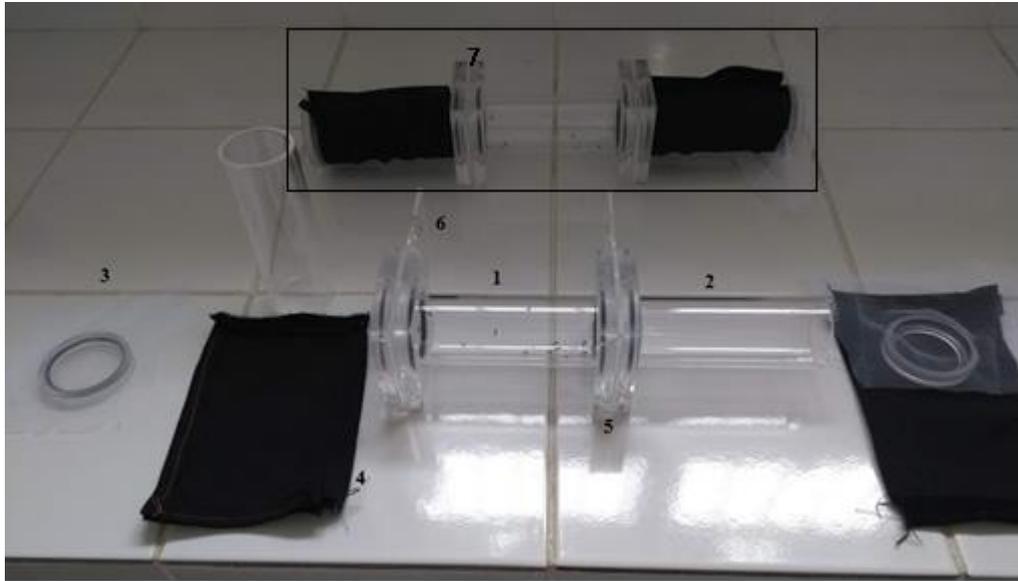


Figure I. System for testing spatial repellency developed by LAPIN – UESB.

¹ Central cylinder; 2. Side cylinders; 3. Final cover; 4. Black fabric with velcro at the ends; 5. Acrylic plate; 6. Acrylic cover with holes; 7. Assembled system

Twenty four hours before the bioassays, the females were transferred to the central acrylic cylinder and the repellency tests were carried out according to the adapted methodology of the WHO spatial activity test. Ten repetitions were made for each formulation using 20 females of *Ae. aegypti* per repetition, totaling 200 females per sample with up to seven days of hatching.

After the introduction of the formulation in the treatment cylinder (500 mg of each sample) one minute was left for the females to adapt, and then the mobile internal structures that close the side chambers to the central chamber were opened simultaneously for the movement of mosquitoes by the device for ten minutes, then they were subsequently closed. In sequence, the black oxford fabric was removed and the number of females in each chamber was counted. These procedures were performed for all treatments. At the end of each test, the chambers were kept open for 20 minutes for odor dissipation and sanitation.

5.4 Data analysis of the spatial repellency tests

The calculation of the Space Activity Index (SAI) was performed based on the equation proposed by Grieco (2005): $SAI = \frac{(N_C - N_T)}{(N_C + N_T)} \times \% R_m$ where, N_C = Number of females in the control chamber; N_T = Number of females in the chamber with the treatment and R_m = Percentage of movement response in each repetition. This index ranges from -1 to 1 , with zero indicating that there was no response; -1 indicates that all mosquitoes have moved to the treatment chamber, resulting in an attractive response; and 1 indicates that all mosquitoes moved to the control chamber, indicating a repellent action and zero indicating no response.

The movement response (R_m) was calculated using the equation: $R_m = \frac{(N_C + N_T)}{10}$

The repellency index (RI) was also calculated as recommended by Grieco et al. (2005), Grieco et al. (2007) and Achee (2009) using the equation: $RI = \frac{(N_C - N_T)}{(N_C)} \times 100$, where, N_C = average number of mosquitoes moved to the control camera and N_T = the number of mosquitoes moved to the camera by the treatment.

After obtaining the SAI, the data were submitted to Analysis of Variance (ANOVA), where the significant values for the F test ($p \leq 0.05$) were subjected to the Tukey tests at 5% probability.

6 RESULTS

The essential oils analyzed showed a viscous appearance, with a characteristic odor and slightly yellow color. *Croton argyrophyllus* Kunth oil showed an average yield of 0.37%, its chemical characterization allowed the identification and quantification of 20 chemical constituents. On the other hand, the essential oil of *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle yielded 1.07%. 34 peaks were detected in this sample, with the possibility of identifying 27 compounds (Table I).

Table I: Chemical composition of the essential oil of *Croton argyrophyllus* Kunth and *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle

Nº	Compound	IK calc.	IK lit.	AR Croton (%)	AR Citronela (%)
1	α -Pineno	941	939	12.58	-
2	β -Pineno	979	979	1.66	-
3	Mirceno	984	990	1.34	-
4	Silvestreno	1036	1030	1.86	-
5	(Z) - β -Ocimene	1038	1037	1.88	-
6	1,8-Cineol	1040	1031	5.30	-
7	Not identified	-	-	-	0.06
8	α -Limonene	1040	1018	-	2.33
9	E- β -ocimene	1053	1050	1.57	-
10	Linalool	1108	1095	-	0.50
11	Citronelal	1174	1153	-	42.93
12	Not identified	-	-	-	0.06
13	Not identified	-	-	-	0.09
14	E-Neral	1238	1239	-	0.41
15	Citronelol	1246	1225	-	11.18
16	E-Geraniol	1276	1249	-	19.89
17	2,6-Octadienal	1283	1267	-	0.64

18	Cyclohexanol	1364	1330	-	1.30
19	citronelol acetate	1371	1352	-	0.77
20	β -Elemeno	1380	1385	5.15	
21	Geranyl acetate	1393	1379	-	1.44
22	β - isocumene	1399	1408	1.17	-
23	B-elemeno	1405	1389	-	1.24
24	E-Karyophyllene	1426	1419	18.23	-
25	Cytronelil	1419	1409	-	0.66
26	NI	-	-	-	0.07
27	α -Humulene	1461	1454	4.25	-
28	9-epi-E-Karyophyllene	1466	1466	0.82	-
29	Germacrene-D	1486	1485	6.66	1.40
30	β -Selinene	1494	1490	0.78	-
31	NI	-	-	-	0.10
32	NI	-	-	-	0.21
33	Bicyclogermacrene	1501	1500	16.24	-
34	α -Germacrene	1513	1509	2.03	-
35	γ -Cadinene	1529	1513	-	0.30
36	Δ Cadineno	1539	1523	-	1.32
37	Elemol	1570	1549	-	6.57
38	Not identified	-	-	-	2.57
39	Not identified	-	-	-	0.10
40	Spatulenol	1585	1578	10.33	-
41	Karyophylline Oxide	1589	1582	6.09	-
42	Viridiflorol	1592	1592	1.33	-
43	Alpha-aromadene	1641	1641	0.74	-
44	γ -Eudesmol	1639	1650	-	0.04
45	(epi)- α -Cadinol	1650	1640	-	0.34
46	Ledol	1661	1642	-	1.05
47	Cyclodecadien-1-il	1675	1648	-	1.97

48	α -Cadinol	1715	1654	-	0.04
49	NI	-	-	-	0.04
50	NI	-	-	-	0.20
51	NI	-	-	-	0.06
Detected				20	34
Identified				20	27
Total hydrocarbon monoterpenes (5)				19.32%	2.33
Total oxygenated monoterpenes (2)				6.87%	78.65
Total hydrocarbon sesquiterpenes (9)				55.33%	3.60
Total oxygenated sesquiterpenes (4)				18.49%	9.59
Components $\leq 0.5\%$					5.83
Total (N)				100	100

No.: peak number by Capillary column elution order; Ik calc.: calculated retention index; RI Lit.: DB-5 capillary column Kovats indexes (ADAMS, 2007); AR: Relative abundance regarding the peak chromatogram area of each essential oil component; NI: Not identified.

As for the spatial repellency activity, the results obtained indicated that the concentration of 2% showed better efficiency in all parameters evaluated (average percentage of movement response of mosquitoes - Rm; spatial activity indices - SAI and repellency indexes - RI) (Table II and Figure II).

Table II: Spatial repellency activity of the essential oils of *Croton argyrophyllus* and *Cymbopogon nardus* against *Aedes aegypti*.

Samples	Concentration	N sample (mosquitoes)	% response			
			% response movement (Rm)	Rate IAE	IR %	Variance (P<0,05)
DEET	1%	10 (200)	0.655	0.365	69.930	0.016
Citronella	1%	10 (200)	0.830	0.691	89.870	0.001
Croton	1%	10 (200)	0.710	0.470	77.460	0.030

Cream without IA3	...	10 (200)	0.770	0.100	11.280	0.049
Glass slides without sample	...	10 (200)	0.710	-0.030	0*	0.005
DEET	2%	10 (200)	0.745	0.535	81.100	0.043
Citronella	2%	10 (200)	0.875	0.704	89.100	0.007
Croton	2%	10 (200)	0.735	0.575	86.110	0.022
Cream without IA3	...	10 (200)	0.745	0.255	14.650	0.152
Glass slides without sample	...	10 (200)	0.805	-0.145	0*	0.038
DEET	4%	10 (200)	0.585	0.385	78.100	0.031
Citronella	4%	10 (200)	0.820	0.507	79.840	0.008
Croton	4%	10 (200)	0.690	0.380	69.480	0.025
Cream without IA3	...	10 (200)	0.740	0.270	47.620	0.045
Glass slides without sample	...	10 (200)	0.765	0.145	20.640	0.043
DEET	5%	10 (200)	0.725	0.485	77.180	0.038
Citronella	5%	10 (200)	0.805	0.550	77.200	0.006
Croton	5%	10 (200)	0.685	0.235	44.950	0.044
Cream without IA3	...	10 (200)	0.535	-0.075	0*	0.021
Glass slides without sample	...	10 (200)	0.760	0.010	0*	0.029

SAI : spatial activity index; IA: Active Ingredient used in all tests; RI: Repellency index; *: Numbers of mosquitoes in the camera with greater treatment than in the control camera, showing no repellency.

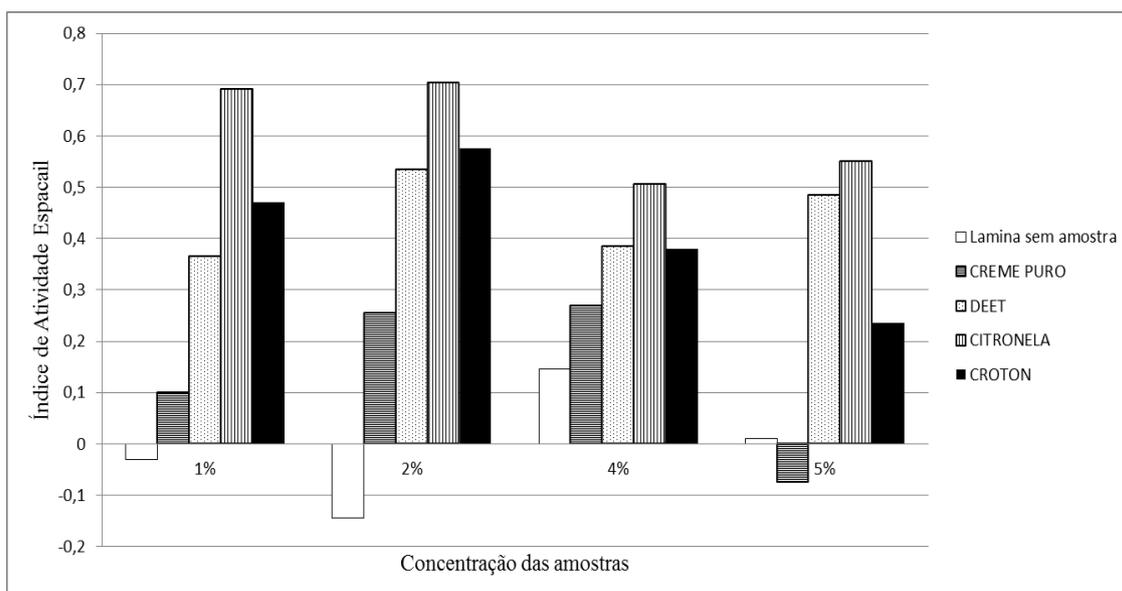


Figure II: Spatial Activity Index (SAI) of samples at 1%, 2%, 4%, and 5% tested against *Ae. aegypti* females

The movement response (Rm) ranged from 53.5 to 87.5%. The repellent activity index (RAI) ranged from 0.03% to 0.70%. And the repellency index (RI) varied from 11.2% to 89% (Table II). The lowest movement response (RM) was recorded for the control (pure cream) in the tests with the highest concentration (5% oil), which differed from the control of the other concentrations (Figure II).

7 DISCUSSION

The yield of the essential oil obtained for *Croton argyrophyllus* was higher than that obtained by Araújo et al. (2014a), who reported a content of 0.33%. Cruz (2017) obtained a content of 0.48% for the same species collected in May. Ramos et al. (2013) observed a yield of 0.76% in material collected in October in the municipality of Canindé de São Francisco, state of Sergipe. Nevertheless, studies by Ribeiro et al. (2018), with species of *Croton blanchetianus*, *Croton nepetifolius* and *Croton zenthneri*, collected at different times (8:00

am, 12:00 and 20:00 pm), showed that the extraction yield of essential oils was better at noon, corresponding to 0.39%; 0.67% and 1.79% of essential oils, respectively. This observation corroborates the data found in the literature, which report that the production of essential oils tends to occur in crops under high levels of solar radiation, due to biosynthetic reactions. But each species has a type of secretory structure, whose tissues accumulate essential oils in different periods (Taiz et al. 2017).

The content observed for *Cymbopogon nardus* oil corroborates that reported by De Castro et al. (2010) for the same species, when grown for 168 days. The worst content of essential oil was observed at 112 days of cultivation, corresponding to 0.65% and the best content occurred at 84 days, corresponding to 1.10%. While using fresh leaves obtained from the Medicinal Horto from UFLA, collected at eight in the morning in January 2008, Oliveira et al. (2011) obtained a yield of $2.27\% \pm 0.70$. Brant et al. (2010), in a planting experiment with one meter distancing between plants, observed a production of 0.16% and, in association with cotton, the content reduced to 0.061%. Therefore, the season, cultural treatment and harvest time influence the production of biomass. In the case of studies that require a greater amount of raw material to perform biological tests with repellent action, factors such as these are crucial in the production of plant material. The essential oil content is an important indicator to optimize the scale of production of aromatic plant species.

Out of the 20 components found in the essential oil of *Croton argyrophyllus*, nine were more representative, they are: α -Pinene (n^o 1 = 12.58%), 1.8-Cineol (n^o 6 = 5.3%), β -Elemene (n^o 20 = 5.15%), E-karyophyllene (n^o 24 = 18.23%), α -humulene (n^o 27 = 4.25%), germacrene-D (n^o 29 = 6.66%), bicyclogermacrene (n^o 33 = 16.24%), spatulenol (n^o 40 = 10.33%) and karyophyllene oxide (n^o 42 = 6.09%), (Table I). Among these compounds, researchers report that compounds number 1, 6, 24, 33 and 40, are major representatives of the species (Cruz et al. 2017, Araújo et al. 2014, Ramos et al. 2013, Fontenelle 2008, Da Silva

Brito 2018, Souza et al. 2017). These constituents occur abundantly in relation to the other compounds, in addition to having high biological activity, they are responsible for the species odor (Simões et al. 2007).

Germacrene D is present in several samples of the mentioned works, except in the works of Araújo et al. (2014) and Fontenelle (2008), β -Elemeno was absent only in the sample of Souza et al. (2017), α -humulene was absent in Fontenelle's work (2008) and karyophyllene oxide was not found in two of the samples of Cruz et al. (2017), Araújo et al. (2014), Ramos et al. (2013) and Fontenelle (2008).

In the essential oil of the species *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle, out of the 27 compounds identified, 80.57% are represented by four compounds: citronellal (n ° 11 = 42.93%), geraniol (n ° 16 = 19.89%), citronellol (n ° 15 = 11.18%) and elemol (n ° 37 = 6.57%) (Table I). This representativeness reports the standard for the chemotype of this access, which differs chemically from oils reported in studies of chemical characterization of other accessions of the same species (Ahmad & Viljoen 2015, Trindade et al. 2015, Aguiar et al. 2014, Andrade et al. 2012, Oliveira et al. 2011, Silou et al. 2017). Nakahara et al. (2003), for example, reported geraniol (35.7%), geranial (22.7%) neral (14.2%) and geranyl acetal (9.7%) as major constituents, a potential chemotype. While cironelal (5.8%) and citronellol (4.5%) were considered secondary compounds by the authors.

Elemol (n ° 37) is also reported in the literature as present in some chemotypes in varying concentrations. Among the observed percentages, it can reach 25.38%. This compound is considered the chemical marker of the genus *Cymbopogon* located in the Mascarene archipelago, in the Pacific Ocean (De Toledo et al. 2016, Chen et al. 2014, Ahmad & Viljoen 2015; Trindade et al. 2015, Kpoviessi et al. 2014, Aguiar et al. 2014, Wei & Wee 2013, Andrade et al. 2012, Oliveira et al. 2011, Silou et al., 2017, Koba et al. 2009, Clain 2018). However, other references report the absence of this constituent in the chemical

composition of species collected in different locations, both cultivated and native. The chemotypes reported in the literature with no elemol were obtained from accesses in India, Thailand, from the UFLA medicinal vegetable garden in the south of Minas Gerais state and from commercial planting in the state of São Paulo (Mahalwal & Ali 2003, Kandimalla et al. 2016, Nakahara 2013, Oliveira et al. 2011, Barbas et al. 2017).

Other chemical profiles are also reported for the species, which have presented different compounds from those described above. Commercial citronella essential oils (Florien®, Piracicaba, SP, Brazil), for example, do not have the citronellal constituent (Barbas et al. 2017). In the same way that citronelol was not detected in populations of the species occurring in Nilgiri Hills, Ooty, India (Barbas et al. 2017, Kpoviessi et al. 2014, Mahalwal & Ali 2003). As well as in the present study, the geranial, known as citral-A, the trans-isomeric form of cis-neral (n° 14), was also not detected in the essential oil of the collection of the Botanical Garden from Abomey-Calavi University.

Another observation made is regarding the constituent Limonene (n°8), which was obtained in 2.33%. According to the literature, this compound is not common in citronella essential oils and, when it occurs, it is a trace element (Mahalwal & Ali 2003). Therefore, the detection of this compound in the oil of the present study suggests that it has a biological activity different from the others.

The results discussed here emphasize that the chemical composition of *Croton argyrophyllus* and *Cymbopogon nardus* oil, due to the genetic character of the species and according to the environmental conditions in which the plants are exposed, present phenotypic plasticity. These factors distinguish accessions as to their chemical characteristics, which justifies the same species having more than one chemotype. For this reason, the correct identification of plants, as well as knowledge about their chemical and environmental attributes are important to promote research on natural products based on the presence of

secondary metabolites in plants. (Araújo et al. 2014, Fontenelle 2008, Souza et al. 2017, Cruz et al. 2017, Borsato et al. 2008, Machado et al. 2013).

For the spatial repellency activity, *Cymbopogon nardus* oil showed a higher movement response than *Croton argyrophyllus* oil in all concentrations, however, for this parameter, there was no significant difference between the essential oils of the two species. Although this variable did not present a significant difference, it was observed that the DEET control at 1%, Croton oil at 4% and 5%, as well as pure cream at 5%, were the treatments that demonstrated the least movement response, with similar response percentages (Table II). However, in the case of the control group, the DEET standard maintained the SAI indexes between 0.365 to 0.535 and the RI index greater than 69% in the four concentrations evaluated.

He also noted that for both the SAI and the RI the repellency activity was reduced as the sample concentration increased. In samples with essential oils of citronella, the spatial activity index (SAI) was above 0.69 and the repellency index (RI) above 89% for concentrations of 1% and 2%. While at concentrations of 4 and 5% these values dropped to SAI 0.50 and 0.55 and RI 77 and 79%, respectively. The same behavior was observed for *Croton argyrophyllus* oil, where SAI and RI were more efficient at 2% with 0.57 and 86%, reducing to 0.23 and 44.95% for the highest concentration (5%) (Table II and Figure II).

In relation to blank tests, performed only with glass coverslips, without the presence of samples, the spatial activity indexes (SAI) were significantly lower or almost null when compared to tests performed with all samples and with variation in all the tests for ($p < 0.05$). It was observed that the SAI of the pharmaceutical form used, non-ionic emulsion, without the active ingredient showed activity and average attractiveness for the 40 samples close to zero, with values ≤ 0.175 . That indicates the reliability in the use of this base in pharmaceutical formulations (Figure II).

It is believed that in concentrations of 4 and 5% of essential oil, as these products are volatile, saturation of all the device's cameras may have occurred, confusing the orientation of mosquitoes and thus interfering with their escape instinct, affecting the repellent potential of the oils. Even so, citronella essential oil showed superior results to DEET in all concentrations for SAI. This result is corroborated by the literature when reporting that citronella oil in concentrations of 0.5 and 1%, had a spatial activity index of 0.22 and 0.35, and in concentrations of 2 and 3% an average repellency rate of 80% was also observed (Sathantriphop 2015).

According to the literature, citronella essential oils have a high percentage of E-karyophyllene, that being the component responsible for the repellent activity against *Aedes aegypti* (Gillij et al. 2008, Mahalwal & Ali 2003, De Toledo et al. 2016, Ahmad & Viljoen 2015, Kpoviessi et al. 2014, Wei & Wee 2013; Silou et al. 2017, Nakahara 2013). Other constituents such as the monoterpenes limonene, citronelal and citronelol were identified in the present study (compounds no. 8, 11, 15), among which citronelal was the major constituent found with 42.93% (Table I). The repellent activity of this compound against *A. aegypti* has also been described in the literature (Ibrahim & Zaki 1998, Jaenson et al. 2006, Park et al. 2005, Yang et al. 2004).

As *Cymbopogon nardus*, different chemotypes of *Croton argyrophyllus* have a toxic effect for larvae and for adult individuals of the dengue vector (*Aedes aegypti*) (Cruz et al. 2017). Although the studied species did not present the best results in the present study; Croton's essential oils are recommended by the authors as potential botanical insecticides, as they present low danger to human health and the environment, since it did not present toxicity in mice. For this species, one of the chemical constituents reported in the literature, which may be responsible for the repellent action, is bicyclogermacrene (Campos et al. 2014). This compound, represented by number 33, was detected as the second most abundant component

present in the oil, with 16.24% of the 20 compounds identified in the sample (Table I). Germacrene D and E-karyophyllene were considered as the bioactive constituents present in citronella oil responsible for the repellent activity (Dória et al. 2010). Nonetheless, Germacrene D was found in a small amount in the sample analyzed ($n^{\circ} 29 = 1.40\%$). The isomeric forms, E-karyophyllene and 9-epi-E-karyophyllene ($n^{\circ} 24 = 18.23\%$ and $n^{\circ} 28 = 0.82\%$) and the oxidized form, karyophyllene oxide ($n^{\circ} 41 = 6, 09\%$) were identified in higher concentrations in Croton oil (Table I). Other authors have also reported E-karyophyllene as the constituent responsible for the citronella oil repellent action (Silou et al. 2017, Ahmad & Viljoen 2015, Kpoviessi et al. 2014).

However, the weak repellent activity of the isolated molecule of E-karyophyllene, extracted from *Croton heliotropiifolius* Kunth and *Croton pulegioidorus* Baill oils (Dória et al. 2010), showed that the essential oil repellent activity is linked to the synergism between the chemical constituents present in them, capable of potentiating their biological effect (Hummelbrunner & Isman 2001, Gillij et al. 2008).

Nevertheless, both species have pharmaceutical potential for the production of a low toxicity repellent. This fact corroborates the data reported in the scientific literature on the repellent activity of bicyclogermacrene and E-karyophyllene, molecules present in the essential oil of *Croton argyrophyllus*, as well as for citronellar and citronellool, found in the essential oil of *Cymbopogon nardus*. Regardless of that, in addition to these compounds, α -pinene and spatulenol were also found in croton essential oil, as well as geraniol was identified in the citronella essential oil, which together ensured the results obtained. Finally, to certify the repellent action of these two species, it is suggested to carry out tests involving other concentrations of essential oils, as well as to carry out toxicity tests in order to achieve a better effectiveness and accuracy in research.

8 CONCLUSION

- The constituents E-karyophyllene (18.23%), bicyclogermacrene (16.24%), α -Pinene (12.58%) and spatulenol (10.33%) represent 57.38% of the chemical composition of the essential oil of croton. While citronelal (42.93%), citronelol (11.18%) and geraniol (19.89%), represented 74% of the chemical composition of citronella essential oil.
- The best dose of repellency response against *Aedes aegypti* with 85% effectiveness was obtained with the formulations of essential oils at 2%. The non-ionic emulsion of the essential oil of croton at a concentration of 2% showed a repellency rate of 57% and the non-ionic emulsion of the essential oil of Citronella at concentrations of 1 and 2% showed repellency rates above 70%.

9 ACKNOWLEDGMENT

To the research promotion agencies: CNPq, CAPES for the granting of master's scholarships, to FAPESB for the financial support granted to the PET0050 / 2013 project and to the Graduate Program in Environmental Sciences at UESB - Campus Itapetinga, for the possibility of research and physical structure.

10 AUTHORS 'CONTRIBUTIONS

¹ Master's degree student and part of the dissertation research

² Coordinator and research advisor

³ Co-advisor and technical support

^{4,5} Research collaborators regarding essays and field collection.

⁶ Writing collaboration and identification of compounds

11 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHEE N. L.; SARDELIS M. R.; DUSFOUR I.; CHAUHAN K. R.; GRIECO J. P. Characterization of spatial repellent, contact irritant, and toxicant chemical actions of standard vector control compounds. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 25, n. 2, p. 156-167, 2009

ADAMS, R. P. **Identification of Essential oil Components by Gas Chromatography / Mass Spectrometry**. 4 ed. Carol Stream, 804p.; Illinois: Allured Publishing Corporation, 2007.

AGUIAR-MENEZES, E. de L. **Inseticidas botânicos: seus princípios ativos, modo de ação e uso agrícola**. Embrapa Agrobiologia, 2005.

AGUIAR, R. W. D. S.; OOTANI, M. A.; ASCENCIO, S. D.; FERREIRA, T. P.; SANTOS, M. M. D.; SANTOS, G. R. D. Fumigant antifungal activity of *Corymbia citriodora* and *Cymbopogon nardus* essential oils and citronellal against three fungal species. **The Scientific World Journal**, v. 2014, 2014.

AHMAD, A.; VILJOEN, A. The in vitro antimicrobial activity of *Cymbopogon* essential oil (lemon grass) and its interaction with silver ions. **Phytomedicine**, v. 22, n. 6, p. 657-665, 2015.

AHMED, I.; NASIR, S.; YOUSAF, I.; AHMAD, B.; ZAFAR, S.; JAVAID, A. PLANT EXTRACTS ALONG WITH SELECTIVE CHEMICALS AND *Bacillus thuringiensis israelensis*: A NOVEL APPROACH TO TACKLE THE PROBLEM OF INSECTICIDAL RESISTANCE IN MOSQUITOES. **Pakistan Journal of Agricultural Sciences**, v. 56, n. 4, 2019.

ALDRID, W. N. Insecticides, past, present and future: practice and understanding of mechanisms. **The Annals of Occupation and Hygiene**. v.22, p.407-09, 1979.

ALMEIDA, G. Os mosquitos (Díptera, Culicidae) e a sua importância médica em Portugal, desafios para o século XXI. **Acta Medica Portuguesa**, v. 24, p. 961-974, 2011.

AMARAL, R. G.; ANDRADE, L. N.; SEVERINO, P.; DE ARAUJO, S. S.; SANTOS, M. I. S.; DIAS, A. S.; ... ESTEVAM, C. S. Investigation of the Possible Antioxidant and Anticancer Effects of *Croton argyrophyllus* (Euphorbiaceae). **Chemical Engineering Transactions**, v. 64, p. 253-258, 2018.

AMBROZIN, A. R. P.; LEITE A. C.; BUENO F. C.; VIEIRA P. C.; FERNANDES J. B.; BUENO O. C.; SILVA M. F. G. F.; PAGNOCCA F. C.; HEBLING M. J. A.; BACCI JR. M. B. Limonoids from *Andiroba* oil and *Cedrela fissilis* and their insecticidal activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo Vol. 17, No. 3, p 542-547, 2006.

AMORIM, G. P. Efeito gastroprotetor do óleo essencial da *Croton argyrophyllus* Kunth e mecanismos de ação farmacológicos em camundongos e lagomorfos. 67 f. Dissertação (Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas) - Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, SE, 2017.

ANDRADE, M. A.; CARDOSO, M. D. G.; BATISTA, L. R.; MALLET, A. C. T.; MACHADO, S. M. F. Essential oils of *Cinnamomum zeylanicum*, *Cymbopogon nardus* and *Zingiber officinale*: composition, antioxidant and antibacterial activities. **Revista Ciência Agronômica**, v. 43, n. 2, p. 399-408, 2012.

ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Farmacopeia Brasileira, volume 1. 5ª Ed. Brasília, 2010.

ANVISA. Gerência de Produtos de Higiene, Perfumes, Cosméticos e Saneantes (GHCOS). Nota Técnica N° 01/2018 - GHCOS / DIARE / ANVISA. Esclarecimentos para o registro de repelentes de insetos. 2018.

ANVISA. Repelentes e inseticidas: Perguntas & Respostas. 2015. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/repelentes-e-inseticidas-perguntas-respostas/219201/pop_up?_101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU_viewMode=print&_101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU_languageId=en_US> Acesso em: 08 agosto 2018.

APEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. **Anatomia vegetal**. 2 ed. Viçosa: Ed. UFV, 2006.

ARAÚJO, C., RIBEIRO-JÚNIOR, N. G., EBURNEO, L., & SILVA, I. Influência da luminosidade nas folhas de citronela (*Cymbopogon nardus* (L.) Rendle). **Rev. Bras. Pl. Med**, v. 19, n. 3, p. 311-317, 2017.

ARAÚJO, F. S.; RODAL, M. J. N.; BARBOSA, M. R. V. **Análise das variações da biodiversidade do bioma caatinga**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2005

ARAUJO, S. S.; SANTOS, M. I. S.; DIAS, A. S.; FERRO, J. N. S.; LIMA, R. N.; BARRETO, E. O.; ... ALVES, P. B. Chemical composition and cytotoxicity analysis of the essential oil from leaves of *Croton argyrophyllus* kunth. **Journal of Essential Oil Research**, v. 26, n. 6, p. 446-451, 2014a.

ARAÚJO, I. C. N.; ARAUJO-JORGE, T. C.; MEIRELLES, R. M. S. Fascículo 5: **Dengue II - O caminho do vírus da dengue**. 2014b.

AZAMBUJA, W. **Química dos óleos essenciais e numero de CAS**. 2011.

BARBAS, L. A. L.; HAMOY, M.; DE MELLO, V. J.; BARBOSA, R. P. M.; DE LIMA, H. S. T.; TORRES, M. F.; ... GOMES, M. R. F. Essential oil of citronella modulates electrophysiological responses in tambaqui *Colossoma macropomum*: A new anaesthetic for use in fish. **Aquaculture**, v. 479, p. 60-68, 2017.

BARBOSA, L. C. D. S. Morfo-anatomia e fitoquímica de *Cymbopogon densiflorus* (Steud.) Stapf e *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle (Poaceae: Panicoideae). 113 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia. 2007

BARRERA, C.; ANDRÉS, C.; GÓMEZ, D. C.; CASTIBLANCO, F. A. Importancia medicinal del género *Croton* (Euphorbiaceae). **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 21, n. 2, p. 234-247, 2016.

BARROS, I. O.; SOARES, A. A. Adaptações anatômicas em folhas de marmeleiro e velame da caatinga brasileira. **Revista Ciência Agronômica**, v. 44, n. 1, p. 192-198, 2013.

BECKER, N.; PLUSKOTA, B.; KAISER, A.; SCHAFFNER, F. Exotic mosquitoes conquer the world. In: **Arthropods as vectors of emerging diseases**. Springer, Berlin, Heidelbergp. Vol 3, p. 31-60, 2012.

BENEDICT, M. Q.; ROBINSON, A. S. The first releases of transgenic mosquitoes: an argument for the sterile insect technique. **Trends in parasitology**, v. 19, n. 8, p. 349-355, 2003.

BERRY, P. E.; HIPPI, A. L.; WURDACK, K. J.; VAN Ee, B. W.; RIINA, R. Molecular phylogenetics of the giant genus *Croton* and tribe *Crotoneae* (Euphorbiaceae sensu stricto) using ITS and trnL-trnF sequence data. **American Journal of Botany**, v. 92, n. 9, p. 1520-1534, 2005.

BESERRA, E. B.; FERNANDES, C. R. M.; SOUSA, J. T.; FREITAS, E. M. Efeito da Qualidade da água no ciclo de vida e na atração para oviposição de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). **Neotropical Entomology**, v. 39, n. 6, p. 1016-102, 2010.

BESERRA, E. B.; FREITAS, E. D.; SOUZA, J. D.; FERNANDES, C. R.; SANTOS, K. D. Ciclo de vida de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera, Culicidae) em águas com diferentes características. **Iheringia Ser Zool**, v. 99, n. 3, p. 281-5, 2009.

BORSATO, A. V.; DONI-FILHO, L.; PAGLIA, E. C. Tricomas glandulares e teores de água e do óleo essencial de *Camomilla recutita* (L.) Rauschert) sob secagem em camada fixa. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 10, n. 2, p. 50-55, ago., 2008.

BRADY, M. T.; BYINGTON, C. L.; DAVIES, H. D.; EDWARDS, K. M.; GLODE, M. P.; JACKSON, M. A.; ... SCHUTZE, G. E. Recommendations for prevention and control of influenza in children, 2012-2013. **Pediatrics**, v. 130, n. 4, p. 780-792, 2012.

BRANT R.S; CORSATO C.D.A; GIUSTOLIN T.A; ROCHA H.C.R & ALBUQUERQUE C.J.B. Teor de óleo essencial de citronela cultivada em consórcio com algodão em sistema orgânico, *Horticultura Brasileira* 28: 3250-3254. 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Diretrizes Nacionais para a Prevenção e Controle da Dengue**. Brasília, 2009.

BRASIL - Formulário Nacional Da Farmacopeia - Ministério da Saúde - ANVISA Brasileira, 2ª Edição: Brasília - Revisão 02, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RESOLUÇÃO - RDC Nº 19, DE 10 DE ABRIL DE 2013. Dispõe sobre os requisitos técnicos para a concessão de registro de produtos cosméticos repelentes de insetos e dá outras providências. 2013.

BRASIL. RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº 07, DE 10 DE FEVEREIRO DE 2015. Dispõe sobre os requisitos técnicos para a regularização de produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes e dá outras providências, de 29, de 11 de fevereiro de 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Gerência Geral de Medicamentos e Produtos Biológicos. Bases técnicas e científicas da conclusão da análise do registro do medicamento aprovado. Vacina dengue 1, 2, 3 e 4 (recombinante, atenuada), Dengvaxia®. 2016. Disponível em: <<http://bit.ly/2MeqpuC>>. Acesso em: 21 de setembro 2019.

BRYAN, J. H. Results of consecutive matings of female *Anopheles gambiae* species B with fertile and sterile males. **Nature**, v. 218, n. 5140, p. 489, 1968.

BROWN. A. W. A. Insecticide resistance in mosquitoes: a pragmatic review. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 2, n. 2, p. 123-140, 1986.

BUENO, V. S.; ANDRADE, C. F. S. Preliminary evaluation of plant essential oils as repellents against *Aedes albopictus* (Skuse, 1894) (Diptera: Culicidae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, n. 2, p. 215-219, 2010.

CAMPOS A. C. T; RADUNZ L. L; MOSSI A. J; DIONELLO R. G. & EXKER S. L. Atividade repelente e inseticida do óleo essencial de carqueja doce sobre o caruncho do feijão. **Rev. bras. eng. agríc. ambient.** 18: 861-865. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/1807-1929/agriambi.v18n08p861-865>. 2014.

CAMPOS, A. C. M. **Dispersão de frutos e sementes na floresta nacional contendas do Sincorá - Bahia**. Trabalho de conclusão de curso. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB. 2018.

CARNEIRO, V. M. T. **Síntese de piretróides e estudos de sua atividade de inseticida**. 2006. 208 p, Dissertação (Mestrado em Agroquímica), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2006.

CARNEIRO-TORRES, D. S. **Diversidade de Croton L. (Euphorbiaceae) no bioma Caatinga**. Tese Doutorado. Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana. 2009.

CASTRO, L. O.; CHEMALE, V. M. **Plantas Mediciniais, condimentares e aromáticas: descrição e cultivo**. Guaíba, RS. Livraria e Editora Agropecuária p.177-179, 1995.

CASTRO, L. O. de; RAMOS, R. L. D. **Principais gramíneas produtoras de óleos essenciais: *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.; capim-cidrô, *Cymbopogon martinii* (Rox.) J.F. Watson, palma-rosa, *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle, citronela, *Elyonurus candidus* (Trin.) Hack. , capim-limão, *Vetiveria zizanioides* (L.) Nash, vetiver**. Porto Alegre: Fepagro. 23p. 2003.

CATMAT. Committee to Advise on Tropical Medicine and Travel. Statement on personal protective measures to prevent arthropod bites. **Canada Communicable Disease Report**; v 31, p.1-18. 2005

CHEN, Q.; XU, S.; WU, T.; GUO, J.; SHA, S.; ZHENG, X.; YU, T. Effect of citronella essential oil on the inhibition of postharvest *Alternaria alternata* in cherry tomato. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, n. 12, p. 2441-2447, 2014.

CLAIN, E.; BARANAUSKIENĖ, R.; KRAUJALIS, P.; ŠIPAILIENĖ, A.; MAŽDŽIERIENĖ, R.; KAZERNAVIČIŪTĖ, R.;... VENSKUTONIS, P. R. Biorefining of *Cymbopogon nardus* from Reunion Island into essential oil and antioxidant fractions by conventional and high pressure extraction methods. **Industrial Crops and Products**, v. 126, p. 158-167, 2018.

COMPAGNONE, R. S.; CHAVEZ, K.; MATEU, E.; ORSINI, G.; ARVELO, F.; SUÁREZ, A. I. Composition and cytotoxic activity of essential oils from *Croton matourensis* and *Croton micans* from Venezuela. **Records of natural products**, v. 4, n. 2, 2010.

CONSOLI, R.; OLIVEIRA, R. L. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, p 228, 1998.

COPPING, L. G.; MENN, J. J. Biopesticides: a review of their action, applications and efficacy. **Pest Management Science: formerly Pesticide Science**, v. 56, n. 8, p. 651-676, 2000.

CORDEIRO, I.; SECCO, R.; CARDIEL, J. M.; STEINMANN, V.; CARUZO, M. B. R.; RIINA, R.; LIMA, L. R. de, MAYA-L.; C. A.; ... & SILVA, R. A. P. 2015. *Euphorbiaceae* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/fb113>>. Acesso em: 19 julho 2019.

COSTA, M. A. R. **Ocorrência do *Aedes aegypti* na Região Noroeste do Paraná: um estudo sobre a epidemia da dengue em Paranavaí – 1999, na perspectiva da Geografia Médica**. 214 p. Dissertação (Mestrado em Institucional em Geografia). Universidade Estadual Paulista - Faculdade Estadual de Educação Ciências e Letras de Paranavaí, Presidente Prudente. 2001.

COSTA, M. A. F.; COSTA, M. F. B. **Biossegurança de OGM: (uma visão integrada)**. Rio de Janeiro: Publit Soluções Editoriais, p. 183. 2009.

COSTA, M. A. R.; SANTOS, R. R. C.; GUALBERTO, S. A.; SILVA, S. L. C. Fenólicos totais, flavonoides totais e atividade antioxidante de extratos de *Croton argyrophyllus* Kunth (Euphorbiaceae). **Enciclopédia Biosfera**. v. 14, n. 25, p. 687-701, 2017.

COSTA, J. M.; SANTOS, T. C.; OLDRINI, B. B.; ODONATA F., 1792. In: RAFAEL, J. A.; MELO, G. A. R.; CARVALHO, C. J. B. de; CASARI, S. A.; CONSTANTINO, R. (Ed.). Insetos do Brasil: diversidade e taxonomia. Ribeirão Preto: Holos Editora, p. 245-256, 2012.

CPTEC/INPE. Centro de Previsão de Tempo e Estudos Climáticos / Instituto Espacial de Pesquisas Espaciais – Dados Observacionais. 2018. Disponível em: <<http://bancodedados.cptec.inpe.br/>>. Acesso em: 15 de setembro 2019.

CRUZ, M. C. S.; SANTOS, P. O.; BARBOSA-JUNIOR, A. M.; Melo, D. L. F. M.; ALVIAONO, C. S.; ANTONIOLLI, A. R.; ALVIANO, D. S.; TRINDADE, R.C. Antifungal activity of Brazilian medicinal plants involved in popular treatment of mycoses. **Journal Ethnopharmacol**, v. 111, n. 2, p. 409-412, 2007.

CRUZ, R. C. D.; CARVALHO, K. S.; SILVA, S. L. C.; GUALBERTO, S. A. Avaliação da Atividade Larvicida de Extratos Aquosos e do Hidrolato Obtidos das Folhas de *Croton argyrophyllus* sobre o *Aedes aegypti*. **Enciclopédia Biosfera**, v. 11, p. 2836, 2015.

CRUZ, R. C.; SILVA, S. L. C. E.; SOUZA, I. A.; GUALBERTO, S. A.; CARVALHO, K. S.; SANTOS, F. R. Toxicological Evaluation of Essential Oil From the Leaves of *Croton argyrophyllus* (Euphorbiaceae) on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) and *Mus musculus* (Rodentia: Muridae). **Journal of medical entomology**, p. 1-9, 2017.

CUNHA, S. L.; GUALBERTO, S. A.; CARVALHO, K. S.; FRIES, D. D. Avaliação da atividade larvicida de extratos obtidos do caule de *Croton linearifolius* Mull. Arg. (Euphorbiaceae) sobre larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae). **Revista Biotemas**, v. 27, n. 2, p. 79-85, 2014.

DA CRUZ, R. C. D. Avaliação do potencial inseticida das folhas de *Croton argyrophyllus* (Euphorbiaceae) sobre o *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) e toxicológica sobre *Mus*

musculus (Rodentia: Muridae). Dissertação de mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais, Itapetinga-BA: UESB. 2016.

DA LUZ, R. D. J. L.; DE SOUSA, E. P.; DE MELO ARAÚJO, E. M.; FONSECA, S. H.; DE MOURA R. G. M.; DE ARAUJO, J. A. F.. O processo de enfermagem no cuidado da dengue/The nursing process in the care of dengue. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 2, n. 2, p. 1078-1085, 2019.

DA SILVA BRITO, S. S.; SILVA, F.; MALHEIRO, R.; BAPTISTA, P.; PEREIRA, J. A. Croton argyrophyllus Kunth and Croton heliotropiifolius Kunth: Phytochemical characterization and bioactive properties. **Industrial crops and products**, v. 113, p. 308-315, 2018.

DA SILVEIRA, L. T. C.; TURA, B.; SANTOS, M. Systematic review of dengue vaccine efficacy. **BMC infectious diseases**, v. 19, n. 1, p. 1-8, 2019.

DE ALBUQUERQUE, U. P. Medicinal plants of the Caatinga (semi-arid) vegetation of ne Brazil: a quantitative approach. **Journal Ethnopharmacol** v. 114, n. 3, p. 325-354, 2007.

DE MOURA, M. H. S.; DOS SANTOS, R. H. G.; KARINE, E.; DA SILVA, C.; OLIVEIRA, A. F. **Influência da sazonalidade sobre rendimento e atividade antioxidante de óleo essencial foliar de *Croton argyrophyllus* KUNTH.**(Euphorbiaceae). In: Congresso Nacional de Diversidade do semiárido (CONADIS), 1º, 2018. Natal – RN. 2018. Disponível em: <https://editorarealize.com.br/revistas/conadis/trabalhos/TRABALHO_EV116_MD1_SA17_ID389_28092018164533.pdf>. Acesso em: 09 de julho 2019.

DENG, S.; HUANG, Q.; WEI, H.; ZHOU, L.; YAO, L.; LI, D.; ... PENG, H. Beauveria bassiana infection reduces the vectorial capacity of Aedes albopictus for the Zika virus. **Journal of Pest Science**, v. 92, n. 2, p. 781-789, 2019.

, M. A.; DA SILVA, L.; MACÊDO, M. J. F.; LACERDA-NETO, L. J.; DOS SANTOS, M. A. C.; COUTINHO, H. D. M.; CUNHA, F. A. B. Adulticide and repellent activity of essential oils against Aedes aegypti (Diptera: Culicidae)—A review. **South African Journal of Botany**, v. 124, p. 160-165, 2019.

DE TOLEDO, L.; RAMOS, M.; SPÓSITO, L.; CASTILHO, E.; PAVAN, F.; LOPES, É.; ... BAUAB, T. Essential oil of *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle: a strategy to combat fungal infections caused by *Candida* species. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 8, p. 1252, 2016.

DELETRE, E.; MARTIN, T.; DUMÉNIL, C.; CHANDRE, F. A resistência a inseticidas modifica a resposta do mosquito ao DEET e aos repelentes naturais. **Parasitas e vetores**, v. 12, n. 1, p. 89, 2019.

DELORY, B. M.; DELAPLACE, P.; FAUCONNIER, M. L.; JARDIN, P. Root-emitted volatile organic compounds: can they mediate belowground plant-plant interactions? **Plant and Soil**, v.402, n.1, p.1-26, 2016.

DIAMOND, M. S.; LEDGERWOOD, J. E.; PIERSON, T. C. Zika virus vaccine development: progress in the face of new challenges. **Annual review of medicine**, v. 70, p. 121-135, 2019

DÓRIA, G. A.; SILVA, W. J.; CARVALHO, G. A.; ALVES, P. B.; CAVALCANTI, S. C. H. A study of the larvicidal activity of two *Croton* species from northeastern Brazil against *Aedes aegypti*. **Pharmaceutical Biology**, v. 48, n. 6, p. 615-620, 2010.

DUARTE M. C. T.; LEME E. E.; DELARMELINA C.; SOARES A. A.; FIGUEIRA G. M.; SARTORATTO A. Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. **Journal of ethnopharmacology**. v. 111, n. 2, p. 197-201, 2007.

EPA – “Environmental Protection Agency” – Product Performance Test Guidelines: OPPTS 810.3700: **Insect repellents to be applied to human skin**. PA 712-C-10-001, July 7, 2010.

FAHN, A.; CUTLER, D. F. **Xerophytes**. Berlin: Gebrüder Borntraeger, 1992.

FIOCRUZ. Disponível em: <<https://portal.fiocruz.br/pergunta/quanto-tempo-o-ovo-do-mosquito-aedes-aegypti-resiste-no-ambiente>>. 2016. Acesso em: 07 de agosto 2018.

FONTENELLE, R. O. S., MORAIS, S. M., BRITO, E. H. S., BRILHANTE, R. S. N., CORDEIRO, R. A., NASCIMENTO, N. R. F., ... & ROCHA, M. F. G. . Antifungal activity of essential oils of Croton species from the Brazilian Caatinga biome. **Journal of applied microbiology**, v. 104, n. 5, p. 1383-1390, 2008.

FRANCES, S. P.; WATERSON, D. G. E.; BEEBE, N. W.; COOPER, R. D. 2004. Field evaluation of repellent formulations containing deet and picaridin against mosquitoes in Northern Territory, Australia. **Journal of medical entomology**, v. 41, n. 3, p. 414-417, 2004.

GARCIA, A. A.; CARRIL, E. P. U. Metabolismo secundário de plantas. **Reduca (biología)**, v. 2, n. 3, 2011.

GARIGLIO, M. A.; SAMPAIO, E. D. S.; CESTARO, L. A.; & KAGEYAMA, P. Y. **Uso sustentável e conservação dos recursos florestais da caatinga**. Brasília: Serviço Florestal Brasileiro. p. 116-127. 2010.

GBIF - Global Biodiversity Information Facility. 2018. Disponível em:<<https://www.gbif.org/species/3059224>>. Acesso em: 24 de abril 2018.

GILL, H. K.; GARG, H. Pesticidas: impactos ambientais e estratégias de manejo. Em: **Aspectos tóxicos a pesticidas** . IntechOpen, 2014.

GILLIJ, Y. G.; GLEISER, R. M.; ZYGADLO, J. A. Mosquito repellent activity of essential oils of aromatic plants growing in Argentina. **Bioresou Technol.** 99, 2507–2515. 2008.

GOELDI, E.A. Os mosquitos no Pará. **Mem Mus Goeldi Hist Nat Ethnog** 4. 1905.

GOKULAKRISHNAN, J.; KUPPUSAMY, E.; SHANMUGAM, D.; APPAVU, A.; KALIYAMOORTHY, K. Atividades pupicidas e repelentes de compostos químicos de óleo essencial de Pogostemon cablin contra mosquitos vetoriais medicamente importantes. **Jornal do Pacífico Asiático de Doenças Tropicais** , v. 3, n. 1, p. 26-31, 2013.

GOMES, A. P. D. S.; SALES, M. F. D.; MELO, A. L. D. Taxonomic novelties in *Croton* L. sect. *Argyroglossum* Baill. and sect. *Lasiogyne* Klotzsch (Crotonoideae-Euphorbiaceae. **Acta Botanica Brasilica**, v. 24, n. 4, p. 905-908, 2010.

GRIECO, J. P.; ACHEE, N. L.; SARDELIS, M. R.; CHAUHAN, K. R.; ROBERTS, D. R. A Novel High-Throughput Screening System to Evaluate the Behavioral Response of Adult Mosquitoes to Chemicals¹. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 21, n. 4, p. 404-412, 2005.

GRIECO, J. P.; ACHEE, N. L.; CHAREONVIRIYAPHAP, T.; SUWONKERD, W.; CHAUHAN, K.; SARDELIS, M. R.; & Roberts, D. R. A new classification system for the actions of IRS chemicals traditionally used for malaria control. **PLoS one**, v. 2, n. 8, p. e716, 2007.

DE CASTRO, H. G.; DE MOURA PERINI, V. B.; DOS SANTOS, G. R.; LEAL, T. C. A. B. Avaliação do teor e composição do óleo essencial de *Cymbopogon nardus* (L.) em diferentes épocas de colheita. **Revista Ciência Agronômica**, v. 41, n. 2, p. 308-314, 2010.

HEMINGWAY, J.; RANSON, H. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. **Annual review of entomology**, v. 45, n. 1, p. 371-391, 2000.

HUMMELBRUNNER, L. A.; ISMAN, M. B. Acute, sublethal, antifeedant and synergistic effects of monoterpenoid essential oil compounds on the tobacco cutworm, *Spodoptera litura* (Lep. Noctuidae). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 2, p. 715-720, 2001.

IBRAHIM, J.; ZAKI, Z.M. Development of environment-friendly insect repellents from the leaf oils of selected Malaysian plants, **ASEAN Review of Biodiversity and Environmental Conservation (ARBEC)**. *Conserv.* 6, 1-7. 1998.

ISLAM, J.; ZAMAN, K.; DUARAH, S.; RAJU, P. S.; CHATTOPADHYAY, P. Mosquito repellents: an insight into the chronological perspectives and novel discoveries. **Acta tropica**, v. 167, p. 216-230, 2017a.

ISLAM, J.; ZAMAN, K.; TYAGI, V.; DUARAH, S.; DHIMAN, S.; CHATTOPADHYAY, P. Protection against mosquito vectors *Aedes aegypti*, *Anopheles stephensi* and *Culex quinquefasciatus* using a novel insect repellent, ethyl anthranilate. **Acta Tropica**, v. 174, p. 56-63, 2017b.

ISMAN, M. B. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. **Annual Review of Entomology**, v. 51, p. 45-66, 2006.

JAENSON, T.G.; PALSSON, K.; BORG-KARLSON, A.K. Evaluation of extracts and oils of mosquito (Diptera: Culicidae) repellent plants from Sweden and Guinea-Bissau. **J. Med. Entomol.** 43, 113–119. 2006.

LOPES N.; NOZAWA C. & CARVALHO L. R. E. Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil. *Ver Pan-Amaz Saude* 5: 55-64. 2014.

KANDIMALLA, R.; KALITA, S.; CHOUDHURY, B.; DASH, S.; KALITA, K. & KOTOKY, J.. Chemical composition and anti-candidiasis mediated wound healing property of *Cymbopogon nardus* essential oil on chronic diabetic wounds. **Frontiers in pharmacology**, v. 7, p. 198, 2016.

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. 865-871, 2008.

KERBAUY, G. B. **Fisiologia vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.

KIM, S. I.; ROH, J. Y.; KIM, D. H.; LEE, H. S.; AHN, Y. J. Insecticidal activities of aromatic plant extracts and essential oils against *Sitophilus oryzae* and *Callosobruchus chinensis*. **Journal of Stored Products Research**, v.39, p.293-303, 2003.

KOBA, K.; SANDA, K.; GUYON, C.; RAYNAUD, C.; CHAUMONT, J. P.; NICOD, L.. In vitro cytotoxic activity of *Cymbopogon citratus* L. and *Cymbopogon nardus* L. essential oils from Togo. **Bangladesh Journal of Pharmacology**, v. 4, n. 1, p. 29-34, 2009.

KOOU, S. Y.; CHONG, C. S.; VYTHILINGAM, I.; NG, L. C.; LEE, C. Y. . Pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* larvae (Diptera: Culicidae) from Singapore. **Journal of medical entomology**, v. 51, n. 1, p. 170-181, 2014.

KPOVIESSI, S.; et al. Chemical composition, cytotoxicity and in vitro antitrypanosomal and antiplasmodial activity of the essential oils of four *Cymbopogon* species from Benin. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 151, n. 1, p. 652-659, 2014.

LEAL, I. R.; TABARELLI, M.; DA SILVA, J. M. C. Ecologia e conservação da Caatinga. Recife : Ed. Universitária da UFPE, 2003.

LEAL, W. S. The enigmatic reception of DEET—the gold standard of insect repellents. **Current opinion in insect science**, v. 6, p. 93-98, 2014

LIMA, M. G. A.; MAIA, I. C. C.; SOUSA, B. D.; MORAIS, S. M.; FREITAS, S. M. Effect of stalk and leaf extracts from Euphorbiaceae species on *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) larvae. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 48, n. 4, p. 211-214, 2006.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA, J. V.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MAHALWAL, V. S.; ALI, M. Volatile constituents of *Cymbopogon nardus* (Linn.) Rendle. **Flavour and fragrance journal**, v. 18, n. 1, p. 73-76, 2003.

MACHADO, M. P.; BERGO, C. L.; DESCHAMPS, C.; BIZZO, H. R.; BIASI, L. A. Efeito da secagem natural e artificial da biomassa foliar de *Piper hispidinervum* na composição química do óleo essencial. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 1, p. 265-270, 2013.

MARQUES, G. R. A. M.; CHAVES, L. S. M.; SERPA, L. L. N.; ARDUÍNO, M. B.; CHAVES, F. J. M. Água de abastecimento público de consumo humano e oviposição de *Aedes aegypti*. **Revista de Saúde Pública**, v. 47, n. 3, p. 579-87, 2013.

METCALFE, C.R.; CHALK, L. **Anatomy of the Dicotyledons: Wood Structure and Conclusion of the General Introduction**. Vol. 2. New York, Oxford University Press, 1983.

MIRANDA, F. M.; BRAGA do N. J.; AGUIAR, R. M.; PEREIRA, R. S.; DE OLIVEIRA, A. T.; DE OLIVEIRA, D. M.; ... FROLDI, G. Promising antifungal activity of Croton tricolor stem essential oil against Candida yeasts. **Journal of Essential Oil Research**, v. 31, n. 3, p. 223-227, 2019.

NAKAHARA, Kazuhiko et al. Chemical composition and antifungal activity of essential oil from Cymbopogon nardus (citronella grass). **Japan Agricultural Research Quarterly: JARQ**, v. 37, n. 4, p. 249-252, 2013.

NERIO, Luz Stella; OLIVERO-VERBEL, Jesus; STASHENKO, Elena. Repellent activity of essential oils: a review. **Bioresource technology**, v. 101, n. 1, p. 372-378, 2010.

NIST. Standard Reference Database 69: NIST Chemistry Web Book, 2008. Disponível em: <<http://www.itl.nist.gov/iad/mig/tests/sre/2008/>>. Acessado em: 25 mai., 2019.

OLIVA, C. F.; JACQUET, M.; GILLES, J.; LEMPERIERE, G.; MAQUART, P. O.; QUILICI, S.; ... BOYER, S. The sterile insect technique for controlling populations of Aedes albopictus (Diptera: Culicidae) on Reunion Island: mating vigour of sterilized males. **PloS one**, v. 7, n. 11, p. e49414, 2012.

OLIVEIRA, B. R. de. **Desenvolvimento e avaliação de nanoemulsões com óleos de Carapa guianensis e Copaifera sp. e estudo da ação repelente frente a Aedes aegypti**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, SP. 2008b

OLIVEIRA, G. P. **Avaliação do potencial larvicida de extratos do caule de Croton argyrophyllus Kunth (Euphorbiaceae: Crotonoideae) sobre Aedes aegypti (L.) (Diptera: Culicidae)**. Itapetinga-BA: UESB, 63p. Dissertação – Mestrado em Ciências Ambientais – Área de Concentração em Meio Ambiente e Desenvolvimento). 2014.

OLIVEIRA, M. M. M.; BRUGNERA, D. F.; CARDOSO, M. G.; GUIMARÃES, L. G. L.; PICCOLI, R. H. Rendimento, composição química e atividade antilisterial de óleos essenciais de espécies de *Cymbopogon*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 1, p. 8-16, 2011.

OLIVEIRA, P. T.; SANTOS E SILVA, C. M.; LIMA, K. C. Climatology and trend analysis of extreme precipitation in subregions of Northeast Brazil. **Theoretical and Applied Climatology**, v. 130, p. 77- 90, 2017.

OLIVEIRA, S. L. de. **Métodos de análise de repelência em *Aedes aegypti*** (Culicidae, Díptera) utilizando produtos naturais. 2008. Trabalho de conclusão de curso. Universidade Federal do Paraná Curitiba, Pr. 2008a.

OPAS/OMS (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE/ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE) . 2016. WHO report on global surveillance of epidemic-prone infectious diseases. Disponível em: <https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=11780:scientists-studying-intensified-vector-control-measures-to-combat-zika-dengue-chikungunya-americas&Itemid=1926&lang=pt> . Acesso em 23 de agosto 2019.

PAEPORN, P.; SUPAPHATHOM, K.; SATHANTRIPHOP, S.; MUKKHUN, P.; SANGKITPORN, S. Insecticide. Susceptibility of *Aedes aegypti* in tsunami-affected areas in Thailand. **Dengue Bulletin**, v. 29, p. 210-213, 2005.

PAGOTO, M. A.; ROIG, F. A.; RIBEIRO, A. S.; LISI, C. S. Influence of regional rainfall and Atlantic sea surface temperature on tree-ring growth of *Poincianella pyramidalis*, semiarid forest from Brazil. **Dendrochronologia**, v. 35, p. 14-23, 2015.

PARK, B. S.; CHOI, W. S.; KIM, J. H.; KIM, K. H.; LEE, S. E. Monoterpenes from Thyme (*Thymus vulgaris*) as potential mosquito repellents. **Journal of the American Mosquito Control Association**, Fresno; n.21, v. 1, p.80-83, 2005.

PASA, M. C.; ÁVILA, G. Ribeirinhos e recursos vegetais: a etnobotânica em Rondonópolis, Mato Grosso, Brasil. **Interações**, v. 11, n. 2 p. 195-204, jul./dez. 2010.

PATEL, E. K.; GUPTA, A.; OSWAL, R. J. A Review On: Mosquito Repellent Methods, **International Journal Of Pharmaceutical, Chemical And Biological Sciences**, v. 2, p. 310-317, 2012.

PHASOMKUSOLSIL, S.; SOONWERA, M. Efficacy of herbal essential oils as insecticide against *Aedes aegypti* (Linn.), *Culex quinquefasciatus* (Say) and *Anopheles dirus* (Peyton and Harrison). **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 42, n. 5, p. 1083, 2011.

PINHEIRO, A. L. **Produção de óleos Essenciais**, Viçosa: CPT, 2003.

RAMOS, J. M. O.; SANTOS, C. A.; SANTANA, D. G.; SANTOS, D. A.; ALVES, P. B.; THOMAZZI, S. M. Chemical constituents and potential anti-inflammatory activity of the essential oil from the leaves of *Croton argyrophyllus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 4, p. 644-650, 2013.

RAMOS, J. M. O.; SANTOS, C.A.; SANTANA D.G.; ANTONIOLLI, A.R.; SANTOS, D.A.; ALVES, P.B.; THOMAZZI, S.M. Impact of *Croton argyrophyllus* essential oil on behavioural models of nociception. 2016. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ffj.3343/full>>. Acesso em: 24 de setembro 2017.

RAY, A. Reception of odors and repellents in mosquitoes. **Current opinion in neurobiology**, v. 34, p. 158-164, 2015.

RIBEIRO S.M; BONILLA O.H. & LUCENA E.M.P. Influência da sazonalidade e do ciclo circadiano no rendimento e composição química dos óleos essenciais de *Croton* spp. da Caatinga. *Iheringia*, 73: 31-38. DOI 10.21826/2446-8231201873104. 2018.

ROCKENBACH, A. P.; RIZZARDI, M. A.; NUNES, A. L.; BIANCHI, M. A.; CAVERZAN, A.; & SCHNEIDER, T.. Interferência entre plantas daninhas e a cultura: alterações no metabolismo secundário. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 17, n. 1, p. 59-70, 2018.

RODRÍGUES-MORALES A. J; Zika: the new arbovirus threat for Latin America. *J infect Dev Ctries* 9: 684-685. doi:10.3855/jidc.7230. 2015.

SAHOO, S.; DEBATA, B. K. Recent advances in breeding and biotechnology of aromatic Plants: cymbopogon species. **Plant Breeding Abstracts**, v.65, n.12, 1995.

SALATINO, A; SALATINO, M. L. F.; NEGRI, G. Traditional uses, chemistry and pharmacology of Croton species (Euphorbiaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 1, p. 11-33, 2007.

SANJAD, N. On'the abominable profession of being a vampire': Emílio Goeldi and Mosquitos in Pará (1905). **História, Ciências, Saúde-Manguinhos**, v. 10, n. 1, p. 85-111, 2003.

SATHANTRIPHOP, S.; ACHEE, N. L.; SANGUANPONG, U.; & CHAREONVIRIYAPHAP, T.. The effects of plant essential oils on escape response and mortality rate of *Aedes aegypti* and *Anopheles minimus*. **Journal of Vector Ecology**, v. 40, n. 2, p. 318-326, 2015.

SHASANY, A. K.; LAL, R. K.; PATRA, N. K.; DAROKAR, M. P.; GARG, A.; KUMAR, S.; KHANUJA, S. P. S. Phenotypic and RAPD diversity among *Cymbopogon winterianus* Jowitt accessions in relation to *Cymbopogon nardus* Rendle. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 47, n. 5, p. 553-559, 2000.

SiBBr. *Croton argyrophyllus* in Ficha de Espécies do Sistema de Informação sobre a Biodiversidade Brasileira (SiBBr). 2018. Disponível em: <https://ferramentas.sibbr.gov.br/ficha/bin/view/especie/croton_argyrophyllus>. Acesso em: 24 de julho 2018

SIKKEMA, J.; BONT, J. A. M.; POOLMAN, B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiological Reviews*, v.59, n.2, p.201-22, 1995.

SILOU T.; BIKANGA R.; NSIKABAKA S.; NOMBAULT J.; MAVOUNGOU C.; FIGUÉRÉDO G & CHALCHAT J-C. Plantes aromatiques du Plateau des Cataractes (Bassin

du Congo). Caractérisation du chémotype de l'huile essentielle de *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle acclimaté au Congo-Brazzaville. **Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement**, v. 21, n. 2, p. 105-116, 2017.

SILVA, F. B. da R. Avaliação dos componentes de óleos essenciais 1, 8-cineol, β -cariofileno e α -humuleno como possíveis repelentes para *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Diptera: Culicidae). 2014.

SILVA, J. S.; SALES, M. F.; GOMES, A. P. S.; CARNEIRO-TORRES, D. S. Sinopse das espécies de *Croton* L. (Euphorbiaceae) no estado de Pernambuco, Brasil. **Acta Botânica Brasileira**, v. 24, n. 2, p. 441-453, 2010.

SILVA V. A.; OLIVEIRA, C. R. M.; PESSÔA, H. L. F.; PEREIRA M. S. V. Antimicrobial efficacy of the extract of *Croton sonderianus* Mull. On bactéria that cause dental caries. **Revista de Odontologia da UNESP**. V.40, n.2, p.69- 72, 2011.

SILVEIRA, J. C.; BUSATO, N. V.; COSTA, A. O. S.; COSTA JR.; E. F. **Levantamento e análise de métodos de extração de óleos essenciais**. **Enciclopédia Biosfera**, v. 8, n. 15, p. 2038-2052, 2012.

SIMAS, K. N. Produtos naturais para o controle da transmissão da dengue: atividade larvicida de *Myroxylon balsamum* (óleo vermelho) e de terpenóides e fenilpropanóides. *Quim. Nova* 27: 46-49. 2004.

SIMÕES, C.M.O; SCHENKEL E.P; GOSMANN G; MELLO J.C.P; MENTZ L.A.A & PETROVICK P.R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. ed. 6, ED., Porto Alegre: UFRGS, 1102 p. 2007.

SOUZA, G. S. D.; BONILLA, O. H.; LUCENA, E. M. P. D.; & BARBOSA, Y. P. Chemical composition and yield of essential oil from three *Croton* species. *Ciência Rural*, v. 47, n. 8, 2017.

SNYDER, K. A.; TARTOWSKI, S. L. Multi-scale temporal variation in water availability: Implications for vegetation dynamics in arid and semi-arid ecosystems. **Journal of Arid Environments**, v. 65, n. 2, p. 219-234, 2006.

SRITABUTRA, D.; SOONWERA, M. Repellent activity of herbal essential oils against *Aedes aegypti* (Linn.) and *Culex quinquefasciatus* (Say.). **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 3, n. 4, p. 271-276, 2013

STEFANI, G. P.; PASTORINO, A. C.; CASTRO, A. P. B.; FOMIN, A. B. F.; JACOB, C. M. A. Repelentes de insetos: recomendações para uso em crianças. **Revista Paulista de Pediatria**, v. 27, n. 1, p. 81-89, 2009.

TAIZ L.; ZEIGER E. **Fisiologia vegetal**. 5ª.ed. Porto Alegre-RS: Artmed, 954 p. 2013.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MØLLER, I. M.; MURPHY, A. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. Artmed Editora, 2017

TAPP, R.; ELIEL, M.; DOLAN, D. D.; ALTSCHULER, R. A.; GAUVIN, D. V, BAIRD, T. J. Comparison of pigmented and albino guinea pigs for use in ototoxicity modeling. **Jornal Pharmacol Toxicol Meth**, v. 60, n. 2, p. 210-258, 2009.

TISSOT, A. C. Testes de repelência com nova metodologia em *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762 (Culicidae, Diptera) e determinação química do óleo essencial de *Trichilia pallida* (Meliaceae). 100 f. Tese (Doutorado em entomologia) – Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2008.

THACKER, J. R. M. **An Introduction to arthropod pest control**. Cambridge University Press. P. 360. 2002.

TRINDADE, Leonardo Antunes et al. Inhibition of adherence of *C. albicans* to dental implants and cover screws by *Cymbopogon nardus* essential oil and citronellal. **Clinical oral investigations**, v. 19, n. 9, p. 2223-2231, 2015.

TRONGTOKIT, Y.; RONGSRIYAM, Y.; KOMALAMISRA, N.; APIWATHNASORN, C. Comparative repellency of 38 essential oils against mosquito bites. **Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives**, v. 19, n. 4, p. 303-309, 2005.

VARGAS, H. C. M.; FARNESI, L. C.; MARTINS, A. J.; VALLE, D.; REZENDE, G. L. Serosal cuticle formation and distinct degrees of desiccation resistance in embryos of the mosquito vectors *Aedes aegypti*, *Anopheles aquasalis* and *Culex quinquefasciatus*. **Journal of Insect Physiology**, v. 62, p. 54-60, 2014.

VIEGAS-JUNIOR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v.29, n.2, p.326-337, 2006.

YANG L.; NORRIS E.J; JIANG S.; BERNIER U.R.; LINTHICUM K. & BLOOMQUIS J.R. Reduced effectiveness of repellents in a pyrethroid-resistant strain of *Aedes aegypti* (Diptera: culicidae) and its correlation with olfactory sensitivity. *Pest Management Science* 76: 118-124. <https://doi.org/10.1002/ps.5562>. 2019.

YANG, Y.C.; LEE, E.H.; LEE, H.S.; LEE, D.K.; AHN, Y.J. Repellency of aromatic medicinal plant extracts and a steam distillate to *Aedes aegypti*. **Journal of the American mosquito control association**, v. 20, n. 2, p. 146-149, 2004.

WEI, L. S.; WEE, W. Chemical composition and antimicrobial activity of *Cymbopogon nardus* citronella essential oil against systemic bacteria of aquatic animals. **Iranian journal of microbiology**, v. 5, n. 2, p. 147, 2013.

WHO. Global malaria control and elimination: report of a technical review. WHO, Geneva, Switzerland. 2008. Disponível em: <<http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241596756>>. Acesso em: 07 de novembro 2017.

WHO. Vector borne diseases. 2016. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs387/en/>. Acesso em: 24 de setembro 2017.

WHO. World malaria report. Geneva: World Health Organization; 2018.

WHO. Dengue and severe dengue. 2019. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>>. Acesso em: 08 de julho 2019.

WHO et al. Guidelines for efficacy testing of mosquito repellents for human skin. 2009.

WHO et al. Guidelines for efficacy testing of spatial repellents. 2013.

ZAPPI, D. C.; FILARDI, F. L. R.; LEITMAN, P.; SOUZA, V. C.; WALTER, B. M.; PIRANI, J. R.; ... FORZZA, R. C. Growing knowledge: an overview of seed plant diversity in Brazil. **Rodriguésia**, v. 66, n. 4, p. 1085-1113, 2015.

ZARA, A. L. D. S. A.; SANTOS, S. M. D.; FERNANDES-OLIVEIRA, E. S.; CARVALHO, R. G.; COELHO, G. E. Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. **Epidemiol. Serv. Saúde**, Brasília , v. 25, n. 2, p. 391-404, jun. 2016

ZHANG, H.; GEORGESCU, P.; HASSAN, A. S. Mathematical insights and integrated strategies for the control of *Aedes aegypti* mosquito. **Applied Mathematics and Computation**, v. 273, p. 1059-1089, 2016

12 SUBTITLE

Table I: Chemical composition of the essential oil of *Croton argyrophyllus* Kunth and *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle

No.: peak number by Capillary column elution order; Ik calc.: calculated retention index; RI Lit.: DB-5 capillary column Kovats indexes (ADAMS, 2007); AR: Relative abundance regarding the peak chromatogram area of each essential oil component; NI: Not identified.

Table II: Spatial repellency activity of the essential oils of *Croton argyrophyllus* and *Cymbopogon nardus* against *Aedes aegypti*.

SAI: spatial activity index; IA: Active Ingredient used in all tests; RI: Repellency index; *: Numbers of mosquitoes in the camera with greater treatment than in the control camera, showing no repellency.

Figure I. System for testing spatial repellency developed by LAPIN – UESB.

¹ Central cylinder; 2. Side cylinders; 3. Final cover; 4. Black fabric with velcro at the ends; 5. Acrylic plate; 6. Acrylic cover with holes; 7. Assembled system

Figure II: Spatial Activity Index (SAI) of samples at 1%, 2%, 4%, and 5% tested against *Ae. aegypti* females

White: without sample, horizontal stripe: pure cream, black dots: DEET, vertical stripe: citronela and black: croton