



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



**POTENCIAL REPELENTE DO ÓLEO ESSENCIAL DAS
FOLHAS DE *Croton tetradenius* (EUPHORBIACEAE) SOBRE
Aedes aegypti LINN. (DIPTERA: CULICIDAE)**

Daniel Lobo Sousa

Itapetinga - Bahia
Junho - 2021

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

**Potencial Repelente do Óleo Essencial das Folhas de *Croton
tetradenius* (Euphorbiaceae) sobre *Aedes aegypti* Linn. (Diptera:
Culicidae)**

Autor: Daniel Lobo Sousa
Orientadora: Dra. Janaina Silva de Freitas
Co-orientadora: Dra. Simone Andrade Gualberto
Dra. Débora Cardoso da Silva

“Dissertação apresentada, como parte das exigências para a obtenção do título de MESTRE EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS, no Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências Ambientais da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - Área de concentração: Meio Ambiente e Desenvolvimento”

Itapetinga - Bahia
Junho - 2021

632.951 Sousa, Daniel Lobo
7 Potencial repelente do óleo essencial das folhas de *Croton*
S696p *tetradenius* (Euphorbiaceae) sobre *Aedes aegypti* Linn. (Diptera:
Culicidae). / Daniel Lobo Sousa. – Itapetinga, BA: UESB, 2021.
86fl.

Dissertação apresentada, como parte das exigências para a obtenção do título de MESTRE EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS, no Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências Ambientais da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - Área de concentração: Meio Ambiente e Desenvolvimento. Sob a orientação da Prof^ª. D. Sc. Janaina Silva de Freitas e coorientação da Prof^ª. D. Sc. Simone Andrade Gualberto e Prof^ª. D. Sc. Débora Cardoso da Silva.

1. *Croton tetradenius* – Repelente - *Aedes aegypti* L. 2. Óleos essenciais – Repelente botânico - *Aedes aegypti* L. 3. *Croton tetradenius* – Repelente – Característica química. I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Ambientais, *Campus* de Itapetinga. II. Freitas, Janaina Silva de. III. Gualberto, Simone Andrade. IV. 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. Caatinga
2. Repelente botânico - Compostos voláteis
3. Dengue

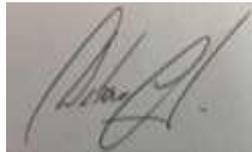
DANIEL LOBO SOUSA

“POTENCIAL REPELENTE DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *CROTON TETRADENIUS* (EUPHORBIACEAE) SOBRE *AEDES AEGYPTI* LINN. (DIPTERA: CULICIDAE)”.

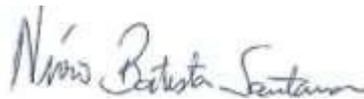
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, *Campus* de Itapetinga, BA. Área de Concentração: Meio Ambiente e Desenvolvimento.

Aprovada em: 07/06/2021

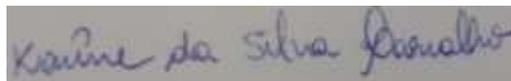
BANCA EXAMINADORA



Prof.ª Dr.ª Débora Cardoso da Silva (Coorientadora substituindo a Orientadora/UESB)



Prof. Dr. Nivio Batista Santana (UESB)



Prof.ª Dr.ª Karine da Silva Carvalho (FIOCRUZ)

SUMÁRIO

	Pagina
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 <i>Aedes aegypti</i> (Linnaeus 1762) (Diptera, Culicidae): Taxonomia, morfologia geral e ocorrência.....	3
2.1.1 Ciclo biológico e transmissão.....	6
2.1.2 Importância epidemiológica.....	9
2.1.3 Controle do mosquito.....	11
2.1.4 Prevenção contra picadas de mosquito.....	12
2.2 Óleos essenciais: potencial repelente e alternativa viável.....	16
2.2.1 Bioma Caatinga: espécies endêmicas e produção de metabólitos secundários.....	20
2.2.2 <i>Croton tetradenius</i> (Baillon, 1864) Euphorbiaceae.....	22
3. Capítulo 1 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA E POTENCIAL REPELENTE DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE <i>Croton tetradenius</i> (EUPHORBIACEAE) SOBRE <i>Aedes aegypti</i> (DIPTERA: CULICIDAE).....	25
3.1 Introdução.....	26
3.2 Material e métodos.....	27
3.2.1 Coleta e identificação do material botânico.....	27
3.2.2 Extração dos óleos essenciais.....	28
3.2.2.1 Análise cromatográfica do óleo essencial.....	28
3.2.3 Ensaio biológicos.....	29
3.2.3.1 Obtenção de fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> Linn.....	29
3.2.3.2 Avaliação do índice de atividade espacial.....	29
3.2.3.3 Estimativa da concentração repelente efetiva.....	31
3.2.3.4 Avaliação do tempo de proteção da concentração repelente efetiva.....	32
3.3 Resultados.....	34
3.4 Discussão.....	38
3.5 Conclusão.....	46

3.6 Agradecimentos.....	46
3.7 Referências.....	47
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53

LISTA DE FIGURAS

	Pagina
Figura 1 - Diferença morfológica das antenas de macho e fêmea de <i>Ae. aegypti</i>	3
Figura 2 - Olhos de <i>Ae. aegypti</i> com vários omatídeos.....	4
Figura 3 - Probóscide de <i>Ae. aegypti</i>	4
Figura 4 - Pernas do mosquito <i>Ae. aegypti</i> com manchas brancas.....	5
Figura 5 - Escamas branca em forma de lira na parte dorsal do mosquito <i>Ae. aegypti</i>	5
Figura 6 - Imagem ilustrativa do ciclo de vida de <i>Ae. aegypti</i>	6
Figura 7 - Visão geral de <i>C. tetradenius</i> e de sua folha, adaxial e abaxial.....	24

LISTA DE TABELA

	Pagina
Capítulo 1	
Tabela 1. Média do índice de atividade espacial, do óleo essencial obtido das folhas de <i>Croton tetradenius</i> , sobre fêmeas de <i>Aedes aegypti</i>	34
Tabela 2. Concentração efetiva 50 e 99% do óleo essencial obtido das folhas de <i>Croton tetradenius</i> sobre mosquitos fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> , com um minuto de exposição....	35
Tabela 3. Percentual acumulativo de repelência de fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> , em relação ao tempo de proteção, da concentração repelente efetiva do óleo essencial obtido de folhas de <i>Croton tetradenius</i>	36
Tabela 4. Percentual de mosquitos fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> que realizaram repasto sanguíneo, em relação ao tempo de proteção, da concentração repelente efetiva, do óleo essencial obtido de folhas de <i>Croton tetradenius</i>	36
Tabela 5. Composição química do óleo essencial obtido de folhas de <i>Croton tetradenius</i> e do controle positivo, óleo essencial de <i>Cymbopogon. nardus</i> , através da cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas.....	37

RESUMO

O mosquito *Aedes aegypti* além de ser um parasito intermitente causando incomodo a população é veiculador de arbovirozes, e neste sentido a utilização de repelentes é necessária. Atualmente o mais utilizado são os repelentes sintéticos, no entanto estudos demonstram que tem impactos negativos ao meio ambiente e ao homem. O óleo essencial de algumas plantas tem se mostrado como mais uma alternativa, devido a biocompatibilidade de seus compostos e dos diferentes potenciais bioativos que podem ter, entre eles, ação repelente. No presente trabalho, buscou-se avaliar o índice de atividade repelente do óleo essencial obtido de folhas de *Croton tetradenius* (Baillon, 1864), estimar uma concentração repelente efetiva e o seu tempo de proteção sobre fêmeas de *Aedes aegypti*, bem como, analisar a sua composição química. Para os ensaios biológicos, utilizou-se mosquitos com até sete dias de emergência, os quais, foram submetidos a diferentes concentrações do óleo essencial solubilizado em uma emulsão não iônica. A análise química foi realizada através da cromatografia gasosa, acoplada a espectrometria de massa e ao detector de ionização de chama. O óleo essencial apresentou índice de atividade espacial repelente, e as concentrações de 200 e 300 mg/cm² foram significativas. Para uma repelência efetiva de 50% e 99% obtiveram-se as concentrações estimadas de 14,1 mg/cm² e 163,4 mg/cm², respectivamente. Quanto ao tempo de proteção repelente, na concentração de 200 mg/cm², houve proteção de 84% contra pousos e 100% contra repasto sanguíneo por 240 minutos. A análise química revelou 33 compostos, sendo observado como compostos majoritários a cânfora (30,25%), p-cimeno (13,39), α -terpineno (10,59) e γ -terpineno (5,32). O óleo essencial oriundo de folhas de *Croton tetradenius* mostra-se um repelente alternativo promissor na proteção contra o mosquito *Aedes aegypti*.

Palavras-chave: Caatinga, repelente botânico, compostos voláteis, dengue

ABSTRACT

The *Aedes aegypti* mosquito, in addition to being an intermittent parasite that causes discomfort to the population, is a carrier of arboviruses and, in this sense, it is necessary to use repellents. Currently, the most used ones are synthetic repellants, but studies show that they have negative impacts on the environment and man. The essential oil of some plants has been shown to be another alternative, due to the biocompatibility of its compounds and the different bioactive potentials that may have, among them, repellent action. The present work aimed to evaluate the spatial activity index of the essential oil obtained from the leaves of *Cr. tetradenius*, to estimate an effective concentration of repellent and its protection time against female mosquitoes of *Ae. aegypti*, in addition to analyzing its chemical composition. For the biological assays, mosquitoes with up to seven days of emergence were used, which were subjected to different concentrations of the essential oil solubilized in a non-ionic emulsion. Chemical analysis was performed by gas chromatography, coupled with mass spectrometry and flame ionization detector. The essential oil presented spatial repellent activity, and indexes of 200 and 300 mg/cm² were significant. For an effective repellency of 50 and 99%, the estimated concentration was 14.1 mg/cm² and 163.4 mg/cm². As for the protection time of the repellent, at the concentration of 200 mg /cm², it was observed 84% protection against landings and 100% against blood suction for 240 minutes. The chemical analysis revealed 33 compounds, with camphor (30.25%), p-cymene (13.39%), α -terpinene (10.59%) and γ -terpinene (5.32%) the main components. The essential oil from leaves *Croton tetradenius* proved to be a promising alternative repellent for protection against the *Aedes aegypti* mosquito.

Keywords: Caatinga, botanical repellent, volatile compounds, dengue

1 INTRODUÇÃO

O mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) é um dos principais mosquitos de relevância sanitária no Brasil. Tal importância consistiu por ter sido o principal vetor em área urbana do vírus da febre amarela e atualmente dos vírus da dengue, chikungunya e Zika, os quais podem ocasionar enfermidades, problemas neurológicos e em alguns casos levar a óbito (DIVE 2019).

Estes vírus são transmitidos aos humanos pela ingestão de sangue por meio da picada de fêmeas infectadas de *Ae. aegypti*. O repasto sanguíneo é essencial para maturação dos ovos desta espécie. Para tal, as fêmeas usam uma série de combinações de pistas olfativas, visuais e térmicas para localizar seus hospedeiros (Consoli e Oliveira 1994, Van-Breugel et al. 2015, Gutiérrez-Bugallo et al. 2017).

O principal método de proteção é o controle populacional do vetor, que consiste principalmente pelo controle mecânico e na aplicação de produtos químicos sintéticos. Porém, não se tem alcançados resultados esperados, devido ao aumento de casos de infectados por estas arboviroses (França et al. 2017, DIVE 2019, Ministério da Saúde 2019, Ministério da Saúde 2020).

Nesse sentido, a proteção pessoal se faz pertinente e o uso de repelentes pode ser um método efetivo (Yoo et al. 2015, Laboissière, 2016). Entre os diferentes repelentes comerciais de uso tópico, os que possuem adição do princípio ativo sintético N,N-dietil-3-metilbenzamida-DEET são os mais eficazes (Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2017, Maciel 2018, Moore et al. 2018).

No entanto, estudos já demonstraram a insensibilidade de mosquitos a este princípio ativo, como também das suas propriedades neurotóxicas e cancerígenas, os quais têm apresentado riscos à saúde humana, como também ao meio ambiente, devido sua presença em águas residuais e naturais (Stanczyk et al. 2013, Legeay et al. 2016, Campos et al. 2016, Sgroi et al. 2017, Ma et al. 2017).

Pesquisas têm sido realizadas na busca de novas alternativas com ação repelente. Nesse sentido, têm sido avaliados produtos botânicos, como os óleos essenciais (Govindarajan et al. 2016a, Govindarajan et al. 2016b). Estas substâncias, além de apresentarem diferentes

bioatividades, como a ação repelente, a complexidades de seus compostos podem vir a retardar o processo adaptativo por mosquitos. Além disso, óleos essenciais têm se mostrado seletivos e com baixa toxicidade para mamíferos (Mdoe et al. 2014, Dhifi et al. 2016, Govindarajan et al. 2016b, Cruz et al. 2017).

À medida que o Brasil se destaca devido à sua rica biodiversidade florística, a investigação de repelentes à base de produtos botânicos se faz pertinente frente as suas biocompatibilidades (Silva et al. 2014, Royal et al. 2017), fomentando a sua importância e preservação dos diferentes biomas. Diante de tal cenário, a Caatinga se destaca quanto à composição florística, por apresentar produção de substâncias bioativas aliadas às irregularidades pluviométricas e por altas temperaturas, os quais são relacionados diretamente à produção de tais substâncias (MMA 2006, Castilho et al. 2016, Anjos et al. 2017).

Dentre as famílias botânicas do bioma caatinga destaca-se a Euphorbiaceae, em virtude do seu potencial na produção de compostos bioativos. O gênero *Croton* é o segundo maior nesta família e seus óleos essenciais possuem compostos com potencial para a repelência, os terpenóides (Morais et al. 2006, Cruz et al. 2017, Chellappandian et al., 2018). Dentre as espécies aromáticas endêmicas desse bioma com potenciais para ser avaliado quanto à atividade repelente, encontra-se *Croton tetradenius* (Baillon, 1864) (Carvalho et al. 2016, Anjos et al. 2018, Chellappandian et al., 2018).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o índice de atividade espacial do óleo essencial obtido de folhas de *Cr. tetradenius*, estimar uma concentração repelente efetiva e o seu tempo de proteção sobre mosquitos fêmeas de *Ae. aegypti*, bem como, analisar a sua composição química.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

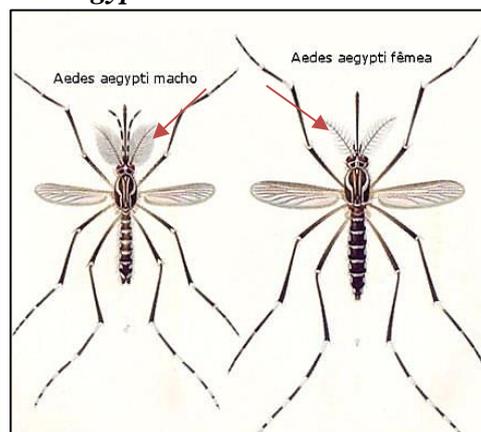
2.1 *Aedes aegypti* (Linnaeus 1762) (Diptera, Culicidae): Taxonomia, morfologia geral e ocorrência

O mosquito pertence ao filo Arthropoda, classe Insecta, ordem Diptera, família Culicidae, subfamília Culicinae, tribo Aedini, gênero *Aedes* e espécie *Aedes aegypti* (Linnaeus 1762). O corpo dos insetos é dividido em três tagmas: cabeça, tórax e abdômen (Consoli e Oliveira, 1994, Carpenter 2005, Valle et al. 2015).

A cabeça desse mosquito possui um formato esférico, e nela, encontram-se a maioria dos órgãos do sentido, como: um par de antenas, um par de olhos e uma probóscide (Forattini, 2002). A antena é responsável pelo sistema sensorial espacial do mosquito. Em sua estrutura possui células olfativas e quimiorreceptores, os quais são essenciais para a percepção e identificação de odores (Lorenz et al. 2018).

A antena também é dotada por plumas, cuja função é estabelecer uma área para captação de vibrações sonoras. Nos insetos machos, as antenas possuem maiores quantidades de plumas (**Figura 1**), o que permite detectar a longas distâncias as vibrações dos batimentos das asas dos insetos fêmeas. Essa estratégia é essencial para o sucesso reprodutivo dos mosquitos (Valle et al. 2015, Lorenz et al. 2018).

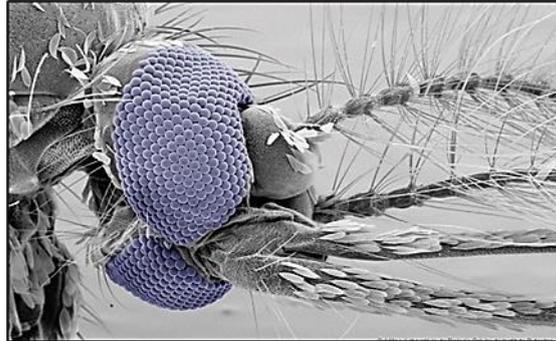
Figura 1 - Diferença morfológica das antenas de macho e fêmea de *Ae. aegypti*



Fonte: Adaptada de Pinheiro 2020.

Os olhos são do tipo composto e são constituídos por conjuntos de elementos ópticos denominados omatídeos, que podem variar em quantidades de 610 a 900 (**Figura 2**).

Figura 2 - Olhos de *Ae. aegypti* com vários omatídeos



Fonte: Lorenz et al. 2018.

Os olhos são responsáveis pela percepção visual do mosquito, auxiliando-o, no pouso, cópula, busca de criadouro e na procura de hospedeiro. Abaixo dos olhos está a probóscide, a qual é do tipo picador-sugador, (**Figura 3**) (Lorenz et al. 2018).

Figura 3 - Probóscide de *Ae. aegypti*



Fonte: Adaptada de Lorenz et al. 2018.

A probóscide possui diferentes partes anatômicas e é utilizada para perfuração de tegumentos, como também, para condução alimentar. No seu interior, encontra-se o canal salivar, onde passam substâncias anticoagulantes e anestésicas, as quais são secretadas pelas glândulas salivares. Tais substâncias são secretadas pelo inseto fêmea no ato da hematofagia. Ao redor da probóscide, na parte basal, encontra-se os palpos maxilares, sendo a função essencialmente sensorial (Consoli e Oliveira, 1994).

No tórax, encontram-se as estruturas para a locomoção, as asas e as pernas. O tórax é dividido em três partes: o protórax, mesotórax e o metatórax. Na região do mesotórax na parte dorsal, está um par de asas funcionais, e no metatórax um par de asas modificadas em halteres, cuja função é ajudar na orientação e no equilíbrio mediante o voo, bem como no

sucesso reprodutivo, visto que a cópula ocorre durante o voo (Consoli e Oliveira, 1994).

Na face ventral do tórax há três pares de pernas compridas e articuladas. As pernas são dotadas de manchas brancas em forma de listras (**figura 4**). Na parte ventral das patas possui presença de cílios e poros quimiorreceptores, essenciais para a percepção química de contato. Ainda no tórax, na parte dorsal, há um desenho de escamas brancas em forma de lira, o que caracteriza a espécie (**figura 5**). No abdômen situam-se, os órgãos excretor, digestivo e reprodutivo (Consoli e Oliveira, 1994).

Figura 4 – Pernas do mosquito *Ae. aegypti* com manchas brancas



Fonte: Adaptada de Freitas, 2017. Planeta invertebrados.

Figura 5 - Escamas branca em forma de lira na parte dorsal do mosquito *Ae. aegypti*



Fonte: Adaptada de Howell e Collins, 2018.

No que se refere a sua origem, acredita-se que o mosquito *Ae. aegypti* seja uma espécie de origem africana, que se originou a partir de uma linhagem ancestral de hábito silvestre. A sua ocorrência em outros continentes, provavelmente iniciou a partir de espécimes presentes no interior de navios durante as jornadas marítimas pelo homem. Assim, além do continente africano o inseto está presente nas regiões tropicais e subtropicais da Oceania, Ásia, Europa e

nas Américas (Powell e Tabachnick 2013, Suter et al. 2017, Ragonha 2018, DIVE 2019).

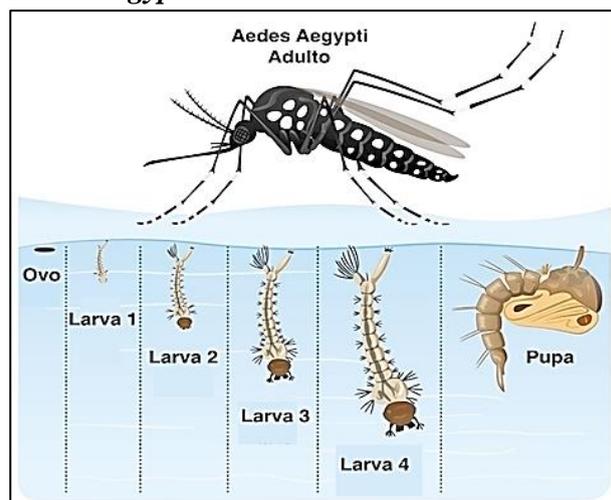
A presença da espécie no Brasil ocorreu na época colonial através de embarcações que aportavam no continente Sul Americano para o tráfico de escravos (Valle et al. 2015). Apesar dessa espécie ser oriunda de uma linhagem de hábito silvestre, não se sabe ao certo, quando o *Ae. aegypti* desenvolveu o hábito antrópico, ou seja, não se sabe se essa característica adaptativa foi desenvolvida na África antes da dispersão, ou se foi durante as navegações marítimas ou concomitante à colonização (Bennett, et al. 2016).

Sendo assim, no Brasil, o mosquito *Ae. aegypti* é dificilmente visto em áreas florestais; e sim, em pequenos povoados e em grandes cidades. É nesses lugares que o mosquito procura abrigos e condições ideais para o seu ciclo reprodutivo, que podem acontecer próximos dos domicílios e peridomicílios (Valle et al. 2015, Custódio 2019).

2.1.1 Ciclo biológico e transmissão

O ciclo de vida do *Ae. aegypti* é do tipo holometabólico e ocorre em dois ambientes: uma aquática, que corresponde a fase de ovo, quatro estágios larvais e pupa. E outra terrestre, que se caracteriza pela emergência do mosquito adulto (**Figura 6**) (Ragonha, 2018, Felix e Werneck, 2018).

Figura 6 - Imagem ilustrativa do ciclo de vida de *Ae. aegypti*



Fonte: Saúde 2016.

O ciclo aquático dessa espécie inicia quando as fêmeas ovipositam próximos ao nível d'água. De hábito antropofílico a fêmea tem predileção em ovipositar em recipientes artificiais encontrados nas zonas urbanas como, pneus, garrafas, entulhos de construções,

sucatas em pátios e ferro velhos (Powell 2016, Jaseem et al. 2016). Os ovos dessa espécie necessitam da umidade para que ocorra o desenvolvimento embrionário larval. Uma vez completo, os ovos necessitam da submersão em água para a eclosão das larvas. Caso não haja essa condição, os ovos podem proteger as larvas e torná-las viáveis por longos períodos, até que as condições sejam favoráveis para tal finalidade (Faull e Williams 2015).

Diferente da fase de ovo, as larvas estão sujeitas às condições presentes no criadouro, desde as influências climáticas e da disponibilidade de alimentos. As larvas se desenvolvem no criadouro alimentando-se de detritos orgânicos presente na água. Tal recurso permite que as larvas alcancem seus estágios, os quais compreendem em, larva um, dois, três e quatro. Quando as larvas atingem o quarto estágio, ocorre uma metamorfose, dando início ao estágio de pupa, (**Figura 6**) (Valle et al. 2015).

Nutridas durante a fase de larva, a fase de pupa se dedica na formação do inseto adulto. Apesar de poderem locomover aos fundos dos criadouros as pupas ficam mais tempo imóveis na superfície d'água para o desenvolvimento e a emergência do inseto. Os adultos emergem de modo lento e conseguem permanecer na superfície da água devido à tensão superficial (DIVE 2019).

Após esse período, o mosquito poderá levantar vôo e alimentar-se de néctar, o qual é indispensável para o seu metabolismo, como também, copular. A ingestão de sangue está principalmente relacionada à maturação dos ovos (Consoli e Oliveira 1994, Valle et al. 2015). Após a ingestão de sangue o tempo de maturação dos ovos pelos mosquitos e a realização da oviposição, varia de acordo com a espécie. No caso do *Ae. aegypti* o tempo de maturação pode acontecer em até três dias, e após esse período, o mosquito poderá escolher o criadouro para ovipositar, dando início a um novo ciclo (Consoli e Oliveira 1994).

A cada final do ciclo de oviposição os mosquitos fêmeas do *Ae. aegypti* estarão aptas a realizar novas ingestões de sangue (Valle et al. 2015). Esta espécie possui hábito diurno e as fêmeas alimentam-se de sangue preferencialmente pelas primeiras horas ao amanhecer e ao entardecer. Mas, caso seja oportuno, o mosquito também poderá realizar a ingestão de sangue à noite (Valle et al. 2015, Lorenz et al. 2018).

Para localizar os hospedeiros os mosquitos usam uma serie de combinações de pistas olfativas, visuais e térmicas. Apesar da percepção visual e térmica ser importantes para detectar o hospedeiro, é o olfato, o principal mecanismo que é estimulado para tal finalidade. Isto porque, o sistema olfativo dos mosquitos consegue determinar entre dez a cinquenta metros se existe algum hospedeiro no ambiente. Assim, o hospedeiro é rastreado por meio da

liberação de seus componentes químicos, bem como a partir da respiração e estabilização da temperatura corporal (Van-Breugel et al. 2015, Lorenz et al. 2018).

O dióxido de carbono (CO₂) é o principal componente químico expelido no processo da respiração e detectado pelos mosquitos. Esse componente pode ser exalado em quantidades maiores em hospedeiros: adultos, gestantes, obesos ou durante um esforço físico. Caso o esforço físico seja prologando o mosquito também poderá localizar o hospedeiro através do ácido láctico, o qual é emitido pelo suor. Esse componente, também pode ser expelido em maiores concentrações dependendo da ingestão de determinados alimentos com alto teor de cloreto de sódio ou de potássio (Lorenz et al. 2018).

Outro componente identificado pelos mosquitos que também é encontrado no suor é a sulcatona, que é expelido pela pele. Esse componente encontra-se em grandes quantidades nos humanos. Tamanha quantidade somada a mudanças adaptativas nos receptores odoríferos de mosquitos antropofílicos, pode ter influenciado a distinguir o ser humano de outros animais a partir do reconhecimento desse componente (Mcbride et al. 2014).

Além dos odores, determinados comprimentos de ondas luminosas captadas pelo campo visual dos mosquitos, também influenciam na atração. A percepção visual é constante, pois auxiliam os mosquitos durante o vôo na busca do criadouro ou de hospedeiro, na aterrissagem e no acasalamento (Van-Breugel et al. 2015, Lorenz et al. 2018).

Os mosquitos podem identificar e serem atraídos por diferentes comprimentos de ondas luminosas como, o amarelo, preto, verde e o ultravioleta. No caso dos mosquitos do gênero *Aedes*, sabe-se que possuem uma predileção por cores escuras. Acredita-se que os mosquitos desse gênero são atraídos por esse tipo de cor por não emitir uma alta reflexão e por servirem de abrigos e camuflagem (Lorenz et al. 2018). Como os mosquitos também são atraídos pela emissão de calor, cores escuras também se tornam atrativas nesse sentido, devido a sua maior capacidade de reter calor. Assim, no caso dos humanos, dependendo da cor da vestimenta, pode torná-los mais atrativos (Lorenz et al. 2018).

O mosquito *Ae. aegypti* pode alimentar-se de sangue de diferentes tipos de hospedeiros, principalmente aqueles que se encontram perto de seus criadouros e abrigos. Embora exista essa diversificação, são os humanos as principais fontes sanguíneas procuradas (Valle et al. 2015, Jasem et al. 2016). Mas, além desta predileção, possui também por aqueles que possuem o tipo sanguíneo O. Apesar de o sangue ser essencial para a maturação dos ovos para essa espécie a predileção pelo tipo sanguíneo não influencia em uma maior quantidade de ovos. No entanto, acredita-se que essa preferência, tenha outros benefícios para o mosquito, como o aumento da sua longevidade (Prasadini et al. 2019).

Por ser um inseto hematófago, o mosquito *Ae. aegypti* está susceptível a adquirir de seus hospedeiros determinados agentes virais, caso o mesmo, esteja infectado. Se o hospedeiro se encontra em estado de viremia, pelo vírus da dengue, por exemplo, o vírus poderá ser inoculado, se multiplicar e infectar células primária e secundária do mosquito, entre elas as glândulas salivares. Ao se multiplicar nas glândulas salivares o vírus poderá ser transmitido para outro hospedeiro quando o mosquito realizar um novo repasto sanguíneo (Carrington e Simmons 2014, Gutiérrez-Bugallo et al, 2017).

Uma vez que o mosquito se contamina através do repasto sanguíneo virulento, permanecerá infectante enquanto viver. As fêmeas dessa espécie são capazes de realizar várias ingestões de sangue de diferentes hospedeiros durante um único ciclo gonadotrófico, o que aumenta a possibilidade de se infectar e de transmitir agentes virais, como também, para sua prole (DIVE 2015, Gutiérrez-Bugallo et al. 2017).

2.1.2 Importância epidemiológica

O mosquito *Ae. aegypti* é considerado um dos principais mosquitos de relevância epidemiológica no Brasil, por ter sido o principal vetor em área urbana do vírus da febre amarela (FA), e atualmente, por ser o principal transmissor em área urbana dos vírus da dengue (DEN), chikungunya (CHIK) e zika (DIVE 2019, Ministério da Saúde 2020).

O mosquito foi identificado como vetor da FA em 1900. Na época, o declínio significativo do vetor e conseqüentemente da circulação do vírus ocorreu com o intenso controle do mosquito e da imunização das pessoas com o desenvolvimento de uma vacina, em 1937. Nesse sentido, no Brasil, o último registro do *Ae. aegypti* e do vírus da FA em área urbana, foi em 1942 no estado do Acre, na cidade de Sena Madureira (Ministério da Saúde 2018).

Atualmente no Brasil o vírus da FA ainda se faz presente, mas, em áreas florestais com ciclo entre primatas e mosquitos de hábitos silvestre, principalmente dos gêneros *Haemagogus* e *Sabethes*. Porém, o risco do vírus da FA voltar a circular em ambiente urbano é constante devido ao aumento e expansão do vírus silvestre em lugares onde predomina o *Ae. aegypti* o seu principal vetor do ciclo urbano entre os séculos XVIII e meados do século XX na América do Sul (Waldman e Sato 2016, Ministério da Saúde 2018).

É relevante ressaltar que a manifestação patológica pelo vírus da FA não difere de onde ocorreu a transmissão, se urbana ou silvestre. A manifestação patológica da FA pode ser acompanhada por dores de cabeça, dores musculares, calafrios, náuseas e vômitos. O avanço

para formas mais séria pode lesar o fígado e os rins, provocando eventos hemorrágicos, cansaço, pele e olhos com tom amarelados e febre, o que caracteriza o nome da infecção (WHO 2020).

O mosquito *Ae. aegypti* como vetor dos vírus da DEN é recorrente desde 1981 no estado de Roraima devido a uma nova infestação do vetor em áreas urbanas. Em 1994 ocorreu a dispersão da DEN para outros estados brasileiros, e hoje, o vírus está presente em todas as unidades federativas do país (Schneider et al. 2001, Feres et al, 2006, Ministerio da Saúde 2020).

No Brasil circulam-se quatro sorotipos do vírus, o DENV1, DENV2, DENV3 e DENV4, os quais podem ocasionar febre, náusea, vômitos, áreas avermelhadas na pele, dor abdominal intensa, vômitos persistentes e sangramento de mucosa. Em casos graves a infecção pode causar sangramento do sistema nervoso central, comprometendo mudança no sistema nervoso e órgãos (DIVE 2019).

Em 2014, o Brasil registra o vírus CHIK como um novo agente etiológico no país com casos de transmissão envolvendo o *Ae. aegypti*. Acredita-se que a presença do vírus em território brasileiro, tenha ocorrido devido a uma epidemia em 2013 na região do Caribe (Honório et al. 2015). O vírus tem ocasionado enfermidades acompanhadas por febre, dor articular intensa e debilitante, cefaleia e mialgia. Embora os sintomas possuam semelhanças ao da DEN e do Zika, destaca-se a poliartrite/artralgia, atingindo especialmente, os cotovelos, punhos e tornozelos (DIVE 2019).

A infecção pelo vírus Zika pode ocasionar, áreas vermelhas na pele ou lesões, febre, articulações doloridas, conjuntivite, dores de cabeça e musculares (Zanluca et al. 2015). Não o bastante, a infecção pelo vírus Zika durante a gestação pode ocasionar má formação congênita em crianças como, a microcefalia (Ministério da Saúde 2017). A microcefalia é resultado de uma má formação congênita do encéfalo de recém-nascidos. Como consequência, a criança pode desenvolver durante o seu crescimento, déficit no aprendizado, eventos de convulsões, movimentos físicos limitados, problemas de audição e na visão (Zanluca et al. 2015, Félix e Farias 2019).

Em 2016 a infecção pelo vírus Zika tornou-se uma emergência em saúde pública decretada pela Organização Mundial da Saúde, devido à relação de casos da síndrome de Guillain-Barré, uma infecção autoimune atingindo o sistema nervoso periférico e de microcefalia em 2015 no Brasil e após casos parecidos em 2014 no território da Polinésia Francesa (Zanluca et al. 2015, Vasconcelos 2015, Sahuquillo, 2016).

No Brasil, entre os registros dos vírus transmitido pelo *Ae. aegypti* citados, o vírus da DEN é o que mais cresce por ano (Ministério da Saúde 2019). Diferente da FA, ainda não existe vacinas antivirais eficazes e disponíveis contra os vírus, CHIK, Zika e para os quatro sorotipos da DEN (WHO 2017, Thisyakorn e Thisyakorn, 2014, Lin et al. 2018). Para evitar tais arboviroses, o governo brasileiro então decidiu investir em programas vetoriais para o controle populacional do vetor e da utilização de repelentes de uso tópico para reforçar a proteção contra o vetor *Ae. aegypti* (Ministério da Saúde 2018, DIVE 2019).

2.1.3 Controle do mosquito

No Brasil, o controle populacional do *Ae. aegypti* iniciou a partir do século XX, pois na época, a meta era controlar a transmissão do vírus da FA urbana que vinha ocasionando milhares de mortes. A forma de controle do vetor era realizada pela remoção dos criadouros nas áreas urbanas e aplicação de inseticidas. Ambas as estratégias levaram a erradicação do *Ae. aegypti* por duas vezes, entre os anos de 1958 a 1973 (Maciel et al. 2008, Costa et al. 2011).

Após os esforços de erradicar o vetor *Ae. aegypti* é visto-o novamente em área urbana em 1981 no estado de Roraima, ocasionando uma nova epidemia, mas não pela FA e sim de DEN, pelos sorotipos DENV-1 e DENV-4. No entanto, a epidemia somente ganhou repercussão no país entre os anos de 1986 e 1987, devido a introdução e do risco de dispersão do sorotipo DENV-1 no estado do Rio de Janeiro, considerada a segunda maior metrópole do país. No mesmo estado, em 1990, registrou-se um novo sorotipo da DEN, o DEN-2. A dispersão para outros estados brasileiros ocorreu em 1994 (Schneider et al. 2001, Teixeira et al. 2009, Dick et al. 2012).

Com o objetivo de eliminar os casos de DEN no país, em 1996, o governo decidiu erradicar o principal vetor do vírus, implementando o Plano de Erradicação do *Ae. aegypti* (PEAa). O plano tinha como meta atuar em todos os municípios com objetivo de diminuir o número populacional do vetor até 1998. Mas, essa meta não foi atingida (Carmo et al. 2015).

Devido a esse fator, o governo lança um novo programa e dedica-se no controle populacional do mosquito a partir da implementação do Plano de Intensificação das Ações de Controle da Dengue (PIACD). O plano tinha como objetivo principal atuar em municípios com maiores índices de casos de DEN por meio de larvicidas e adulticidas (Carmo et al. 2015). Mas, com a introdução do sorotipo DENV-3 no Rio de Janeiro e posteriormente, uma epidemia pelo mesmo sorotipo em várias regiões brasileiras, o PIACD foi reformulado, e em

2002, é implementado o Plano Nacional de Controle da Dengue (PNCD). Esse plano tinha como objetivo atuar em todo território brasileiro, através de métodos que se adequassem a cada necessidade e realidade de cada local (Ministério da Saúde 2002).

O plano, o qual ainda está em vigor, é executado pelas três esferas do governo, visando controlar o índice de transmissão da dengue a partir do seu principal vetor *Ae. aegypti*, assim como, de outros vírus transmitido pelo vetor. Entre as principais medidas de controle da infestação do vetor adotado nesse plano estão, o controle mecânico, químico e biológico (Ministério da Saúde 2002, Costa et al. 2018).

O controle mecânico consiste na ação por intermédio dos profissionais de saúde, como também, da população local, em eliminar qualquer reservatório que acumule água e favoreça o ciclo reprodutivo do *Ae. aegypti*. O controle químico consiste principalmente na aplicação de produtos químicos sintético na água e na parede de reservatórios para combater a fase larval, ou de forma aeroespacial para o mosquito adulto. E o controle biológico consiste na utilização de organismos naturais específicos, os quais podem ser predadores larvófagos, parasitas ou patógenos (DIVE 2019).

Apesar desses métodos serem utilizados no controle do *Ae. aegypti*, até os dias atuais não se tem alcançado resultados efetivos, o que se observa nesse sentido, o aumento de casos prováveis de infectados por vírus transmitido pelo vetor. No Brasil, em 2018, foram registrados 265.934 casos prováveis de dengue, 87.687 casos prováveis de Chikungunya e 8.680 casos prováveis de doença pelo vírus Zika. Em 2019, foram registrados 1.544,987 casos prováveis de dengue, 132.205 casos prováveis de Chikungunya e 10.768 casos prováveis de Zika no país. Nesse cenário epidemiológico, a integração da proteção pessoal se faz pertinente (Laboissière 2016, Ministério da Saúde 2019, Ministério da Saúde 2020).

2.1.4 Prevenção contra picadas de mosquito

O termo prevenção vem do verbo 'prevenir' e tem o significado de planejar algo antecipadamente, visando prevenir-se, de um mal (Ferreira 1987). Na área da saúde, prevenção significa realizar uma ação antecipada, tendo o conhecimento da história natural, como base, para tornar improvável o progresso posterior de uma doença (Leavell e Clarck 1976).

Nesse sentido, em vista das possíveis transmissões e principalmente da associação do vírus Zika com a microcefalia em recém-nascido, o governo brasileiro pelo decreto da Lei do número 8.716, em 20 de abril de 2016 instituiu o programa de Prevenção e Proteção Individual de Gestantes em Situação de Vulnerabilidade Socioeconômica contra o vetor *Ae.*

aegypti. O programa foi desenvolvido para implementar e executar ações direcionadas para distribuição de repelentes de uso tópico para mulheres grávidas vinculadas ao programa Bolsa Família (Laboissière 2016).

Em 2018, o Ministério da Saúde com apoio das secretarias de saúde dos estados e dos municípios decidem ampliar o público alvo para a distribuição de repelentes. Assim, além das gestantes vinculadas ao programa Bolsa Família, pessoas que se encontravam em área com alto índice de circulação da DEN, CHIK e Zika, por exemplo, também tiveram direito de solicitar repelente de uso tópico para proteção pessoal contra possíveis transmissões pelo *Ae. aegypti* (Maciel 2018).

Embora o Ministério da Saúde tem o uso de repelentes tópico como medida de proteção pessoal, vale ressaltar, que este não é o único, pois outros métodos são utilizados para evitar picadas de mosquito. Entre os métodos encontra-se os de barreira física, o qual faz uso principalmente de mosquiteiros e de telas em portas e janelas. Além destes, o uso de produtos repelentes para ambientes também é utilizado, os quais são comercializados em forma sólida e líquida, sendo este segundo utilizado em aparelho elétrico (Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2017).

Os produtos repelentes no Brasil são regulamentados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária-ANVISA, que tem como objetivo institucional garantir a saúde da população a partir do controle sanitário das produções e dos consumos de produtos e serviços. Segundo a ANVISA, além dos repelentes tópicos, os métodos de proteção com barreiras físicas e a liberação de substâncias químicas repelentes de ambientes, também, são classificadas como formas de proteção a picadas de insetos (BRASIL 1999, Agência Nacional De Vigilância Sanitária 2017).

O uso de telas e de substâncias repelentes utilizados em aparelhos elétricos é indicado para proteção diurna e noturna de adultos e crianças no interior de residências. A utilização de mosquiteiro é indicada principalmente para crianças com pouca mobilidade ou com menos de dois anos de idade, uma vez que não é recomendado o uso de repelentes sobre a pele (Paumgarten e Delgado 2016, WHO 2012, Stefani et al. 2009).

Vale ressaltar, que em ambientes com muitos mosquitos esses métodos são utilizados como auxiliares aos repelentes de uso tópico, pois a proteção do indivíduo só é efetuada, caso estejam no mesmo âmbito com tais recursos. Desse modo, os repelentes de uso tópico são mais indicados, pois além de promoverem proteção a toda área da pele exposta, a ação protetora é efetiva independentemente do ambiente que o indivíduo esteja (Paumgarten e Delgado 2016, WHO 2012, Stefani et al. 2009).

No Brasil, os repelentes de uso tópico aprovados pela ANVISA têm como base os princípios ativos sintéticos, IR3535 (Nome IUPAC: Ethyl 3-[acetil (butil) amino]-propanoato), picaridina (Nome IUPAC: ácido 1-piperidinocarboxílico 2- (2-hidroxiethyl) -1-metilpropiléster), e o DEET (Nome IUPAC: N,N-dietil-3-metilbenzamida (Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2017)).

Os repelentes de uso tópico aprovados pela ANVISA têm como base os princípios ativos sintéticos por promover maior tempo de proteção contra picadas de insetos. Os atuais repelentes sintéticos tiveram contribuições por intensas pesquisas por parte das Forças Armadas durante o advento da Segunda Guerra Mundial (Debboun et al. 2006, Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2017). Antes da Segunda Guerra Mundial havia quatro tipos principais de repelentes: um de origem botânica, o óleo essencial de citronela e três sintéticos: o ftalato de dimetilo, descoberto em 1929; o Indalone, patenteado em 1937 e Rutgers 612, que se tornou disponível em 1939 (Peterson e Coats 2001).

No início da Segunda Guerra Mundial, os últimos três componentes foram formulados para uso militar e ficou conhecido como 6-2-2. Outras formulações também foram realizadas durante a segunda guerra, mas nenhuma alcançou resultados esperados. No entanto, em 1953, foi descoberto o N,N-dietil-3-metilbenzamida-DEET, o qual foi considerado o melhor repelente na época e foi liberado para uso comercial em 1956 (Peterson e Coats 2001, Roy et al. 2017).

Mesmo com os resultados significativos, novos compostos foram avaliados, porém, nenhum obteve sucesso comercial quando comparado ao DEET (Peterson e Coats 2001, Moore et al. 2018). Dentro desse contexto, um estudo que avaliou a eficácia de diferentes repelentes comerciais sobre o vetor *Ae. aegypti*, acrescido com diferentes princípios ativos, constataram que as formulações contendo o DEET foi o mais eficaz (Uc-Puc et al. 2016).

O DEET é comercializado em diferentes formulações farmacêuticas como em, emulsões, loções e aerossóis (Webb e Hess 2016, Roy e Pal 2017). No Brasil, segundo o Ministério da Saúde, estipula-se que crianças entre dois a doze anos de idade, devem fazer uso de repelentes contendo esse princípio ativo nas concentrações de até 10%. Maiores concentrações são permitidas para idades superiores (Ministério da Saúde, 2015).

Apesar da eficácia do DEET, estudos têm demonstrado indicativos de resistência de alguns mosquitos a sua repelência, entre eles, o vetor *Ae. aegypti*. O estudo realizado por Stanczyk et al (2013), ao investigarem o efeito da pré-exposição do DEET em *Ae. aegypti*, constataram que, três horas após a exposição, os mosquitos mostraram insensibilidade ao

repelente. Além disso, estudos têm alertado dos perigos do seu uso para o meio ambiente (Roy et al. 2017).

O meio ambiente é susceptível a todo o momento à contaminação de produtos sintéticos emergentes, principalmente produtos de uso pessoal, incluindo os repelentes, os quais contêm substâncias que podem causar danos agudos ou crônicos à saúde (Quantin et al. 2015, Roy et al. 2017).

A presença do DEET em diferentes lugares no meio ambiente é principalmente atribuída à liberação de efluentes de águas residuais contaminada com tal produto. Pessoas que utilizam repelentes contendo esse princípio ativo contribuem para essa contaminação, isto porque, durante o banho, o produto é removido e percolado para rede de esgoto (Merel e Snyder et al. 2016).

Como o DEET não é totalmente removido pelo convencional tratamento de água é descartado parcialmente com outros efluentes residuais. Além disso, o lodo proveniente das águas residuais, uma vez contaminado com DEET, pode contaminar outros compartimentos ambientais, quando for despejado sobre solos agrícolas ou em aterros sanitários (Benotti et al. 2009, Hyland et al. 2012, Chari e Halden 2012, Padhye et al. 2014).

Nesse contexto, pesquisas têm confirmado a presença do DEET em água residuais na Europa (Sgroi et al. 2017), Ásia (Anumol et al. 2016), em águas subterrânea na África (Sorensen et al. 2015) e em águas superficiais na América do Sul (De Gerónimo et al. 2014). A presença do DEET em águas naturais tem despertado a realização de pesquisas laboratoriais a fim de investigar qual seria o seu efeito em espécies não-alvo. Alguns resultados demonstraram que este composto apresentou toxicidade para diferentes organismos aquáticos, como para peixes, anfíbios, crustácios, algas e entre outros (Campos et al. 2016, Martine et al. 2016, Gao et al. 2020).

Vale ressaltar que a presença do DEET em águas subterrâneas e superficiais desencadeia outra preocupação, pois estas, também representam vias para a exposição humana. Segundo o Banco de Dados de Propriedades de Pesticidas (PPDB), o DEET pode ocasionar; irritação na pele, irritação nas vias respiratórias e nos olhos. Além disso, pode ocasionar efeitos neurotóxicos e possivelmente comprometer o desenvolvimento humano (IUPAC 2016).

Mediante ao que foi exposto, a busca por repelentes alternativos ao DEET que seja seletivo, que proporcione menor risco ao meio ambiente, a saúde humana e que retarde a resistência de mosquitos aos seus compostos são relevantes. Dentro desse contexto, repelentes

a partir de produtos botânicos apresentam-se promissor (Govindarajan et al. 2016b, Pavela e Benelli 2016b).

2.2 Óleos essenciais: potencial repelente e alternativa viável

A utilização de plantas como repelentes data desde o século V a.C por diferentes civilizações. Plantas maceradas, queima de plantas e uso de óleos vegetais sobre roupas ou pele são uns dos métodos que eram utilizados. Vale ressaltar, que o uso desses recursos ainda é utilizado por comunidades tradicionais (Moore e Lenglet. 2006, Blanco e Roberts 1992, Owen 1805, Pavela e Benelli 2016a).

A busca por repelentes alternativos a partir de produtos botânicos baseia-se na capacidade que espécies vegetais aromáticas têm de sintetizar substâncias secundárias com potencial bioativo para a manutenção de sua própria sobrevivência. Dentre as bioatividades, podem incluir: fungicida, inseticida, dissuasão alimentar, atração de polinizadores e repelência de insetos herbívoros. Entre as substâncias secundárias passivas de serem exploradas com potenciais repelentes, encontram-se os óleos essenciais (Dhifi et al. 2016, Chellappandian et al. 2018, Onoabedje et al. 2019, Hamid et al. 2020).

Embora outras substâncias vegetais também possam apresentar diferentes propriedades, pesquisas voltadas com óleos essenciais se destacam, pois fornecem um potencial subexplorado na busca de novos produtos contra insetos, o qual pode estar relacionado na quantidade e variedades de seus compostos bioativos (Choochote et al. 2005, Senthil 2015, Govindarajan et al. 2018).

Óleos essenciais são substâncias orgânicas e podem ser encontrados em diferentes partes da planta, como nas flores, folhas, sementes, caules e até mesmo em raízes (Dhifi et al. 2016). Mas, conforme descrito por Tyagi (2016), é nas folhas que geralmente as plantas biossintetizam essa substância, quando estas, são comumente atacadas por insetos herbívoros.

A capacidade de determinadas plantas biossintetizarem óleos essenciais com propriedades repelentes contra insetos herbívoros têm suscitado a nível científico, hipóteses de que, tais substâncias quando extraídas, também pudessem possuir tal atividade contra os insetos hematófagos (Medeiros 2014).

De fato, estudos tem comprovado o potencial repelente de alguns óleos essenciais contra estes tipos de insetos, como os conhecidos óleos de citronela, andiroba e cravo (Paumgarten e Delgado 2016, Lee 2018). E nesse sentido, novas pesquisas que buscam um

repelente alternativo e ecologicamente viável tem avaliado diferentes espécies botânicas produtoras de óleos essenciais (Govindarajan et al. 2016a, Govindarajan et al. 2016b).

Há associação de óleos essenciais como alternativas naturais e mais seguras comparado ao DEET. Isso parte do princípio de que alguns óleos essenciais usados para repelir insetos, também são utilizados como aromatizantes de alimentos ou para indústria de perfumes, como também em cosméticos e para fins medicinais. Além disso, óleos essenciais tem demonstrado maiores seletividade (Lee 2018).

Um exemplo da seletividade de óleos essenciais, encontra-se no estudo realizado por Govindarajan et al. (2016b), que ao avaliarem o potencial ovicida, larvicida, adulticida e repelência do óleo essencial de *Origanum scabrum* (Boiss. & Heldr, 1846) sobre *Culex quinquefasciatus* (Say, 1823), *Culex tritaeniorhynchus* (Giles, 1901) *Ae. aegypti*, *Anopheles subpictus* (Grassi, 1899) e a sua biotoxicidade sobre três organismos não-alvo, o peixe *Gambusia affinis* (Baird & Girard, 1853), os insetos *Diplonychus indicus* (Fabricius, 1871) e *Anisops bouvieri* (Kirkaldy, 1904), constataram toxicidade sobre as diferentes fases dos mosquitos, bem como a ação repelente, mas não constatou-se toxicidade sobre os organismos não alvos.

A ação repelente possui diferentes definições. Dentre elas, encontra-se que repelente é um produto químico que ao ser aplicado sobre uma superfície produz vapor com odor repulsivo para insetos (Blackwell et al. 2003, PHARMA 2014, Dennis et al. 2019). Os óleos essenciais são substâncias altamente voláteis, os quais podem ser utilizados com este mesmo objetivo na proteção contra insetos hematófagos (Paumgartten e Delgado 2016).

No entanto, devido à rápida volatilização dos óleos essenciais, repelentes tendo-os apenas como base, não possuem aprovação pela ANVISA por oferecerem menor tempo de proteção quando comparado à outras substâncias de origem sintética. Também, têm em vista quaisquer outros produtos, como velas, incensos e outros odorizantes de ambientes. Assim, repelentes que atualmente contenham óleos essenciais como componentes, possuem sempre outra substância como princípio ativo já regularizado (Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2017).

Embora haja uma definição que atribua aos repelentes simplesmente a capacidade de exercer uma ação sobre o sistema olfativo de insetos (PHARMA 2014) é pertinente ressaltar, que estudos de revisão de literatura sobre eletrofisiologia e comportamento do modo de ação repelente sobre insetos, demonstraram, que o real mecanismo fisiológico da ação não é conclusivo (Dickens e Bohbot 2013, Degennaro 2015, Dennis et al. 2019).

Sabe-se que, apesar dos mosquitos não se aproximarem de uma superfície tratada com o DEET, também foi verificado que alguns mosquitos só foram repelidos após entrarem em contato com o repelente e sem realizar alimentação sanguínea. Tal mecanismo é denominado de quimior-repelência de contato (Dickens e Bohbot 2013, Degennaro 2015, Dennis et al. 2019).

Embora o real mecanismo fisiológico da ação repelente sobre insetos não seja conclusivo, os resultados comportamentais quando submetidos às substâncias com potenciais repelentes são pertinentes. Dessa forma, outros parâmetros podem ser avaliados em novas pesquisas com repelentes. Principalmente os conduzidos com produtos vegetais, os quais podem apresentar diferentes propriedades bioativas (Taiz e Zeiger 2004, Schoonhoven et al. 2005, Slam et al. 2017, Dhifi et al. 2016, Onoabedje et al. 2019).

Nesse contexto, vale ressaltar que não se deve descartar a possibilidade de compostos orgânicos voláteis de apresentarem também, potencial repelente por contato. Para tal propriedade produtos botânicos possuem, pois na natureza plantas podem produzir substâncias pouco palatáveis e tóxicas contra insetos herbívoros (Taiz e Zeiger 2004, Schoonhoven et al. 2005, Dhifi et al. 2016). Tal ação pode agregar aos óleos essenciais não somente a sua capacidade de proteção em evitar pousos de mosquitos, mas também, evitar uma alimentação sanguínea. Principalmente por mosquitos vetores, pois este fator é determinante para a transmissão de arbovírus como, a DEN, CHIK e Zika (Carrington e Simmons 2014, Gutiérrez-Bugallo et al. 2017).

Vale mencionar ainda, que este método já vem sendo realizada por pesquisas, cujo objetivo é investigar o potencial repelente de novos óleos essenciais. Como exemplo, encontra-se o estudo realizado por Govindarajan et al (2016b), que ao avaliarem o potencial repelente do óleo essencial de *Origanum scabrum* (Boiss. & Heldr, 1846) sobre diferentes mosquitos, entre eles o vetor *Ae. aegypti*, estabeleceram como critério de proteção o tempo necessário para evitar a alimentação sanguínea. No que se refere aos resultados, o óleo essencial ofereceu 100% de proteção contra todos os mosquitos, por uma hora.

Dentro do que foi exposto sobre os mecanismos fisiológicos e comportamentais da ação repelente sobre insetos, tais mecanismos corroboram com a definição já estabelecida em 2003 proposta por Blackwell et al, os quais definiram que repelente é uma substância capaz de desencorajar insetos de pousarem ou de picarem a pele humana ou de um animal.

Embora à alta volatilização de óleos essenciais seja visto como um empecilho na produção de produtos repelentes 100% natural vale ressaltar, que já existem métodos que podem promover uma ação prolongada. Alguns dos métodos incluem formulações à base de

cremes e de polímeros, além de óleos vegetais como, o óleo de coco e o óleo de mostarda (Das et al. 2003, Sritabutra e Soonwera 2013, Misni et al. 2017, Tavares et al. 2018).

Apesar dos relevantes resultados encontrados na literatura da ação repelente de óleos essenciais sobre insetos de importância epidemiológica é pertinente a busca por novos repelentes à base de plantas devido à biocompatibilidade de seus produtos, conforme ressalta Royal et al. (2017). Além disto, diferentes espécies de insetos podem reagir de modo diferente a um mesmo repelente. Além do mais, a proteção de um repelente, não atua da mesma forma em todos os usuários. Muitos são os fatores que contribuem para a ineficácia, como os fatores ambientais locais: temperatura e umidade, além, do próprio metabolismo do hospedeiro (Andrade 2008, Yoon 2015).

A ação repelente de óleos essenciais deve-se à sua composição química. De forma geral, a maioria dos compostos químicos que compõe um óleo essencial pertence à família dos terpenos, principalmente por hidrocarbonetos monoterpênicos e sesquiterpenos voláteis e seus derivados oxigenados, como óxidos, álcoois, aldeídos, cetonas, ácidos e seus produtos de reação, como ésteres e éteres, apresentando-se significativa variabilidade em termos quantitativos (Dhifi et al. 2016, Butnariu e Sarac 2018).

Vale ressaltar, que a variabilidade química dos óleos essenciais os torna potenciais produtos de difícil adaptação por mosquitos, pois de acordo com Mdoe et al. (2014) compostos complexos e variáveis oriundo de plantas podem retardar as chances de insetos a desenvolverem resistência.

Alguns compostos de óleos essenciais podem apresentar-se em maiores quantidades e são comumente denominados de majoritários. E no que se refere à atividade repelente contra insetos, estes são geralmente tidos como responsáveis pela bioatividade. Mas, constituintes que se apresentam em menores quantidades, também podem contribuir para atividade repelente (Omolo et al. 2004, Hamid et al. 2020).

No entanto, alguns compostos pertencentes as classe dos monoterpênicos como α -pineno, eugenol, limoneno, timol, terpinoleno, citronelol, cânfora e citronelal são citados como principais compostos químicos responsáveis pela atividade repelente de insetos. Compostos pertencentes à classe dos sesquiterpenos como o β -cariofileno e β -pineno também são citados como principais compostos responsáveis pela ação (Koutsaviti et al. 2015, Govindarajan et al. 2016, Chellappandian et al. 2018, Hamid et al. 2020).

Mediante ao que foi discutido sobre óleos essenciais, estas substâncias demonstram potencial para serem avaliados na busca de repelentes alternativos contra mosquitos vetores. Além disso, devido às suas propriedades compatíveis com a vida humana e ao meio ambiente,

a proteção repelente oriunda de óleos essenciais, pode proporcionar mais segurança quando comparado ao repelente sintético DEET (Soonwera 2015, Royal et al. 2017, Lee 2018).

2.2.1 Bioma Caatinga: espécies endêmicas e produção de metabólitos secundários

O Brasil possui a maior riqueza de espécies vegetais do mundo, o que torna interessante, a busca de novos produtos botânicos com potencial repelente (EMBRAPA 2010, Zappi et al. 2015, Ulloa-Ulloa et al. 2017). No país, encontram-se mais de 55 mil espécies endêmicas, além de algumas espécies exóticas trazidas por europeus e africanos durante o período de colonização, as quais também se mostram distribuídas pelos biomas da Amazônia, Cerrado, Pantanal, Caatinga, Mata Atlântica e Pampa (EMBRAPA 2010).

Embora em outros biomas do Brasil possam conter espécies vegetais com potenciais bioativos, estudos voltados com espécies do bioma Caatinga tem sua importância. Além de o bioma ser exclusivamente brasileiro, há plantas que são restritas em suas delimitações, e o fato destas plantas só existirem nesse bioma, pode haver compostos bioativos que nenhum outro país tenha acesso, podendo nesse sentido, produzir um produto exclusivamente brasileiro (Buriti et al. 2013).

Além disto, quanto mais dados cientificamente comprovados do potencial bioativo de espécies de plantas da Caatinga forem obtidos mais conhecido e valorizado será no cenário nacional (Giuliett et al. 2004). De acordo com os mesmos autores, essa perspectiva é necessária, devido a uma crença de que o bioma é resultado de outra vegetação alterada e com baixa diversidade de plantas, as quais podem ser encontradas em qualquer lugar.

No entanto, o bioma Caatinga é dotado de uma diversidade de espécies vegetais. Entre as mais frequentes, encontram-se as espécies pertencentes à família da Fabaceae, Convolvulaceae, Euphorbiaceae, Malpighiaceae, Poaceae e Cactaceae. O bioma é detentor de 318 espécies vegetais endêmicas (Tabarelli e Silva 2003, Schistek et al. 2012).

Sua vegetação é distribuída por uma área com cerca de 844.453 km², onde, são caracterizadas principalmente por formações lenhosas, espinhosas, xerófilas, decíduas, suculentas e herbáceas. A vegetação cobre as regiões dos estados de Minas Gerais, Ceará, Piauí, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe e Bahia. Adicionalmente, a sua limitação se dá respectivamente a leste e a oeste do bioma da Amazônia e Mata Atlântica (Leal et al. 2005, Giulietti et al. 2004, BRASIL 2020).

O clima do bioma Caatinga é extremamente seco, com elevadas temperaturas e com chuvas escassas durante o ano (MMA 2006). Mediante a tais condições climáticas, plantas apresentam adaptações morfológicas, como a redução foliar, folhas modificadas em espinhos, expansão caulinar e perda de folhas durante o período seca (Giuliett et al. 2004, Trovão et al. 2007).

O termo Caatinga está relacionado à fisionomia do bioma devido à paisagem durante o longo período sem chuvas, quando a maioria das árvores perdem as folhas e realçam seus galhos de tonalidade esbranquiçada. Assim, o nome Caatinga é de origem do Tupi-guarani, que significa, mata branca (Prado 2003).

Mediante aos fatores externos do ambiente em que estão submetidas, espécies de plantas também podem sintetizar substâncias do metabolismo secundário em defesa às diferentes condições ambientais. Tais substâncias, também podem atuar contra o ataque por insetos herbívoros podendo desencadear diferentes propriedade bioativas, entre elas, a ação repelente (Castilho et al. 2016).

Vale ressaltar, que além da riqueza de espécies da flora, o Brasil também possui uma diversidade sociocultural, a qual é representada por diferentes pessoas e por comunidades tradicionais, como indígena, quilombola, ribeirinho, sertanejo e outros. Estes povos, com a biodiversidade do ambiente em que moram, possuem uma íntegra relação e guardam uma diversidade de conhecimentos tradicionais sobre a utilização da flora (BRASIL 2020, SEPPPIR 2020).

Nesse sentido, o potencial que o bioma Caatinga representa na busca de repelentes botânicos, também é evidenciado a partir de conhecimentos relatados em estudos etnobotânicos. O estudo realizado por De Albuquerque & Andrade (2002), ao estudarem a relação de uma comunidade rural inserida no ecossistema da Caatinga com plantas da localidade, foram citadas três espécies de plantas usadas como repelentes de insetos, entre elas o *Amarantus spinosus L.*, *Amarantus viridis L.*, *Croton argyrophylloides Muell. Arg.*

Até o momento não foram encontrados estudos que comprovassem ação destas espécies. No entanto, sabe-se que essas plantas produzem uma série de compostos bioativos para a sua sobrevivência no meio em que estão inseridas. Entre os principais compostos sintetizados por plantas, que podem atuar como repelentes de insetos encontram-se os alcalóides, saponinas, esteróides, taninos e terpenos. Principalmente monoterpenos e sesquiterpenos, os quais já estão bem estabelecidos quanto à atividade repelente (Kantheti e Padma 2017, Chellappandian et al. 2018, Hamid et al. 2020).

Embora os óleos essenciais de plantas desse bioma sejam constituídos principalmente por compostos da classe de monoterpenos e sesquiterpenos, são escassas pesquisas que avaliaram a atividade repelente sobre mosquitos vetores, entre eles, o *Ae. aegypti*. Vale ressaltar, que muitos dos resultados de análises químicas encontrados na literatura de óleos essenciais oriundo das plantas da Caatinga, são proveniente de bioensaios que avaliaram a toxicidade sobre o *Ae. aegypti*. E os constituintes majoritários são tidos como responsáveis pela atividade (Morais et al. 2006, Lima et al. 2010, Carvalho et al. 2016, Cruz et al. 2017, Anjos et al. 2018).

No entanto, pesquisas demonstram que constituintes químicos que foram relacionados à atividade inseticida de óleos essenciais sobre insetos vetores, entre eles, o *Ae. aegypti*, também apresentaram ação repelente (Aguiar et al. 2015, Govindarajan et al. 2016a, Govindarajan et al. 2016b, Nascimento et al. 2017). Nesse sentido, espécies botânicas deste bioma, apresentam possíveis potenciais para serem avaliadas quanto à atividade repelente. Entre as famílias botânicas nativas desse bioma com potencial para produção de compostos bioativos, encontram-se as espécies da família Euphorbiaceae, entre elas, *Croton tetradenius* (Baillon, 1864), alvo deste estudo (Morais et al. 2006, Lima et al. 2010, Aguiar et al. 2015, Carvalho et al. 2016, Cruz et al. 2017).

2.2.2 *Croton tetradenius* (Baillon, 1864) (Euphorbiaceae)

A família Euphorbiaceae (Jussieu, 1789) na qual se encontra a espécie *Cr. tetradenius*, é composta por mais de 300 gêneros e 8.000 espécies. No Brasil, há registros de 80 gêneros com cerca de 1000 espécies e deste total são distribuídas, 45 gêneros e 211 espécies na região nordeste (Cordeiro & Carneiro 2006, Sátiro e Roque 2008, Mwine e Dame 2011).

Esta família possui comprovadamente uma rica produção de compostos com diferentes propriedades bioativas (Onoabedje et al. 2019). Tal potencialidade pode ser em resposta ao sucesso adaptativo da maioria das espécies a diferentes condições ambientais, em várias regiões tropicais do mundo. Exemplo do bioma Caatinga (Mwine et al. 2011).

A produção de determinadas substâncias secundárias por espécies desta família é economicamente apreciada. Por exemplo, o látex, cujo produto de defesa vegetal é utilizado para a fabricação de borracha. Além da obtenção de óleos vegetais para a produção de biodiesel. Vale ressaltar, que alguns representantes também servem como fonte nutricional para seres humanos (Garg et al. 2011, Secco et al. 2012, São João e Raga 2016).

Algumas substâncias também podem possuir propriedades medicinais. O látex, por exemplo, o qual é utilizado para o ciclo da borracha, contém quantidades significativas de diterpenos. Os quais possuem diferentes bioatividades, como anti-inflamatório, analgésica, antiespasmódica e propriedades que impedem o desenvolvimento de tumores (Feliu 2011).

Outros compostos como, alcalóides, esteróides, flavonóides, taninos, saponinas, glicosídeos e fenóis, também, são encontrados em espécies dessa família apresentando atividade antimicrobiana (Onoabedje et al. 2019). Além desta atividade, as diferentes composições químicas que espécies botânicas desta família possuem, também podem permitir a atividade repelente contra insetos. Como por exemplo, as que pertencem ao gênero *Croton* (Vongsombath et al. 2014, Candido e Besarra 2015, Onoabedje et al. 2019).

As espécies pertencentes ao gênero *Croton* são promissoras quanto à atividade repelente contra insetos, visto que a análise química de seus óleos essenciais demonstraram compostos os quais são citados na literatura quanto à atividade repelente. O α -pineno, β -pineno e α -felandreno, são alguns exemplos (Morais et al. 2006, Salatino et al. 2007, Lima et al. 2010, Peixoto et al. 2013, Vongsombath et al. 2014, Cruz et al. 2017, Anjos et al. 2018, Chellappandian et al. 2018, Onoabedje et al. 2019, Hamid et al. 2020).

Croton L. é o segundo maior gênero que compõe a família Euphorbiaceae e possui cerca de 1.300 espécies representadas nas formas de ervas, arbustos e árvores, as quais estão distribuídas por diferentes regiões tropicais do mundo (Satos et al. 2014, Lima e Pirani 2008). No Brasil, são descritas cerca de 356 espécies que compõe este gênero, sendo deste total, 68 são encontrados no bioma Caatinga. Entre eles, 21 são endêmicas (Torres 2009, Secco et al. 2012). Dentre as espécies aromáticas endêmicas desse bioma com potencial para atividade repelente, encontra-se *Cr. tetradenius*.

C. tetradenius, também conhecido popularmente como velaminho, caatinga-de-bode e velaminho-da-serra, caracteriza-se em um arbusto com medidas entre 0,40 centímetros a 1,2 metros de altura, com ramos castanhos, dotados por folhas aromáticas, as quais podem ser alternas ou opostas pecioladas. Suas flores são do tipo monóica, estaminadas, pistiladas e podendo conter de quatro a seis nectários cilíndricos. A imagem da espécie pode ser conferida na (**Figura 7**) (Silva et al. 2010, Lucena 2010, Machado et al. 2012, Trindade 2015). No bioma Caatinga, esta espécie pode ser encontrada em solos arenoso ou pedregoso, área de vegetações secundária, brejo de altitudes e em meios antropizados da zona das Caatingas (Silva et al. 2010).

Figura 7 - Visão geral de *C. tetradenius* e de sua folha, adaxial e abaxial



Fonte: Sousa, 2019, a: Visão geral de *C.tetradenius*, b: folha em face adaxial e c:abaxial.

Dentre os poucos estudos já realizados com o óleo essencial dessa espécie sobre o *Ae. aegypti*, demonstraram resultados significativos quanto ao seu potencial inseticida sobre o vetor (Carvalho et al. 2016, Anjos et al. 2018). Ambos os estudos, ao analisarem a composição química do óleo essencial de *C. tetradenius*, constataram a cânfora, como o componente químico majoritário. A cânfora é um monoterpene e estudos relatam que este composto é um dos principais constituintes responsáveis por ação repelente em óleos essenciais (Chellappandian et al. 2018), o que pode resultar, um possível potencial repelente para a espécie *C. tetradenius*.

O trabalho a seguir foi elaborado segundo as normas da Revista Journal of Medical Entomology (Capítulo1).

CAPÍTULO 1

COMPOSIÇÃO QUÍMICA E POTENCIAL REPELENTE DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *CROTON TETRADENIUS* (EUPHORBIACEAE) SOBRE *Aedes Aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE)

Daniel Lobo Sousa^{1,6}, Janaína Silva de Freitas², Simone Andrade Gualberto³, Débora Cardoso da Silva³, Rosilene Aparecida de Oliveira⁴, Rômulo Carlos Dantas da Cruz⁵, Ivone Antonia de Souza⁵
Erlon Oliveira Xavier³

¹Mestre em Ciências Ambientais - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), ²Departamento de Ciências Exatas e Naturais-DCEN/ UESB - Campus “Juvino Oliveira”, BR 415, km 04, ³Núcleo de Pesquisa em Química Aplicada/UESB - Praça Primavera, 40, 45700-000, Bairro Primavera, Itapetinga – BA, Brasil. ⁴Departamento de Ciências Exatas e Tecnológicas - Universidade Estadual de Santa Cruz, Avenida Ilheus-Itabuna, Km 16 Salobrinho, ⁵Departamento de Antibióticos – Universidade Federal de Pernambuco, Av. Arthur de Sa, s/n, 50740-521, Recife – PE, Brasil, e ⁶Autor correspondente, e-mail: daniellobo2017@hotmail.com. Telefone: + 55 (75) 98826-9955

Resumo

Óleos essenciais são substâncias voláteis que detêm muitos compostos químicos, sendo responsáveis por diferentes atividades biológicas, dentre elas a ação repelente. Nesse sentido, a investigação de espécies aromáticas com potencial repelente contra insetos vetores como o *Aedes aegypti* (Linnaeus 1762) tornou-se cada vez mais intensa. O presente trabalho buscou avaliar o índice de atividade espacial do óleo essencial obtido de folhas de *Cr. tetradenius*, estimar uma concentração repelente efetiva e o seu tempo de proteção sobre mosquitos fêmeas de *Ae. aegypti*, bem como, analisar a sua composição química. Para os ensaios biológicos, utilizou-se mosquitos com até sete dias de emergência, os quais, foram submetidos a diferentes concentrações do óleo essencial solubilizado em uma emulsão não iônica. A análise química foi realizada através da cromatografia gasosa, acoplada a espectrometria de massa e ao detector de ionização de chama. O óleo essencial apresentou índice de atividade espacial repelente, e as concentrações de 200 e 300 mg/cm² foram significativas. Para uma repelência efetiva de 50 e 99% obteve-se concentração estimada de 14,1 mg/cm² e 163,4 mg/cm². Quanto ao tempo de proteção repelente, na concentração de 200 mg/cm², foi observado 84% de proteção contra pousos, e 100% contra repasto sanguíneo por 240 minutos. A análise química revelou 33 compostos, sendo a cânfora (30,25%), p-cimeno (13,39%), α -terpineno (10,59%) e γ -terpineno (5,32%) os componentes majoritários. O óleo essencial oriundo de folhas de *Croton tetradenius* demonstrou ser um repelente alternativo promissor na proteção contra o mosquito *Aedes aegypti*.

Palavras-chave: Caatinga, repelente botânico, compostos voláteis, dengue

3.1 Introdução

A dengue é uma arbovirose de grande incidência no mundo. Nas Américas, por exemplo, foram notificados mais de três milhões de casos de dengue em 2019, e mais de 1,6 milhão, já havia sido notificados até o mês de Maio em 2020. O que demonstra a importância do contínuo controle do principal vetor, *Aedes aegypti* (Linnaeus 1762). Uma vez que a dengue, pode ocasionar complicações na saúde e levar a óbito (OPASa 2020, OPASb 2020).

Ações voltadas para o controle populacional do mosquito *Ae. aegypti*, como a remoção de criadouros, as aplicações de produtos químicos sintéticos com atuação larvicida e inseticida não tem sido eficientes (França et al. 2017) e nem sustentável, pois além de não diminuir a incidência de arboviroses tem tido implicações negativas à saúde e ao meio ambiente (Henriques et al. 2016).

Nesse cenário, o uso de repelentes são citados como alternativa eficiente para a proteção pessoal (Yoon et al. 2015, Lorenz et al. 2018). Repelente é uma substância capaz de desencorajar insetos de pousarem ou de picarem a pele humana ou de algum animal (Blackwell 2003). Entre os de uso tópico, os acrescido com o composto sintético N,N-dietil-3-metilbenzamida (DEET), é o mais utilizado (Uc-Puc et al. 2016, Moore et al. 2018).

Apesar da eficácia do DEET, este repelente apresenta riscos para a saúde humana, incluindo alergias, diminuição da frequência cardíaca e hipotensão encefalopatia em crianças. Os perigos, também são evidentes para o meio ambiente, por ter apresentado toxicidade para diferentes espécies de organismos aquáticos, como algas, crustáceos, anfíbios e peixes (Ma et al. 2017, Gao et al. 2020, Vama-Etienne et al. 2020). Além disso, o mosquito *Ae. aegypti* já apresentou insensibilidade a ação repelente do DEET (Stanczyk et al. 2013).

Nesse sentido e cenário a busca por repelentes alternativos que sejam menos agressivos ao meio ambiente e consequentemente a saúde, são importantes. Algumas espécies de plantas biossintetizam substâncias secundárias com diferentes potenciais bioativos, entre elas a repelência, demonstrando potencial para serem avaliados na busca de novos repelentes. Entre estas substâncias com potenciais propriedades, encontram-se os óleos essenciais, à exemplo do óleo essencial de *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle, popularmente conhecida como "Citronela", o qual é comumente utilizado em preparações repelentes de insetos à base de plantas comerciais (Dhifi et al. 2016, Cerceau et al. 2020).

A busca por novos repelentes à base de plantas são importantes, devido à biocompatibilidade de seus produtos (Misni et al. 2017, Royal et al. 2017, Benelli et al. 2018, Lee 2018, Onoabede et al. 2019), e além disso, a proteção de um repelente, não atua da

mesma forma em todos os usuários devido aos fatores ambientais locais, ou ao próprio metabolismo do hospedeiro (Andrade 2008, Yoon 2015).

A ação repelente de óleos essenciais deve-se aos seus compostos químicos. Embora esta ação possa ser oriunda de constituintes que ainda não foram identificados, sabe-se, que monoterpenos como, o limoneno, timol, α -pineno, eugenol, citronoleno, cânfora e terpinoleno são um dos principais constituintes presentes em óleos essenciais que apresentaram atividade repelente sobre mosquitos (Campbell et al. 2011, Chellappandian et al. 2018). Alguns destes compostos, também são encontrados em óleos essenciais de espécies botânicas do gênero *Croton* (Morais et al. 2006, Cruz et al. 2017, Anjos et al. 2018, Chellappandian et al. 2018, Hamid et al. 2020).

Entre essas espécies, encontra-se o *Croton tetradenius* (Baillon, 1864), alvo deste estudo. Ao analisarem a composição química do óleo essencial obtido de folhas e da parte aérea de exemplares desta espécie, foi observada, a cânfora como componente químico principal (Carvalho et al. 2016, Anjos et al. 2018). Como a cânfora é citada como um dos principais constituintes presente em óleos essenciais que apresentaram ação repelente (Chellappandian et al. 2018), pode resultar, um possível potencial repelente para *Cr. tetradenius*.

A partir dessas considerações, buscou-se avaliar o índice de atividade espacial do óleo essencial obtido de folhas de *Cr. tetradenius*, estimar uma concentração repelente efetiva e o seu tempo de proteção sobre mosquitos fêmeas de *Ae. aegypti*, bem como, analisar a sua composição química.

3.2 Material e métodos

3.2.1 Coleta e identificação do material botânico

As folhas de *Cr. tetradenius* foram coletadas no período matutino em 25-IV-2019 na Floresta Nacional Contendas do Sincorá, situada na cidade de Contendas do Sincorá, Bahia. (Autorizada pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - Sistema de Autorização e Informação sobre Biodiversidade, código de autenticação: 0670110120181226, sob o nº 67011-1. O local de coleta foi registrado com auxílio de um receptor móvel com sistema de posicionamento global (coordenadas, S13° 55'02,8''W41°07'22,0'). A identificação do material botânico foi realizada pela especialista Guadalupe Edilma Licona de Macedo e o exemplar botânico encontra-se depositada no Herbário da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB, sob o registro HUESB 3521. Para comparar uma possível atividade repelente de *Cr. tetradenius*, alvo deste estudo, foram coletadas no mesmo período, folhas de

Cy. nardus “Citronela”, no jardim da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, campos Itapetinga (coordenadas geográficas, S 15°15'12.3"W40°16'20.3). A coleta e utilização na pesquisa dos exemplares botânicos estavam de acordo com as diretrizes internacionais e nacionais sobre o uso da biodiversidade, seguidas da aprovação do Patrimônio Genético Brasileiro, sobre o número A838270.

3.2.2 Extração dos óleos essenciais

As extrações dos óleos essenciais das folhas de *Cr. tetradenius* e *Cy. nardus*, seguiram a metodologia proposta por Santos et al. (2004). As extrações foram realizadas separadamente. Primeiramente, as folhas foram submetidas à secagem em estufa de circulação de ar, regulada a 50 °C por 12 horas. Em seguida, 100 gramas do material triturado manualmente foi colocado em balão de fundo redondo de 3,0 L, os quais adicionou-se 1,5 L de água deionizada, para a hidrodestilação de óleo essencial de cada espécie.

A hidrodestilação foi realizada com auxílio de um destilador tipo Clevenger modificado, durante 3 horas à 100 °C. Posteriormente, cada óleo essencial foi desidratado, através da adição de sulfato de sódio anidro, e posteriormente, acondicionados em frascos de vidro âmbar à temperatura de -4 ± 1 °C até a realização dos ensaios biológicos e análise química.

3.2.2.1 Análise cromatográfica do óleo essencial

A análise quantitativa foi realizada através da cromatografia gasosa acoplada ao detector de ionização de chama (CG-DIC) usando o cromatógrafo a gás Saturn 3800 (Varian) equipado com coluna capilar de sílica fundida VF5-ms (30m X 0,25mm de diâmetro interno X 0,25µm de espessura de filme), tendo hélio 6.0 como gás arraste e fluxo de 1,2 mL.min⁻¹ e pressão de 10 psi. As temperaturas do injetor e detector foram de 250°C e 280°C, respectivamente.

Foi injetado 0,2µL de solução em triclorometano a 50 ppm no modo splitless. A temperatura da coluna teve início a 50°C, mantida nessa temperatura por 5 minutos, acrescida de 8°C/min até 260°C e mantida nessa temperatura por 5 minutos perfazendo o tempo de 31,65 minutos. A quantificação dos componentes foi obtida por integração eletrônica dos picos detectados no DIC por normatização.

A análise qualitativa foi realizada em espectrômetro de massas CG-EM (Shimadzu QP 2010), com analisador triplo quadrupolo, a coluna e as condições de temperaturas foram idênticos às usadas na análise CG-DIC. O modo de operação foi o impacto de elétrons de 70

eV a uma velocidade de varredura de 1 / segundo (s) dentro de uma faixa de 35 a 450 Da. A temperatura da fonte de íons foi de 200°C e da interface de 250 °C.

Os compostos do óleo essencial foram identificados a partir de seus índices de retenção (IR), calculados para cada composto por meio da injeção de uma série de padrões de hidrocarbonetos lineares (C8-C24) com as mesmas condições da amostra, e comparados com os valores tabelados (Adams, 2007), bem como através da comparação com o banco de dados da biblioteca (Nist08).

3.2.3 Ensaios biológicos

Para a realização dos ensaios o óleo essencial de *Cr. tetradenius* foi solubilizado em uma emulsão não iônica, que consiste em um tensoativo. A mesma emulsão, também foi utilizada para a solubilização dos controles positivos. Os ensaios biológicos foram conduzidos em sala climatizada com temperatura de 27 °C e umidade média de 70%.

3.2.3.1 Obtenção de fêmeas de *Aedes aegypti* Linn.

As fêmeas de *Ae. aegypti* foram obtidas da colônia estabelecida no laboratório de Pesquisa e Inseticidas Naturais-LAPIN/UESB. Sendo essas oriundas, de ovos da linhagem Rockefeller, cedidos pelo Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes e Vetores-LAFICAVE, da Fundação Oswaldo Cruz, do Rio de Janeiro.

Após a emergência, as fêmeas de *Ae. aegypti* foram transferidas para gaiolas de polipropileno de 16,5 x 25 cm, e alimentadas diariamente com uma solução de sacarose a 10 %, até montagem dos experimentos. Vinte quatro horas antes da realização dos ensaios biológicos, as fêmeas com até sete dias de vida, com auxílio de um sugador adaptado, eram transferidas para recipientes onde foram realizados os testes. Nesse momento, a alimentação de sacarose era suspensa. Para avaliar o índice de atividade espacial foram utilizadas fêmeas virgens. Para estimar a concentração repelente efetiva e o seu tempo de proteção, utilizou-se mosquitos fêmeas copuladas e nulíparas. O objetivo foi aguçar a busca dos mosquitos por sangue com intuito de atrai-las as concentrações, sobre as quais foi colocado um alimentador artificial.

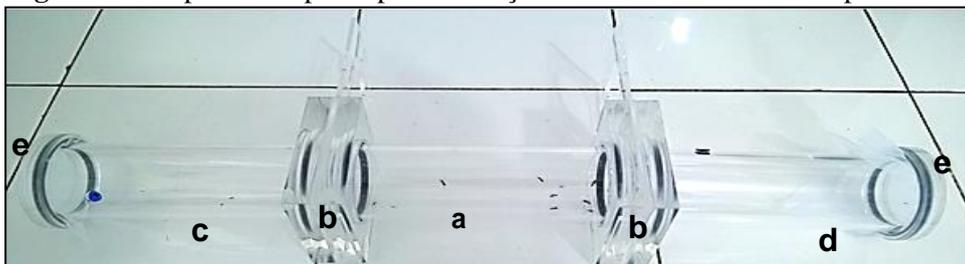
3.2.3.2 Avaliação do índice de atividade espacial

O bioensaio seguiu as “Diretrizes para testes de eficácia de repelentes espaciais”, (WHO 2013), onde foi utilizado um olfatômetro de dupla escolha adaptado. O sistema consistiu em um cilindro central (12,2 cm de comprimento x 4,2 cm de diâmetro), conectado a

dois cilindros laterais com as mesmas medições, conforme a **Figura 1**. A conexão foi realizada a partir das roscas dos conectores (7,3 cm x 7,3 cm), do cilindro central. As extremidades livres dos cilindros laterais foram fechadas com tecido tipo tule, de cor branca, as quais, foram fixadas com tampas em forma de círculo, com 4 cm de diâmetro, na parte central.

O cilindro central foi utilizado para compor os mosquitos fêmeas, os quais, não tinham contato com os cilindros laterais, até o início do bioensaio, devido à tampa slide dos conectores. Em um dos cilindros laterais foi colocado o óleo essencial e o outro ficou vazio, sendo o grupo controle. Para o bioensaio, o recipiente funcionava no sentido horizontal, como demonstra a **Figura 1**.

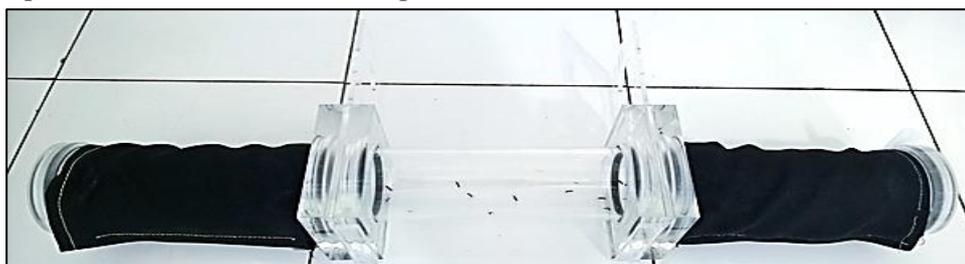
Figura 1. Recipiente adaptado para avaliação do índice de atividade repelente



Fonte: (SOUSA, 2020) a:cilindro central (com orifício para introdução de mosquito), b: conector com tampa slide, c:cilindro de tratamento, d:cilindro controle, e: extremidades dos cilindros laterais com tecido tipo tule, fixadas com tampas.

Para a realização do bioensaio, foram utilizados quatro concentrações do óleo essencial, 50 mg/cm^2 , 100 mg/cm^2 , 200 mg/cm^2 e 300 mg/cm^2 . Para cada concentração, foram dez repetições, cada uma com 20 fêmeas, totalizando 200 mosquitos por tratamento. Cada concentração, foi avaliada do seguinte modo: um dos cilindros de acrílico conectado ao cilindro central, foi colocado 0,5g da formulação, emulsão não iônica e a concentração testada sobre uma lâmina de vidro. No outro cilindro, foi exposto apenas à lâmina vazia. Em seguida, as extremidades dos cilindros laterais foram tampadas e envolvidos com tecidos do tipo oxford de cor preta com velcro, conforme demonstrado na **Figura 2**.

Figura 2. Recipiente adaptado para avaliação do índice de atividade repelente após ter sido colocado o tecido tipo Oxford



Fonte: (SOUSA, 2020).

Posteriormente, esperou-se um minuto, e em seguida, as tampas slide de ambos os conectores foram abertas simultaneamente, dando acesso aos dois cilindros laterais. A observação foi realizada por dez minutos, sendo posteriormente fechadas as tampas e feito a contagem do número de mosquitos fêmeas em cada cilindro. Para tal, o tecido foi retirado e foram registrados quantos mosquitos estavam em cada compartimento, o qual contou com dois observadores.

Esses mesmos procedimentos foram utilizados para a avaliação dos grupos controles. Para o grupo controle positivo, utilizou-se o repelente sintético DEET e o óleo essencial de *Cy. nardus*. Para o controle negativo, utilizou-se somente a emulsão não iônica, e o cilindro sem substância.

3.2.3.3 Estimativa da concentração repelente efetiva

O referido projeto foi aprovado no Comitê de Ética de Uso Animal (CEUA-UFPE) e suas complementares sob o registro 23076.058811/2020. O manejo e cuidado com os animais estão de acordo aos princípios éticos da experimentação animal segundo critérios estabelecidos pelo comitê. Para a realização do experimento da concentração repelente efetiva e para avaliar o tempo de proteção da concentração repelente efetiva utilizou-se sangue de cabra (*Capra aegagrus hircus* L.) (Linnaeus, 1758). Para obtenção sanguínea foram utilizadas dois machos *C. a. hircus* oriundos do setor de Zootecnia da UESB - Campus de Itapetinga BA.

Para estimar uma concentração repelente efetiva de 50 e 99%, foram seguidas as "Diretrizes para testes de eficácia de repelentes de mosquitos para humanos" conforme preconizado pela WHO (WHO 2009) e adaptada para metodologia in-vitro em sistema de gaiolas, não sendo utilizado humanos. Para execução foram utilizadas gaiolas de polipropileno (16,5 cm x 25 cm), com abertura de (12 cm x 10 cm) em uma das laterais, as quais foram dotadas por tecido tule em formato cônico, o que possibilitou o manuseio dos mosquitos, e ao mesmo tempo, evitar a fuga. Na parte superior do recipiente foi adicionada uma tampa removível com uma abertura na parte central de 59,4cm², telada com tecido tule, via pela qual, foram aplicadas as diferentes concentrações.

Foram avaliadas em um mesmo recipiente, cinco concentrações, 100 mg/cm², 200 mg/cm², 300 mg/cm², 400 mg/cm² e 500 mg/cm². Foram três repetições, cada uma com 50 mosquitos, totalizando 150 mosquitos. Na tela foram marcados cinco diferentes espaços de 7cm². Para cada demarcação, foi aplicada 0,1g da emulsão com uma das cinco concentrações do óleo de maneira crescente. Cada concentração, foi aplicada uma por vez, e avaliada

individualmente, por um período de um minuto. Além da emulsão foi colocado sobre o tule um alimentador artificial contendo 1mL de sangue pré-aquecido a 37 °C, como estímulo químico.

O alimentador artificial, consistiu em tubos falcon de polipropileno transparente de 50 mL, no qual, foi preenchido com 40 mL de glicerol 100% pré-aquecido a 50 °C. Após o aquecimento, a extremidade aberta do tubo foi hermeticamente fechada com plástico do tipo polyester (10 cm × 13 cm) resistente a altas temperaturas, o qual, foi vedada com a tampa de rosca de polietileno com abertura na parte central com (2,5 cm) de diâmetro, metodologia preconizada por Silva et al. (2013).

Por essa abertura, com auxílio de uma seringa graduada, foi colocada sobre o plástico de polyester 1mL do sangue pré-aquecido em banho maria, a 37 °C. Como a condutividade térmica do glicerol é baixa, funcionou como uma manta aquecedora, o que permitiu que o sangue ficasse aquecido por um período de 30 minutos. Em seguida, a tampa foi hermeticamente fechada com uma lâmina de Parafilm-M ®. Para cada concentração, utilizou-se uma nova lâmina de Parafilm-M ®.

Como critério de avaliação, considerou-se a quantidade de pousos. Antes de avaliar as concentrações do óleo essencial de *Cr. tetradenius* foram avaliados em cada início do teste, o comportamento de pousos dos mosquitos sobre o tule com o alimentador artificial isento das concentrações, e somente, com a emulsão não iônica, os quais foram denominados de controle negativo. Para o registro do número de mosquitos, contou com dois observadores, os quais, iniciaram e avaliaram um recipiente por vez.

3.2.3.4 Avaliação do tempo de proteção da concentração repelente efetiva

Para determinar o tempo de proteção da concentração repelente efetiva, foram seguidas as “Diretrizes para testes de eficácia de repelentes de mosquitos para humanos” da World Health Organization WHO (WHO 2009), e adaptadas para a metodologia in-vitro, em sistema de gaiola, não sendo seres humanos.

Foram utilizadas gaiolas de polipropileno e o alimentador artificial com sangue pré-aquecido, conforme descrito no tópico anterior. Utilizou-se quatro repetições, cada uma com 50 mosquitos, totalizando 200 mosquitos por tratamento. Em cada repetição (gaiola), foi feito uma demarcação de 7cm² na tela da tampa. Para cada repetição, foi aplicada 0,1g da emulsão a base da concentração repelente efetiva.

A avaliação do tempo de proteção da concentração repelente efetiva do óleo essencial, ocorreu em quatro repetições, cada uma com 50 mosquitos, totalizando 200 mosquitos por

tratamento. A avaliação da concentração ocorreu do seguinte modo: em cada repetição, foi demarcada sobre a tela tule da tampa uma área de 7cm². Para cada repetição, foi aplicada 0,1g da emulsão a base da concentração repelente efetiva e foi avaliada por um período de três minutos, com intervalos de trinta minutos, até completar 240 minutos de experimento. Em cada avaliação, utilizou-se sobre a concentração efetiva um alimentador artificial com 1mL de sangue pré-aquecido a 37C°, como estímulo químico. Nos intervalos para cada observação, o alimentador era retirado e mantido em banho-maria para a próxima avaliação.

O critério de avaliação, foi quantificar a porcentagem de repelência e de repasto sanguíneo. Assim, o tempo de proteção, foi calculado com o número de minutos decorridos entre o momento da aplicação repelente e o primeiro pouso e repasto sanguíneo. Para a avaliação, também contou com dois observadores. Para a confirmação do total de pousos e de repastos em cada tempo de avaliação, considerou-se os registros antecedentes.

Esses mesmos procedimentos foram utilizados para a avaliação dos grupos controles, respectivamente. Como controles positivos foram utilizados o DEET e o óleo essencial de *Cy. nardus*. E o negativo somente com a emulsão não iônica, e isenta, da mesma.

Análise estatística

O índice de atividade espacial (I.A.E) foi determinado de acordo com a equação estabelecido pela World health Organization (2013):

$$IAE = \frac{(Nc - Nt) \times Nm}{(Nc + Nt) \times N}$$

Nc: é igual ao número de mosquitos no tubo sem a formulação, Nt: número de mosquitos no tubo com a formulação, Nm: número total de mosquitos nos dois tubos de acrílico das extremidades, N: total de mosquitos utilizados no ensaio. O índice de atividade espacial poderia variar de -1 a 1: zero indicaria ausência de resposta, -1 não repelência, e 1 uma resposta espacial repelente.

Os resultados obtidos para o índice de atividade espacial, foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as diferenças entre médias comparadas pelo pós teste Tukey a 5% de significância (P < 0,05). O erro padrão de cada índice, foram considerados. Tais análises, também foram utilizadas para o tempo de proteção da concentração repelente efetiva. No entanto, as diferenças entre médias de repasto sanguíneo foram comparadas pelo pós teste Dunnett. Exceto para o erro padrão, o processamento dos dados foi realizado no programa Sistema para Análises Estatísticas – SAEG versão 9.1.- 2007 (Júnior e Melo 2008).

Para o cálculo das concentrações 50 e 99%, referente ao experimento da estimativa da concentração repelente efetiva, utilizou-se a análise de regressão *PROBIT* em nível de 95% de confiança ($P < 0,05$) (Robertson et al. 1980).

3.3 Resultados

Avaliação do índice de atividade espacial

Após análise, verificou-se que os índices de atividade espacial do óleo essencial de *Cr. tetradenius* e dos controles positivos, diferiram dos controles negativos ($F = 5,1$, G.I. = 13 e $P = 0,00000$). Os índices de atividade espacial das concentrações do óleo essencial de *Cr. tetradenius* á 200 e 300 mg/cm², foram significativamente maiores em relação aos controles negativos, o que não aconteceu nas menores concentrações de 50 e 100 mg/cm² (**Tabela 1**).

Tabela 1. Média do índice de atividade espacial, do óleo essencial obtido das folhas de *Croton tetradenius*, sobre fêmeas de *Aedes aegypti*

Tratamentos	Concentrações mg/cm ²	I.A.E	S.E
<i>Cr. tetradenius</i>			
	300	0,36 ^a	± 0,08
	200	0,48 ^a	± 0,07
	100	0,16 ^{ab}	± 0,05
	50	0,23 ^{ab}	± 0,07
<i>Cy. nardus</i>			
	300	0,53 ^a	± 0,07
	200	0,36 ^a	± 0,10
	100	0,36 ^a	± 0,11
	50	0,21 ^{ab}	± 0,13
DEET			
	300	0,35 ^a	± 0,07
	200	0,33 ^a	± 0,04
	100	0,20 ^{ab}	± 0,06
	50	0,26 ^{ab}	± 0,04
Emulsão não iônica		- 0,12 ^b	± 0,03
Recipiente		- 0,07 ^b	± 0,10

¹Médias seguidas por letras diferentes, diferem significativamente pelo pós teste Tukey, $P < 0,05$. ²Índice de atividade Espacial (I.A.E). ³Erro padrão (S.E).

Os controles positivos, óleo essencial de *Cy. nardus* a 100, 200 e 300 mg/cm² e o DEET a 200 e 300 mg/cm², apresentaram também valores dos índices médios, superiores aos controles negativos. Por outro lado, os valores médios de *Cy. nardus* a 50 mg/cm² e DEET a 50 e 100 mg/cm² não diferiram significativamente dos controles negativos (**Tabela 1**).

Conforme apresentado na (**Tabela 1**), todos os índices médios de atividade espacial dos tratamentos e controles positivos apresentaram valores positivos e acima de zero, o que

representa uma resposta espacial repelente. Também, no caso dos controles negativos, que apresentaram valores negativos para os índices médios de atividade espacial, foi observada a não repelência. Os índices médios de atividade espacial dos controles negativos não variaram entre si.

Estimativa da concentração repelente efetiva

As diferentes concentrações do óleo essencial obtido de folhas de *Cr. tetradenius* mostraram-se repelentes para os mosquitos fêmeas de *Ae. aegypti*. Para uma repelência de 50 e 99%, obteve-se concentração efetiva C.E estimada de, 14,1 mg/cm² e 163,4 mg/cm², respectivamente, (**Tabela 2**).

Tabela 2. Concentração efetiva 50 e 99% do óleo essencial obtido das folhas de *Croto tetradenius* sobre mosquitos fêmeas de *Aedes aegypti*, com um minuto de exposição

Tratamento	Concentração efetiva (mg/cm ²)				χ^2 (G.L)
	C.E 50%	Intervalo de confiança	C.E 99%	Intervalo de confiança	
<i>Cr. tetradenius</i>	14,1	1,2 – 31,3	163,4	128,1 – 240,2	26,893(13)

Avaliação do tempo de proteção da concentração repelente efetiva

Para avaliar o tempo de proteção repelente, optou-se pela concentração efetiva de 99% de repelência, porém, aproximada a 200 mg/cm². Com relação ao pouso, foi observado que não houve diferença significativa entre o *Cr tetradenus* e os controles positivos. No entanto, em 30 minutos de exposição houve pousos em *Cr tretradenius* e *Cy nardus*, obtendo uma proteção de 95 e 99,5% respectivamente, ao contrário do tratamento DEET, no qual, obteve uma proteção de 100% em até 60 minutos.

Todavia, após 60 minutos de exposição houve pousos em todos os tratamentos avaliados, obtendo uma proteção ao final do experimento de 84% para *Cr. tetradenius*, 93% para *Cy. nardus* e 98,5% para o DEET. Houve diferença significativa entre os tratamentos avaliados e os controles negativos em todos os horários (**Tabela 3**).

Tabela 3. Percentual acumulativo de repelência de fêmeas de *Aedes aegypti*, em relação ao tempo de proteção, da concentração repelente efetiva do óleo essencial obtido de folhas de *Coton tetradenius*

Tempo	Tratamentos e concentração. Percentual acumulativo de repelência \pm ¹ SE					
	<i>Cr.tetradenius</i> 200 mg/cm ²	<i>Cy. Nardus</i> 200 mg/cm ²	DEET 200 mg/cm ²	³ TCENI	⁴ TSENI	² ANOVA F valor(G.L)P valor
30	95,0 ^a \pm 2,3	99,5 ^a \pm 0,5	100 ^a \pm 0,0	63,0 ^b \pm 10,9	48,0 ^b \pm 7,4	15,976 (4) 0,00003
60	93,5 ^a \pm 2,7	99,5 ^a \pm 0,5	100 ^a \pm 0,0	43,0 ^b \pm 5,9	21,5 ^c \pm 11,1	38,132 (4) 0,00000
90	92,0 ^a \pm 2,9	99,0 ^a \pm 0,57	99,5 ^a \pm 0,5	26,5 ^b \pm 11,4	13,5 ^b \pm 11,5	32,734 (4) 0,00000
120	90,0 ^a \pm 4,2	96,5 ^a \pm 0,95	99,5 ^a \pm 0,5	22,5 ^b \pm 9,8	11,0 ^b \pm 11,0	39,668 (4) 0,00000
150	89,0 ^a \pm 4,3	96,5 ^a \pm 0,95	99,5 ^a \pm 0,5	17,5 ^b \pm 9,7	8,0 ^b \pm 7,5	60,145 (4) 0,00000
180	89,0 ^a \pm 4,3	96,5 ^a \pm 0,95	99,5 ^a \pm 0,5	13,0 ^b \pm 8,5	6,0 ^b \pm 6,0	85,696 (4) 0,00000
210	89,0 ^a \pm 7,0	94,5 ^a \pm 2,0	99,5 ^a \pm 0,5	13,0 ^b \pm 8,5	6,0 ^b \pm 3,5	79,782 (4) 0,00000
240	84,0 ^a \pm 8,9	93,0 ^a \pm 3,3	98,5 ^a \pm 1,0	9,0 ^b \pm 9,0	2,0 ^b \pm 2,0	63,847 (4) 0,00000

\pm ¹SE = erro padrão. ²ANOVA = análise de variância. ³TCENI = tela com emulsão não iônica. ⁴TSENI = Tela sem emulsão não iônica. Médias seguidas com letras diferentes nas linhas, diferem significativamente pelo pós teste Tukey, $P < 0,05$.

Embora tenha sido observado no tratamento do óleo essencial de *Cr. tetradenius*, foi observado uma proteção de 100% contra repasto sanguíneo por 240 minutos, assim como nos demais controles positivos, o que não foi observado nos controles negativos (**Tabela 4**).

A tela com emulsão não iônica e tela sem emulsão não iônica, obteve 0,5 e 9,5% respectivamente da atividade já em 30 minutos de avaliação. Embora a análise de variância, não tenha detectado diferença entre as porcentagens de repastos sanguíneos nos controles negativos em 30, 60 e 90 minutos com os controles positivos e com o óleo essencial de *Cr. tetradenius*, nos quais, não houve atividade de repastos sanguíneos, observou-se que além da não proteção dos controles negativos contra repasto sanguíneo, houve um aumento da atividade nestes períodos (**Tabela 4**).

Tabela 4. Percentual de mosquitos fêmeas de *Aedes aegypti* que realizaram repasto sanguíneo, em relação ao tempo de proteção, da concentração repelente efetiva, do óleo essencial obtido de folhas de *Croton tetradenius*

Tempo	Tratamentos e concentração. Percentual de repasto sanguíneo acumulativo \pm ¹ SE					
	<i>Cr.tetradenius</i> 200 mg/cm ²	<i>Cy. Nardus</i> 200 mg/cm ²	DEET 200 mg/cm ²	³ TCENI	⁴ TSENI	² ANOVA F valor(G.L)P valor
30	0,0* \pm 0,0	0,0* \pm 0,0	0,0* \pm 0,0	0,5* \pm 0,5	9,5* \pm 6,8	1.842 (4) 0,173
60	0,0* \pm 0,0	0,0* \pm 0,0	0,0* \pm 0,0	4,5* \pm 4,5	12,0* \pm 6,1	2.356 (4) 0,100
90	0,0* \pm 0,0	0,0* \pm 0,0	0,0* \pm 0,0	6,0* \pm 5,3	13,0* \pm 5,8	2.663 (4) 0,073
120	0,0 ^a \pm 0,0	0,0 ^a \pm 0,0	0,0 ^a \pm 0,0	9,0 ^a \pm 5,4	16,0 ^b \pm 4,8	5.000 (4) 0,009
150	0,0 ^a \pm 0,0	0,0 ^a \pm 0,0	0,0 ^a \pm 0,0	11,0 ^a \pm 6,4	16,5 ^b \pm 4,5	4.886 (4) 0,010
180	0,0 ^a \pm 0,0	0,0 ^a \pm 0,0	0,0 ^a \pm 0,0	12,0 ^a \pm 7,1	17,0 ^b \pm 4,3	4.751 (4) 0,011
210	0,0 ^a \pm 0,0	0,0 ^a \pm 0,0	0,0 ^a \pm 0,0	12,5 ^b \pm 7,3	19,0 ^b \pm 3,8	5.810 (4) 0,004
240	0,0 ^a \pm 0,0	0,0 ^a \pm 0,0	0,0 ^a \pm 0,0	14,0 ^b \pm 7,6	21,0 ^b \pm 3,6	6.837 (4) 0,002

\pm ¹SE = erro padrão. ²ANOVA = análise de variância. ³TCENI = tela com emulsão não iônica. ⁴TSENI = Tela sem emulsão não iônica. *Médias seguidas com asteriscos nas linhas, não diferem pela ANOVA. Médias seguidas com letras diferentes nas linhas, diferem significativamente pelo pós teste Dunnett, $P < 0,05$.

De 120 a 180 minutos, continuou o aumento na porcentagem de repastos sanguíneos em ambos controles negativos. Ao decorrer destes períodos, o percentual de pousos no tratamento, tela sem a emulsão não iônica, foram significativamente maiores do que o observado na tela com a emulsão não iônica. No entanto, em 210 e 240 minutos, não houve diferença significativa entre os tratamentos.

Composição química

A análise química do óleo essencial das folhas de *Cr. tetradenius*, quantificou 33 compostos. Desses, 23 foram identificados, correspondendo à 69,69%, sendo 60,86% de monoterpenos hidrocarbonados, 21,73% de monoterpeno oxigenado e 13,04% de sesquiterpenos hidrocarbonados. Dentre os identificados, a cânfora (30,25%), p-cimeno (13,39%), α -terpineno (10,59%) e γ -terpineno (5,32%) foram os compostos majoritários.

Em relação ao óleo essencial de *Cy. nardus* foram quantificados 35 compostos, dos quais, 21 foram identificados, correspondendo à 60%. Sua composição foi de 4,76% de monoterpenos hidrocarbonados, 33,33% de monoterpenos oxigenados e 28,57% de sesquiterpenos hidrocarbonados e oxigenados. Os compostos majoritários foram o citronelal (33,53%), geraniol (19,27%), citronelol (11,73%) e hedicariol (11,23%) (**Tabela 5**).

Tabela 5. Composição química do óleo essencial obtido de folhas de *Croton tetradenius* e do controle positivo, óleo essencial de *Cymbopogon nardus*, através da cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas

Constituintes	<i>Cr.tetradenius</i> (%) ¹	<i>Cy.nardus</i> (%)	IR ²	IK ³
Triciclono	1,19	----	926	926
α -Tujeno	0,90	----	933	930
α -Pineno	4,17	----	940	939
Canfeno	3,1	----	955	954
Sabineno	1,21	----	978	975
β -Pineno	0,71	----	981	979
Mirceno	4,82	----	993	990
α -Felandreno	3,36	----	1006	1002
α -Terpineno	10,59	----	1021	1017
p-Cimeno	13,39	----	1030	1024
Limoneno	4,47	1,4	1034/1033	1029
E- β -Ocimeno	0,33	----	1053	1050
γ -Terpineno	5,32	----	1065	1059
Terpinoleno	0,85	----	1092	1088
Linalol	1,01	----	1101	1096
Cânfora	30,25	----	1156	1146
Borneol	0,85	----	1165	1169
Terpine-4-ol	1,37	----	1184	1177
Ascaridol	1,8	----	1249	1237
α -Terpinil acetato	1,53	----	1357	1349

Continuação, Tabela 5

Constituintes	<i>Cr.tetradenius</i> (%) ¹	<i>Cy.nardus</i> (%)	IR ²	IK ³
α -Copaeno	1,68	----	1388	1376
α -Humuleno	1,04	0,12	1471	1454
Biciclogermacreno	0,69	----	1513	1500
Citronelal	----	33,53	1160	1153
Citronelol	----	11,73	1223	1225
Geranial	----	0,36	1248	1267
Geraniol	----	19,27	1261	1252
Nerol	----	0,49	1276	1229
Eugenol	----	0,55	1366	1359
Acetato de geranila	----	1,29	1386	1381
Biciclogermacreno	0,69	----	1513	1500
γ -Muuroloeno	----	0,2	1490	1479
E-Muurolo-4 (14), 5-dieno	----	1,95	1497	1493
γ -Cadinene	----	0,22	1509	1513
α -Muuroloeno	----	0,51	1513	1500
δ -Cadineno	----	1,89	1537	1523
Hediacariol	----	11,23	1565	1548
Germacreno D-4-ol	----	2,18	1625	1575
E-Sesquilandulol	----	0,38	1625	1632
γ -Eudesmol	----	0,92	1652	1623
(2Z, 6E)-Farnesol	----	0,42	1730	1723
(2E, 6E)-Farnesal	----	0,13	1753	1741
Total identificado	69,69	60		
Monoterpenos hidrocarbonados	60,86	4,76		
Monoterpenos oxigenados	21,73	33,33		
Sesquiterpenos hidrocarbonados	13,04	28,57		
Sesquiterpenos oxigenados	----	28,57		

¹Substâncias listadas por ordem de eluição em coluna capilar Factor Four/VF-5ms. ²Índices de retenção com coluna capilar Factor Four/VF-5ms. ³Índices de Kovats em coluna capilar DB-5 (ADAMS, 2007).

3.4 Discussão

A composição química do óleo essencial das folhas de *Cr. tetradenius* consistiu essencialmente em monoterpenos, e a cânfora foi o principal composto, seguido do p-cimeno, α -terpineno e γ -terpineno. Na composição química do óleo essencial obtido das folhas de *Cr. tetradenius* realizada por Carvalho et al. (2016), constataram maiores quantidades de monoterpenos, sendo também a cânfora o principal componente, seguido do p-cimeno, α -terpineno e γ -terpineno, com 25,49, 5,84, 6,48 e 5,45%, respectivamente. No presente trabalho, o γ -terpineno apresentou 5,32%, dado semelhante quantificado pelos os mesmos autores. Já os demais compostos, foram menores comparados do presente estudo.

Anjos et al. (2018), analisaram o óleo essencial da parte aérea de *Cr. tetradenius* coletada em diferentes períodos do ano, e a cânfora também foi o principal composto, vista em todas as coletas. No presente trabalho, a cânfora obteve 30,25%, dado similar com o quantificado pelo os mesmos autores no mês de Maio (30,95%). O p-cimeno, α -terpineno e γ -

terpineno, também estavam presentes nos diferentes períodos de coleta, porém, em menores porcentagens quando comparado com os do presente estudo. As diferenças qualitativas dos principais compostos entre os trabalhos podem estar relacionada a diferentes fatores, como as interações bioáticas, condições edafoclimáticas e o estado de desenvolvimento da planta (Awada et al. 2012, Almeida-Pereira et al. 2019).

Na análise da composição química do óleo essencial obtido de folhas de *Cr. tetradenius* de 37 exemplares, realizada por Almeida-Pereira et al. (2019), a cânfora também foi presente em todas as análises, no entanto, não foi o principal componente. Variando entre 6,82 à 17,05%, o principal foi o p-cimeno, com uma variação de 7,16 à 23,38%, sendo que no presente estudo, foi o segundo mais abundante (Almeida-Pereira et al. 2019).

De acordo com Thompson et al. (2003), variações significativas na porcentagem de um composto principal entre plantas de mesma espécie, cuja regiões de origem sejam diferentes, pode estar correlacionada com as diferenças ecológicas marcantes entre os locais. Nesse sentido, vale destacar, que a origem da coleta das folhas da espécime em estudo foi em um município localizado no estado da Bahia, o mesmo onde realizou Carvalho et al. (2016) e Anjos et al. (2018), e diferente do realizado por Almeida-Pereira et al. (2019), o quais, coletaram em municípios do estado de Sergipe. O que pode explicar a diferença na porcentagem da cânfora entre os trabalhos.

Em relação à composição do óleo essencial de *Cy. nardus* foram observados como compostos majoritários, os monoterpenos oxigenados citronelal 33,53%, geraniol 19,27%, citronelol 11,73%, e o sesquiterpeno oxigenado hedicariol 11,23%. Nyamador et al. (2017), observaram nesta mesma espécie, coletada na região do Tongo-África, compostos semelhantes, com quantidades variadas, apresentando 30,58% de citronelal, porcentagem próxima visto no presente estudo. Já o geraniol (23,93%) e o citronelol (7,65%) apresentaram-se com valores diferentes.

Vama-Etienne et al. (2020) ao extraírem óleo essencial de *Cy. nardus* de uma região da Costa do Marfim, observaram que o geraniol foi o principal componente majoritário com 51,6%, sendo que no presente estudo, foi o segundo mais abundante. Outros compostos como o citronelol e o limoneno também apresentaram em maiores porcentagens, com 17 e 5%, respectivamente. No presente estudo, o citronelol foi o terceiro composto mais abundante, enquanto o limoneno apresentou apenas 1,4%.

O hedicariol, o qual foi majoritário no presente estudo, não foi constatado nas análises realizadas por Nyamador et al. (2017), Vama-Etienne et al. (2020), assim como em um estudo que analisou a composição química do óleo essencial de *Cy. nardus*, em cinco épocas de

coleta em uma região do estado do Tocantins, onde geraniol, citronelol e elemol foram majoritários com variação de 30 à 38, 10 à 18 e 8 à 11% respectivamente (Castro et al. 2010). Esses resultados demonstram que o local de origem da planta, tem influência direta na composição química de um óleo essencial, conforme já mencionado.

Em relação à atividade repelente, verificou-se que todas as concentrações testadas do óleo essencial das folhas de *Cr. tetradenius* apresentaram repelência sobre o mosquito *Ae. aegypti*. No entanto, foi a partir da concentração de 200 mg/cm² que houve melhor potencial repelente, visto que, os índices de atividade espacial das concentrações de 50 e 100 mg/cm² não diferiram dos controles negativos, emulsão não iônica e apenas o recipiente, os quais apresentaram índices espaciais atrativos (**Tabela 1**).

Esses dados sugerem, que maiores índices de atividades espaciais do mosquito *Ae. aegypti* podem ser alcançados em maiores concentrações do óleo essencial de *Cr. tetradenius*, e que em menores concentrações, estes índices podem estar na faixa estreita de atração. Esse fato é corroborado por pesquisas da mesma natureza. Em que o potencial repelente depende da concentração.

Jiang et al. (2019) ao avaliaram a atividade repelente do óleo essencial das folhas de *Cymbopogon nardus* (L) Rendle contra *Ae. aegypti* nas concentrações 0,001, 0,01, 0,1, 10 e 100 mg/cm² em sistema de olfatômetro, observaram que a repelência aumentou com a concentração. Da mesma forma foi observado por Manh & Tuyet et al. (2020) que ao avaliarem o potencial repelente do óleo essencial obtido de folhas de *Mentha arvensis* (L) contra o mosquito *Ae. aegypti* nas concentrações de 25, 50 e 100%. Vale ressaltar, que pesquisas voltadas para a avaliação da atividade repelente de óleos essenciais de espécies do gênero *Croton* sobre mosquitos vetores, são escassas (Nério et al. 2010, Maia e Moore 2011, Rehman et al. 2014, Chellappandian et al. 2018, Souza et al. 2019).

No entanto, algumas espécies pertencentes ao gênero *Croton* foram utilizadas por comunidades na proteção contra picadas de insetos. Dentre as espécies, encontrasse *Croton argyrophyllodes* Muell. Arg relatada por De Albuquerque e Andrade (2002), e *Croton roxburghii* Wallich, por Vongsombath et al. (2014), sendo a ação repelente do óleo essencial extraída da casca desta última espécie, comprovada pelos mesmos autores, em testes com humanos em campo sobre mosquitos dos gêneros *Armigeres*, *Culux* e *Aedes*. O que demonstra o potencial repelente do gênero *Croton*.

Os insetos utilizam uma série de combinações de pistas olfativas, visuais e térmicas para detectarem hospedeiros, no entanto ainda não se sabe qual o principal mecanismo fisiológico que atua sobre a repelência (Afify e Potter 2020). Estudos sobre eletrofisiologia e

do comportamento do modo de ação repelente sobre insetos, demonstram que o sistema olfativo, gustativo e tátil está envolvido (Dickens e Bohbot, 2013, Degennaro, 2015, Dennis et al. 2019, Afify e Potter 2020).

Estabelecendo uma analogia, que antenas dos insetos são responsáveis pelo sistema sensorial espacial e que são dotadas por células olfativas e quimiorreceptores, os quais, são essenciais para a percepção e identificação de odores de hospedeiros; infere-se, que tais estruturas possam estar envolvidas na repelência dos mosquitos *Ae. aegypti*. Esse fato é devido à detecção do odor do óleo essencial de *Cr. tetradenius* pelos mosquitos após sua volatilização no interior do olfatômetro (Lorenz et al. 2018, Dennis et al. 2019).

Adicionalmente, o potencial repelente do óleo essencial avaliado nesta pesquisa, pode ter sido em resposta de compostos pertencente à classe dos monoterpenos, sobretudo a cânfora, a qual foi o principal composto. Esta relação deve-se ao fato de que a cânfora, é citada como um dos principais compostos presente em óleos essenciais que apresentaram a ação repelente sobre insetos (Chellappandian et al. 2018). Além disso, a cânfora já foi detectada por antenas de mosquitos *Ae. aegypti* num estudo em que avaliaram o seu potencial repelente (Campbell et al. 2011).

Em relação ao repelente sintético DEET, todas as concentrações apresentaram atividade repelente sobre o mosquito *Ae. aegypti*, comprovando assim sua ação repelente (Rodriguez et al. 2017, Moore et al. 2018). O DEET apresentou uma atividade repelente significativa a partir da concentração de 200 mg/cm², visto que, os índices de atividade espacial das concentrações de 50 e 100 mg/cm², não diferiram dos controles negativos.

A baixa atividade repelente do DEET em menores concentrações, também foram observados por outros estudos. Deletre et al. (2013), ao utilizarem o DEET como controle positivo nas concentrações 0.01, 0.1 e a 1%, sobre os mosquitos fêmeas de *An. gambiae*, em sistema de olfatômetro, constataram que não houve atividade repelente significativa em nenhuma das concentrações. Estrada et al. (2019), ao utilizarem o DEET como controle positivo em saio de repelência sobre fêmeas de *Ae. aegypti* nas concentrações, 0.0005, 0.001, 0.005, 0.01, 0.1, 1, e 10%, em sistema de olfatômetro, constataram menor porcentagem de repelência nas seis menores concentrações.

Sabe-se, que o DEET pode ativar receptores olfativos em *Ae. aegypti*, induzindo o comportamento de evitação (Stanczyk et al. 2010). No entanto, o DEET possui uma taxa de vapor de 0,27 Pa a 25 ° C, o qual é baixo quando comparado a outros repelentes, como o p-mentano 3,8 diol, com uma taxa de 4,5 Pa a 25 ° C (Deletre et al. 2013). Como o DEET possui uma baixa taxa de vapor, infere-se que nas menores concentrações 50 e 100 mg/cm² avaliados

neste estudo, houve menor nível de volatilização e, conseqüentemente, menor atividade espacial.

No presente trabalho, o óleo essencial de *Cr. tetradenius* apresentou os mesmos resultados que o DEET, o que comprova o seu potencial como repelente. Vale ressaltar, que alguns óleos essenciais usados para repelir insetos, também são utilizados como aromatizantes de alimentos, assim como na indústria de perfumes, em cosméticos e para fins medicinais. Além disso, óleos essenciais têm demonstrado seletividade (Govindarajan et al. 2016, Lee 2018, Cerceau et al. 2020), demonstrando ser um repelente alternativo natural e mais seguro comparado ao DEET.

No que se refere ao óleo essencial de *Cy. nardus* todas as concentrações apresentaram atividade repelente sobre o mosquito *Ae. aegypti*, o que também comprova sua ação repelente (Cerceau et al. 2020, Arpiwi et al. (2020). No presente estudo, o óleo essencial de *Cy. nardus* apresentou melhor resultado comparado ao DEET e ao óleo essencial de *Cr. tetradenius*, uma vez que, os índices de atividade espacial diferiram significativamente dos controles negativos desde da concentração de 100 mg/cm², (**Tabela 1**). O potencial repelente do óleo essencial de *Cy. nardus* em baixas concentrações, também foram observados por Vama Etienne et al. (2020), que ao avaliarem o seu potencial frente ao mosquito *Anopheles gambiae* (Giles, 1902) nas concentrações de 0,1 e 1%, constataram que ambas apresentaram atividade.

Óleos essenciais têm como principal característica a volatilidade (Lee 2018), o que pode explicar o melhor índice de atividade espacial ocasionado pelo óleo essencial de *Cy. nardus*, em relação ao DEET. O óleo essencial de *Cy. nardus*, apresentou como um dos componentes majoritário, o monoterpeno citronelal. Este monoterpeno, possui ação repelente comprovada sobre insetos e estudos demonstraram, que o citronelal foi captado por receptores olfativos e proteínas odorantes presentes em antenas do inseto *An. gambiae*, sugerindo que estes alvos, também possam estar envolvidos na repelência espacial do óleo essencial de *Cy. nardus*, sobre o mosquito *Ae. aegypti* (Kwon et al. 2010, Wu et al. 2020, Vama-Etienne et al. 2020).

No potencial repelente de uma planta, também se deve considerar o sinergismo entre os compostos. Dito isto, compostos pertencentes à classe dos sesquiterpenos, também são ativos como repelentes, com a vantagem de serem menos voláteis e de maior duração, quando comparado aos monoterpenos (Costa et al. 2017). No presente estudo, o óleo essencial de *Cy. nardus* apresentou maiores quantidades de sesquiterpenos, o que pode ter contribuído no potencial repelente em relação ao *Cr. tetradenius*. Principalmente devido à presença

majoritária do sesquiterpeno hedicariol, uma vez que já possui atividade repelente comprovada sobre o mosquito *Ae. aegypti* (Paluch et al. 2009).

No que se refere à análise da concentração repelente efetiva, obteve-se concentração estimada de, 14,1 mg/cm² e 163,4 mg/cm² para repelência de 50 e 99% de mosquitos, respectivamente (**Tabela 2**). Para avaliar o tempo de proteção repelente da concentração efetiva em relação aos pousos e repasto sanguíneo, utilizou-se o preconizado pela WHO (2009) que foi de 99%. Embora o valor para essa estimativa foi de 163,4 mg/cm², optou-se aproximada à 200 mg/cm². Tal concentração levou em consideração o primeiro bioensaio, no qual, foi a partir da concentração a 200 mg/cm² onde observou melhor potencial repelente. Além disto, esta aproximação é aceitável dentro do intervalo de confiança (P = 0,01295) (**Tabela 2**).

Vale ressaltar, que a concentração repelente efetiva aproximada de 200 mg/cm², é uma concentração menor quando comparado às concentrações repelentes comerciais. Há exemplo do DEET, o qual pode ser comercializado em concentrações de até 10% para crianças entre dois e doze anos de idade, e superior a 30% para maiores de doze anos. Nesse sentido, a concentração efetiva a 200 mg/cm², correspondente à 4%, encontra-se entre as menores concentrações permitidas em nível comercial (Ministério da Saúde, 2013).

A proteção repelente é avaliada em humanos com ensaios convencionais com braço em gaiola (Balasubramani et al. 2018, Azeem et al. 2019). Porém, Jahna et al. (2010) ressalta que este método possuem algumas desvantagens, por expor voluntários às picadas de insetos e à substâncias químicas. Por isso, ensaios são sugeridos com boa eficiência *in vitro*. Como exemplo, pode-se citar o sistema de alimentação em membrana, pois, além de oferecerem condições semelhantes aos humanos, oferece padronização em relação à área de superfície de aplicação, temperatura do sangue, além de atender aos protocolos de segurança por não submeter voluntários às substâncias potencialmente tóxicas (Cockcroft et al. 1998).

Com relação ao tempo de proteção da concentração repelente efetiva, observou-se que no primeiro minuto de avaliação, o óleo essencial de *Cr. tetradenius* a 200 mg/cm², ofereceu 95% de proteção contra pousos. No entanto, a porcentagem de proteção ao final do experimento, aos 240 minutos, foi de 84%. Esses resultados corroboram com outros estudos, já que devido ao caráter volátil, o mesmo tende a reduzir sua eficácia após a aplicação (Balasubramani et al. 2018, Azeem et al. 2019).

Resultado semelhante também foi observado com o controle positivo, óleo essencial de *Cy. nardus*, o qual ofereceu proteção inicial de 99,5% e diminuiu para 92,5% ao final do experimento. A redução na capacidade de proteção ao longo do tempo, também foi observado

por Arpiwi et al. (2020), em que ao avaliarem a atividade repelente de diferentes concentrações do óleo essencial de *Cy. nardus* sobre *Ae. aegypti* em condições de laboratório, constataram que o óleo a 4%, concentração equivalente com a do presente estudo, ofereceu proteção inicial de 92,61% e de 64% ao final do experimento.

A alta volatilização de óleos essenciais é visto como um empecilho na produção de produtos repelentes 100% natural (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2017). No entanto, já existem métodos que podem promover uma ação prolongada. Alguns incluem o uso de fixadores ou formulações à base de polímeros (Auysawasdi et al. 2017, Misni et al. 2017, Tavares et al. 2018). Estes métodos podem revolucionar o mercado de repelentes a base de óleos essenciais tornando-os viáveis para uso em longa duração, conforme ressalta Maia e Moore (2011). Além disso, deve-se levar em consideração, que produtos oriundo de plantas possuem propriedades que são biocompatíveis e seletivos, o que pode proporcionar tanto segurança para uso pessoal e ao meio ambiente (Royal et al. 2017).

Em relação ao DEET, o repelente proporcionou 100% de proteção contra pousos em até 60 minutos. Embora tenha havido pousos nos demais horários, a proteção repelente caiu apenas 1,5%, obtendo uma proteção final de 98,5%. O resultado obtido neste estudo corrobora com o exposto por Lupi et al. (2013). Segundo os autores, o DEET a 4% forneceu proteção contra o mosquito *Ae. aegypti* em condições de laboratório por um período de 60 minutos. Os resultados do DEET são condizentes com a baixa volatilidade que o repelente possui (Deletre et al. 2013). Embora eficiente, o DEET oferece riscos para a saúde humana e para o meio ambiente (Ma et al. 2017, Vama-Etienne et al. 2020, Gao et al. 2020).

Vale ressaltar que as porcentagens de proteção contra pousos do óleo essencial de *Cr. tetradenius* não diferiu dos controles positivos, o que demonstra que além do potencial repelente que este óleo possui, a proteção é similar ao óleo essencial de *Cy. nardus* e ao repelente sintético DEET. Na concentração avaliada do óleo essencial de *Cr. tetradenius*, foi observado uma proteção de 100% contra repasto sanguíneo por 240 minutos. Assim como nos demais controles positivos, o que não foi observado nos controles negativos, (**Tabela 4**).

Em relação ao DEET, é sabido que embora possa exercer uma repelência envolvendo o sistema olfativo, também pode desencadear em insetos uma atividade antialimentar (Dickens e Bohbot 2013, Degennaro 2015, Lu et al. 2017). Um estudo demonstrou evidencia, que o comportamento antialimentar do DEET envolvendo o mosquito *Ae. aegypti*, é desencadeada a partir de células gustativas presentes na labela do inseto (Sanford et al. 2013). De acordo com Dennis et al. (2019), esses tipos de dados apoiam a hipótese de que o DEET é amargo por

ingestão, mas seu amargor por si só não explica a inibição completa da alimentação de sangue no contato com o repelente, o que foi observado no presente estudo.

Nesse sentido, Dennis et al. (2019), ao avaliarem o comportamento antialimentar do *Ae. aegypti* em diferentes bioensaios contendo o DEET, observaram, que os mosquitos alimentaram-se de sangue misturado com o repelente em um ensaio com alimentador Glytube. O que não ocorreu, quando tanto patas e probóscide, tiveram contato com o repelente aplicado na superfície da membrana do alimentador. Mesmos resultados foram vistos em humanos com teste em braço, nos quais observaram alimentação sanguínea quando houve contato apenas da probóscide com a pele contendo repelente, e completa inibição alimentar no momento em que as patas dos mosquitos, também entraram em contato com o repelente sobre a pele.

Os autores sugeriram que este resultado poderia estar relacionado com a ação do repelente em classes de receptores gustativos restritos nos tarsos do mosquito e não na probóscide. A percepção química através dos tarsos já foi descrito em *Ae. aegypti* (Mciver e Siemicki, 1978). A partir destes resultados, sugere-se que este alvo também possa estar envolvido no comportamento antialimentar dos mosquitos fêmeas de *Ae. aegypti* em relação ao óleo essencial de *Cr tetradenius* e o seu controle positivo óleo essencial *Cy. nardus*.

Para tal propriedade óleos essenciais podem apresentar, pois na natureza atuam com diferentes atividades biológicas na defesa química vegetal, tornando plantas pouco palatáveis ou tóxicas para insetos herbívoros. Esta propriedade também pode ser apresentada para insetos hematófagos (Dhifi et al 2016).

Como exemplo, encontra-se o estudo desenvolvido por Govindarajan et al. (2016a), que ao avaliarem a atividade repelente do óleo essencial extraído do rizoma de *Zingiber nimmonii* (J.Graham) Dalzell em diferentes concentrações sobre diferentes mosquitos, entre eles, *Ae. aegypti*, demonstraram que óleo essencial a 5,0 mg/cm² forneceu 100% de proteção contra o repasto em até 150 minutos. O estudo realizado por Govindarajan et al. (2016b), ao avaliarem o potencial repelente do óleo essencial de *Origanum scabrum* (Boiss. & Heldr, 1846) em diferentes concentrações sobre diferentes mosquitos, entre eles, *Ae. aegypti*, demonstraram que óleo essencial a 5,0 mg/cm² forneceu 100% de proteção contra repasto em até 180 minutos.

Tal ação, pode agregar aos óleos essenciais não somente a sua capacidade de proteção em evitar pousos de mosquitos, mas também, de evitar uma alimentação sanguínea. Principalmente por mosquitos vetores, pois este fator é o determinante para a transmissão de arbovírus, como a DEN, CHIK e Zika (Gutiérrez-Bugallo et al. 2017).

O tempo de proteção oferecida contra repasto sanguíneo no presente estudo pelo DEET durante os 240 minutos, pode estar relacionada à persistência do composto no tecido tule devido à menor taxa de volatilização que o repelente possui. Um estudo verificou, que o DEET permaneceu ativo em um tecido por mais de 28 semanas, oferecendo 100% de proteção contra picadas de mosquitos *Ae. aegypti*, em uma concentração de 4,66 g/m² (Faulde et al. 2010).

Embora a diminuição no tempo de proteção repelente do óleo essencial de *Cr. tetradenius* e o seu controle positivo óleo essencial de *Cy. nardus* possam estar relacionada a alta volatilização, vale ressaltar, que óleos essenciais possuem complexa constituição química, e a proteção contra repasto sanguíneo por 240 minutos, tanto pode estar relacionada aos componentes majoritários, quanto a uma ação sinérgica destes componentes com constituintes em menores porcentagens (Omolo et al. 2004, Deletre et al. 2013). Sobretudo com compostos pertencente à classe dos sesquiterpenos, os quais possuem menos volatilidade e efeito duradouro, conforme ressalta Costa et al. (2017).

Em relação aos controles negativos, tela com e sem a emulsão não iônica, não houve diferença significativa entre os resultados, os quais, não demonstraram potencial em evitar pousos e realização de repasto sanguíneo. Visto que, a atratividade dos mosquitos à membrana, contendo sangue do alimentador artificial e posteriormente a realização de repasto, ocorreu desde o primeiro minuto de avaliação. O que demonstra a confiabilidade da proteção oferecida pelo óleo essencial de *Cr. tetradenius* e dos controles positivos.

3.5 Conclusão

O óleo essencial das folhas de *Cr. tetradenius* demonstrou potencial repelente sobre o mosquito *Ae. aegypti*, oferecendo proteção contra pousos e eficiência em inibir 100% de repasto sanguíneo, sendo ambas proteções equivalente ao DEET e ao óleo essencial de *Cy. nardus*. A sua composição química foi composta por monoterpenos e sesquiterpenos, sendo a cânfora, p-cimeno, α -terpineno e γ -terpineno os componentes majoritários.

3.6 Agradecimentos

A Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB).

3.7 Referências

Adams, R. P. 2007. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry, 4th ed. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, IL.

Afify, A, e C. J. Potter. 2020. Insect repellents mediate species-specific olfactory behaviours in mosquitoes. *Malar. J.* 19: 1-10.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2017. Consumo e saúde: Os cuidados na escolha e no uso de repelentes. (<http://antigo.anvisa.gov.br/documents/111522/3568110/Revista+Consumo+e+Sa%C3%BAAd e++Volume+3/9f5e4354-6c68-4e93-b3eb-93dab4fc1c60?version=1.1>).

Almeida-Pereira, C. S., P.C.D.L. Nogueira, A.A.T. Barbosa, D.A.D.C. Nizio, M.D.F. Arrigoni-Blank, T.S. Sampaio, R. P. Alves, H.G.S. Araujo-Couto, R. B. Feitosa-Alcantara, J.O. Melo, A.F. Blank. 2019. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of a *Croton tetradenius* Baill. germplasm. *J. Essent. Oil Res.* 31: 379-389.

Andrade, C. F. S. 2008. Repelentes de mosquitos–base técnica para avaliação. (<http://www.ib.unicamp.com.br/profs/eco_aplicada/>).

Anjos, Q. Q. A., S. L. D. C. Silva, D. C. Silva, S. A. Gualberto, F. R. Santos, M. G. Carvalho, e D. L. Sousa. 2018. Chemical composition of the essential oil of the *Croton tetradenius* (Euphorbiaceae) aerial part and bioactivity on *Aedes aegypti* (diptera: culicidae) in relation to different collection periods. *Periodico tche Quimica.* 15: 364-379.

Arpiwi, N. L., I. K. Muksin, e N. L. Kartini. 2020. Essential oil from *Cymbopogon nardus* and repellent activity against *Aedes aegypti*. *Biodiversitas.* 21: 3873-3878.

Auysawasdi, N., S. Chuntranuluck, V. Keeratinijakal, S. Phasomkusolsil, e S. A. Davidson. 2017. An in vitro study of the bioefficacy of essential oil blends against *Aedes aegypti* (Linn.) and *Anopheles dirus* (Peyton and Harrison) by using membrane feeding apparatus. *J. Coastal Life Med.* 5: 82-87.

Awada, F., A. Kobaissi, A. Chokr, K. Hamze, S. Hayar, A. Mortada. 2012. Factors affecting quantitative and qualitative variation of thyme (*Origanum syriacum* L.) essential oil in Lebanon. *Adv. Environ. Biol.* 1509-1515.

Azeem, M., T. Zaman, M. Tahir, A. Haris, Z. Iqbal, M. Binyameen, A. Nazire, S.A. Shadb, S. Majeed, e R. MOZÛRAITIS. 2019. Chemical composition and repellent activity of native plants essential oils against dengue mosquito, *Aedes aegypti*. *Ind. Crops Prod.* 140: 111609.

Balasubramani, S., G. Sabapathi, A. K. Moola, R. V. Solomon, P. Venuvanalingam, e R. K. B. Diana. 2018. Evaluation of the leaf essential oil from *artemisia vulgaris* and its larvicidal and repellent activity against dengue fever vector *Aedes aegypti*. An experimental and molecular docking investigation. *ACS omega.* 3: 15657-15665.

Benelli, G., R. Pavela, R. Petrelli, L. Cappellacci, A. Canale, S. Senthil-Nathan, e F. MAGGI. 2018. Not just popular spices! Essential oils from *Cuminum cyminum* and *Pimpinella anisum*

are toxic to insect pests and vectors without affecting non-target invertebrates. *Ind. Crops Prod.* 124: 236-243.

Blackwell, A., A. E. Stuart, e B. B. Estambale. 2003. The repellent and antifeedant activity of *Myrica gale* oil against *Aedes aegypti* mosquitoes and its enhancement by the addition of salicylic acid. *J R Coll Physicians Edinb.* 33: 209-214.

Campbell, C., R. Gries, e G. Gries. 2011. Forty-two compounds in eleven essential oils elicit antennal responses from *Aedes aegypti*. *Entomol. Exp. Appl.* 138: 21-32.

Carvalho, K. S., S. L. D. C. Silva, I. A.D. Souza, S. A. Gualberto, R. C. D. Cruz, F. R. Santos, e M. G. Carvalho. 2016. Toxicological evaluation of essential oil from the leaves of *Croton tetradenius* (Euphorbiaceae) on *Aedes aegypti* and *Mus musculus*. *Parasitol. Res.* 115: 3441-3448.

Castro, H. G. D., V. B. D. M. Perini, G. R. D. 2010. Santos, T. C. A. B. Leal. Avaliação do teor e composição do óleo essencial de *Cymbopogon nardus* (L.) em diferentes épocas de colheita. *Revista Ciência Agronômica.* 41: 308-314.

Cerceau, C. I., L. C. Barbosa, E. S. Alvarenga, C. R. Maltha, e F. M. Ismail. 2020. ¹H-NMR and GC for detection of adulteration in commercial essential oils of *Cymbopogon ssp.* *Phytochem. Anal.* 31: 88-97.

Chauhan, N., A. Malik, e S. Sharma. 2018. Repellency potential of essential oils against housefly, *Musca domestica* L. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25: 4707-4714.

Chellappandian, M., P. Vasantha-srinivasan, S. Senthil-nathan, S. Karthi, A. Thanigaivel, A. Ponsankar, K. Kalaivani e W. B. Hunter. 2018. Botanical essential oils and uses as mosquitocides and repellents against dengue. *Environ Int.* 13: 214-230.

Cockcroft, A., J.B. Cosgrove, e R. J. Wood. 1998. Comparative repellency of commercial formulations of DEET, permethrin and citronellal against the mosquito *Aedes aegypti*, using a collagen membrane technique compared with human arm tests. *Med Vet Entomol.* 12: 289.

Costa, A. A., C.V. Naspi, A. Lucia, e H. M. Masuh. 2017. Repellent and larvicidal activity of the essential oil from *Eucalyptus nitens* against *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* 54: 670-676.

Cruz, R. C. D., S. L. C. E. Silva, I. A. Souza, S. A. Gualberto, K. S. Carvalho, F.R. Santos, e M.G. Carvalho. 2017. Toxicological evaluation of essential oil from the leaves of *Croton argyrophyllus* (Euphorbiaceae) on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) and *Mus musculus* (Rodentia: Muridae). *J. Med. Entomol.* 54: 985-993.

De Albuquerque, U. P, e L.D.H.C. Andrade. 2002. Uso de recursos vegetais da Caatinga: o caso do agreste do estado de Pernambuco (Nordeste do Brasil). *Interciencia.* 27: 336-346.

Degennaro, M. 2015. The mysterious multi-modal repellency of DEET. *Fly.* 9: 45-51.

Degennaro, M., C.S. McBride, L. Seeholzer, T. Nakagawa, E.J. Dennis, C. Goldman, N. Jasinskiene, A.A. Ames, e L.B. Vosshall. 2013. Orco mutant mosquitoes lose strong preference for humans and are not repelled by volatile DEET. *Nature.* 498: 487-491.

Deletre, E., T. Martin, P. Campagne, D. Bourguet, A. Cadin, C. Menut, R. Bonafos, F. Chandre. 2013. Repellent, irritant and toxic effects of 20 plant extracts on adults of the malaria vector *Anopheles gambiae* mosquito. PloS one. 8: 82103.

Dennis, E. J., O. V. Goldman e L.B. Vosshall. 2019. *Aedes aegypti* mosquitoes use their legs to sense DEET on contact. Curr. Biol. 29: 1551-1556.

Dhifi, W., S. Bellili, S. Jazi, N. Bahloul, e W. Mnif. 2016. Essential oils' chemical characterization and investigation of some biological activities: a critical review. Medicines. 3: 2-16.

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

Estrada, J. L. T., K.E.P. Moscoso, I.F. Salas, N. L. Achee, e J. P. Grieco. 2019. Spatial repellency and other effects of transfluthrin and linalool on *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. J Vector Ecol. 44: 89-93.

Faulde, M. K., G. Albiez, e O. Nehring. 2010. Insecticidal, acaricidal and repellent effects of DEET-and IR3535-impregnated bed nets using a novel long-lasting polymer-coating technique. Parasitol. Res. 106: 957-965.

França, L. S., C. M. A. D. Macedo, S. N. S. Vieira, A. T, Santos, G. D. J. C, Sanches, J.M. SILVA, M. B. Almeida, R. D. B. SILVA. 2017. Desafios para o controle e prevenção do mosquito *Aedes aegypti*. Revista de Enfermagem UFPE on line. 11: 4913-4918.

Gao, X., X. Wang, J. LI, S. Ai, X. Fu, B. Fan, e Z. Liu. 2020. Aquatic life criteria derivation and ecological risk assessment of DEET in China. Ecotoxicol. Environ. Saf. 188: 109881.

Govindarajan, M., M. Rajeswary, S. Arivoli, S. Tennyson, e G. Benelli .2016a. Larvicidal and repellent potential of *Zingiber nimmonii* (J. Graham) Dalzell (Zingiberaceae) essential oil: an eco-friendly tool against malaria, dengue, and lymphatic filariasis mosquito vectors. Parasitol. Res. 115: 1807-1816.

Govindarajan, M., S. Kadaikunnan, N.S. Alharbi, e G. Benelli.2016b. Acute toxicity and repellent activity of the *Origanum scabrum* Boiss. & Heldr.(Lamiaceae) essential oil against four mosquito vectors of public health importance and its biosafety on non-target aquatic organisms. Environ. Sci. Pollut. Res. 23: 23228-23238.

Grieco, J. P., N. L. Achee, M. R. Sardelis, K. R. Chauhan, e D. R. Roberts. A novel high-throughput screening system to evaluate the behavioral response of adult mosquitoes to chemicals. 2005. J. Am. Mosq. Control Assoc. 21: 404-411.

Gutiérrez-Bugallo, G., R. Rodriguez-Roche, G. Díaz, A. A. Vázquez, M. Alvarez, M. Rodríguez, e M.G. Guzman. 2017. First record of natural vertical transmission of dengue virus in *Aedes aegypti* from Cuba. Acta Trop.174: 146-148.

- Hamid, H. A., N. Silvarajoo, e N. A. Hamid. 2020. Chemical composition and repellent activity against mosquito *Aedes aegypti* of *Pelargonium radula*, *Syzygium aromaticum* and *Citrus aurantifolia* essential oils. In: Mater. Sci. Forum. 981: 253-257.
- Henriques, C. M. P., E. Duarte e L.P. Garcia. 2016. Desafios para o enfrentamento da epidemia de microcefalia. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*. 25: 1- 10.
- Jahn, A., S. Y. KIM, J. H. Choi, D. D. Kim, Y. J. Ahn, C. S. Yong, e J. S. Kim. 2010. A bioassay for mosquito repellency against *Aedes aegypti*: method validation and bioactivities of DEET analogues. *J. Pharm. Pharmacol.* 62: 91-97.
- Jiang, S., L. Yang, J. R. Bloomquist. 2019. High-throughput screening method for evaluating spatial repellency and vapour toxicity to mosquitoes. *Med Vet Entomol.* 33: 388-396.
- Júnior, R. J. I, e A. L. P. Melo. 2008. Guia prático para utilização do Sistema para análises estatísticas – SAEG, BR. 288.
- Kwon, Y., S. H. KIM, D.S. Ronderos, Y. Lee, B. Akitake, O. M. Woodward, B. G. William, P. S. Dean, e C. Montell. 2010. Drosophila TRPA1 channel is required to avoid the naturally occurring insect repellent citronellal. *Curr. Biol.* 20: 1672-1678.
- Lee, M. Y. 2018. Essential oils as repellents against arthropods. *BioMed Res. Int.* 2018: 9.
- Lorenz, C., E. L. Breviglieri, e F. Virgínio. 2018. O fantástico mundo dos mosquitos, 1ª. ed. Livro novo, BR. 1-141. (<https://repositorio.butantan.gov.br/handle/butantan/3364>).
- Lu, W., J. K. Hwang, F. Zeng, e W. S. Leal. 2017. DEET as a feeding deterrent. *PLoS One.* 12: 0189243.
- Lupi, E., C. Hatz, e P. Schlagenhauf. 2013. The efficacy of repellents against *Aedes*, *Anopheles*, *Culex* and *Ixodes spp.*—A literature review. *Travel Med Infect Dis.* 11: 374-411.
- Ma, R., B. Wang, L. Yin, Y. Zhang, S. Deng., J. Huang, Y. Wang, G. Yu. 2017. Characterization of pharmaceutically active compounds in Beijing, China: occurrence pattern, spatiotemporal distribution and its environmental implication. *J. Hazard. Mater.* 323: 147-155.
- Maia, M. F., e S. J. Moore. 2011. Plant-based insect repellents: a review of their efficacy, development and testing. *Malar. J.* 10: 11.
- Manh, H. D, e O. T. Tuyet. 2020. Larvicidal and repellent activity of *Mentha arvensis* L. essential oil against *Aedes aegypti*. *Insects.* 11: 198.
- Mciver, S., e R. Siemicki. 1978. Fine structure of tarsal sensilla of *Aedes aegypti* (L.)(Diptera: Culicidae). *J. Morphol.* 155: 137-155.
- Ministério da Saúde. 2013. Agência nacional de vigilância sanitária: resolução da diretoria colegiada.: 1- 4.

Misni, N., Z. M. Nor e R. Ahmad. 2017. Repellent effect of microencapsulated essential oil in lotion formulation against mosquito bites. *J. Vector Borne Dis.* 54: 44.

Moore, E. L., M. A. Scott, S. D, Rodriguez, S. Mitra, J. Vulcan, J. J. Cordova, e I. A. Hansen. 2018. An online survey of personal mosquito-repellent strategies. *PeerJ.* 6: 5151.

Morais, S. M., E. S. Cavalcanti, L. M. Bertini, C. L. Oliveira, J. R. Rodrigues, e J. H. Cardoso. 2006. Larvicidal activity of essential oils from Brazilian *Croton* species against *Aedes aegypti* L. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 22: 161-164.

Morais, S. M., E. S. Cavalcanti, L. M. Bertini, C. L. Oliveira, J. R. Rodrigues, e J. H. Cardoso. 2006. Larvicidal activity of essential oils from Brazilian *Croton* species against *Aedes aegypti* L. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 22: 161-164.

Nerio, L. S., J. Olivero-Verbel, e E. Stashenko. 2010. Repellent activity of essential oils: a review. *Bioresour. Technol.* 101: 372-378.

Nyamador, S. W., A. D. Mond&edji, B. D. Kassene, G. K. Ketoh, H. E. K. Koumaglo, I. A. Glitho. (2017). Insecticidal activity of four essential oils on the survival and oviposition of two sympatric bruchid species: *Callosobruchus maculatus* F. and *Callosobruchus subinnotatus* PIC.(Coleoptera: Chrysomelidea: Bruchinae). *J. Stored Prod. Postharvest Res.* 8:103-112.

OPASa Organização Pan-Americana da Saúde. 2020. Epidemiological Update Dengue. (https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&view=download&category_slug=dengue-2217&alias=51690-7-february-2020-dengue-epidemiological-update1&Itemid=270&lang=em).

OPASb Organização Pan-Americana da Saúde. 2020. Epidemiological Update Dengue and other Arboviruses. (file:///C:/Users/Daniel/Downloads/2020-june-10-phe-epi-update-dengue-other-arboviruses%20(1).pdf).

Omolo, M. O., D. Okinyo, I. O. Ndiege, W. Lwande, e A. Hassanali. 2004. Repellency of essential oils of some Kenyan plants against *Anopheles gambiae*. *Phytochemistry.* 65: 2797-2802.

Onoabedje, U. S., S. I. Inya-Agha, C. O. Ezugwu, M. O. Agbo, e E. A. Onoabedje. 2019. Pharmacognostic, antimicrobial and mosquito repellent properties of *Acalypha fimbriata* (Euphorbiaceae) leaf extract. *Trans. R. Soc. S. Afr.* 74: 151-162.

Paluch, G., J. Grodnitzky, L. Bartholomay, J. Coats. 2009. Quantitative structure– activity relationship of botanical sesquiterpenes: Spatial and contact repellency to the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *J. Agric. Food Chem.* 57: 7618-7625.

Pauletti, G. F., W.P. Silvestre. 2018. Óleo essencial cítrico: produção, composição e fracionamento. Em: C.F.S. Efrom e P.V.D. Souza (eds), *Citricultura do Rio Grande do Sul: indicações técnicas*. Secretaria de Agricultura, Pecuária e Irrigação, Porto Alegre, BR. 245-269.

Politi, F. A. S., A. A. Souza Júnior, R. R. Fantatto, R. C. L. R. Pietro, W. Barioni Junior, M. D. Rabelo, H. R. Bizzo, A. C. S., Chagas, e M. Furlan. 2018. Chemical composition and in vitro anthelmintic activity of extracts of *tagetes patula* against a multidrug - Resistant isolate of *Haemonchus contortus*. Chem. Biodiversity. 15: 1700507.

PPDB Pesticide Properties DataBase 2016.
(<http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/Reports/1190.htm>).

Rehman, J. U., A. ALI, e I. A. Khan. 2014. Plant based products: use and development as repellents against mosquitoes: a review. Fitoterapia. 95: 65-74.

Robertson, J. L., R. M. Russell, e N. E. Savin. 1980. POLO: A user's guide to Probit Or LOGit analysis. Forest Service, General Technical Report PSW-38, US

Rodriguez, S. D., H. N. Chung, K. K. Gonzales, J. Vulcan, Y. Li, J. A. Ahumada, e I. A. Hansen. 2017. Efficacy of some wearable devices compared with spray-on insect repellents for the yellow fever Mosquito, *Aedes aegypti* (L.)(Diptera: Culicidae). J. Insect Sci. 17: 24.

Royal, D. N., R. Goswami, e A. PAL. 2017. The insect repellents: A silent environmental chemical toxicant to the health. Environ. Toxicol. Pharmacol. 50: 91-102.

Sanford, J. L., V. D. Shields, e J. C. Dickens. 2013. Gustatory receptor neuron responds to DEET and other insect repellents in the yellow-fever mosquito, *Aedes aegypti*. Sci. Nat. 100: 269-273.

Santos, A. S., S.D.M. Alves, F.J.C. Figueiredo, and O. G. Da Rocha Neto. 2004. Descrição do sistema e de métodos de extração de óleos essenciais e determinação de umidade de biomassa em laboratório. Embrapa Amazônia Oriental. Comunicado técnico 1-6.

Souza, M. A. D., L. Silva, M. J. F. Macêdo, L. J. Lacerda-Neto, M. A. C. SANTOS, H. D. M. Coutinho e F. A. B. Cunha. 2019. Adulticide and repellent activity of essential oils against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) – A review. S. Afr. J. Bot. 124: 160-165.

Sritabutra, D., e M. SOONWERA. 2013. Repellent activity of herbal essential oils against *Aedes aegypti* (Linn.) and *Culex quinquefasciatus* (Say.). Asian Pac. J. Trop. Dis. 3: 271-276.

Stanczyk, N. M., J. F. Brookfield, L. M. Field, e J. G. Logan. 2013. *Aedes aegypti* mosquitoes exhibit decreased repellency by DEET following previous exposure. PLoS One.8: 54438.

Stanczyk, N. M., J. F. Brookfield, R. Ignell, J. G. Logan, e L. M. FIELD. 2010. Behavioral insensitivity to DEET in *Aedes aegypti* is a genetically determined trait residing in changes in sensillum function. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 107: 8575-8580.

Tavares, M., M. R. M., Silva, L. B. D. O. Siqueira, R. A. S, Rodrigues, L. Bodjolle-D'almeida, E. P. SANTOS, E. Ricci-júnior. 2018. Trends in insect repellent formulations: a review. Int J Pharm. 539: 190-209.

Thompson, J. D., J. C. Chalchat, A. Michet, Y. B. Linhart, B. Ehlers. 2003. Qualitative and quantitative variation in monoterpene co-occurrence and composition in the essential oil of *Thymus vulgaris* chemotypes. J Chem Ecol. 29: 859-880.

Uc-Puc, V., J. Herrera-Bojórquez, C. Carmona-Carballo, A. Chemendoza, A. Medina-Barreiro, A. J. Chablé-Santos, e P. Manriquesaide. 2016. Efectividad de repelentes comerciales disponibles contra el mosquito *Aedes aegypti* (L.) em Yucatán, México. *Rev. Invest. Salud Publica*. 58: 472-475.

Vama-Etienne, T., D. J. Christian, e A. A Augustion. 2020. Repellent effect of some essential oil from Ivorian ethnomedicinal plant against malaria vector, *Anopheles gambiae* (Giles, 1902). *Int J Mosq Res*. v. 7: 16-24.

Vongsombath, C., K. Pålsson, L. Björk, A. K. Borg-Karlson, e T. G. Jaenson. 2014. Mosquito (Diptera: Culicidae) repellency field tests of essential oils from plants traditionally used in Laos. *J. Med. Entomol*. 49: 1398-1404.

(WHO) World Health Organization. 2009. Guidelines for efficacy testing of mosquito repellents for human skin. (<https://apps.who.int/iris/handle/10665/70072>).

(WHO) World Health Organization. 2013. Guidelines for efficacy testing of spatial repellents. (https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/78142/9789241505024_eng.pdf?sequence=)

Wu, W., S. Li, M. Yang, Y. Lin, K. Zheng, K.S. Akutse. 2020. Citronellal perception and transmission by *Anopheles gambiae* ss (Diptera: Culicidae) females. *Sci. Rep*. 10: 1-10.

Yoon, J. K., K. C. Kim, Y. Cho, Y. D. Gwon, H. S. Cho, Y. Heo, Y., K. Park, Y. W. Lee, M. Kim, Y. K. Oh, Y.B . Kim. 2015. Comparison of repellency effect of mosquito repellents for DEET, citronella, and fennel oil. *J Parasitol Res*. 2015: 361021.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Consumo e saúde: os cuidados na escolha e no uso de repelentes. 2017. (<<http://portal.anvisa.gov.br/documents/111522/3568110/Revista+Consumo+e+Sa%C3%BAde+-+Volume+3/9f5e4354-6c68-4e93-b3eb-93dab4fc1c60->>).

Aguiar, R. W. S., S. F. Santos, F. S. Morgado, S. D. Ascencio, M. M. Lopes, K. F. Viana, J. Dindonet, B. M. Ribeiro. 2015. Insecticidal and repellent activity of *Siparuna guianensis* Aubl.(Negramina) against *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. *PloS one*.10: 0116765.

Andrade, C. F. S. 2008. Repelentes de mosquitos–base técnica para avaliação. (<http://www.ib.unicamp.com.br/profs/eco_aplicada/>>).

Anjos, Q. Q. A., S. L. D. C. Silva, D. C. Silva, S. A. Gualberto, F. R. Santos, M. G. Carvalho, e D. L. Sousa. 2018. Chemical composition of the essential oil of the *Croton tetradenius* (Euphorbiaceae) aerial part and bioactivity on *Aedes aegypti* (diptera: culicidae) in relation to different collection periods. *Periodico tche Quimica*. 15: 364-379.

Anumol, T., A. Vijayanandan, M. Park, L. Philip, e S. A. Snyder. 2016. Occurrence and fate of emerging trace organic chemicals in wastewater plants in Chennai, India. *Environ Int*. 92: 33-42.

B. K. Tyagi. 2016. Advances in vector mosquito control technologies, with particular reference to herbal products. In: Herbal insecticides, repellents and biomedicines: effectiveness and commercialization. :1-9.

Bennett, K. L., F. SHIJA, Y. M. Linton, G. 2016. Misinzo, M. Kaddumukasa, R. Djouaka e A. Prakash. Historical environmental change in Africa drives divergence and admixture of *Aedes aegypti* mosquitoes: a precursor to successful worldwide colonization. Mol. Ecol. 25: 4337-4354.

Benotti, M. J., B. D. Stanford, E. C. Wert, e S. A. Snyder. 2009. Evaluation of a photocatalytic reactor membrane pilot system for the removal of pharmaceuticals and endocrine disrupting compounds from water. Water Res. 43: 1513-1522.

Blackwell, A., A. E. Stuart, e B. B. Estambale. 2003. The repellent and antifeedant activity of *Myrica gale* oil against *Aedes aegypti* mosquitoes and its enhancement by the addition of salicylic acid. J R Coll Physicians Edinb. 33: 209-214.

Blanco, W., e J. T. Roberts. 1992. Herodotus, the histories. Norton Critical, EUA.
BRASIL, L. Lei nº 9.782, de 26 de janeiro de 1999. 1999. Define o sistema nacional de vigilância sanitária, cria a Agência nacional de vigilância sanitária, e dá outras providências. Diário Oficial da União. 1:.

Brasil. 2020. Ministerio do Meio Ambiente. Biodiversidade Brasileira. (<https://antigo.mma.gov.br/biodiversidade/biodiversidade-brasileira.html>).

Butnario, M., e I. Sarac. Essential oils from plants. 2018. JBBS. 1: 4.

Campos, D., C. Gravato, C. Quintaneiro, A. M. Soares, e J. L. 2016. Pestana. Responses of the aquatic midge *Chironomus riparius* to DEET exposure. Aquat. Toxicol. 172: 80-85.

Carpenter, G. H. 2005. The life-story of insects, 0 ed. Cambridge University Press, EUA.

Christophers, S. 1960. *Aedes aegypti* (L.) the yellow fever mosquito: its life history, bionomics and structure, 57ed. Cambridge University Press, EUA.

Consoli, R. A. G. B., e R. L. Oliveira. 1994. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil, 1.ed. Fiocruz, BR.

Cordeiro, I., e D.S.T. Carneiro. M.R.V. Barbosa, C. Sothers, S. Mayo, C.F.L. Gamarra e A.C. Mesquita. 2006. Checklist das plantas do Nordeste brasileiro, Angiospermas e Gymnospermas. Ministério da Ciência e Tecnologia. 1: 71-74.

Costa, E. M. D. S., R. V. D. Cunha, e E. A. D. 2018. Costa. Avaliação da implantação do programa de controle da dengue em dois municípios fronteiriços do estado de Mato Grosso do Sul, Brasil, 2016. Epidemiologia e Serviços de Saúde. 27: 2017478.

Costa, Z. G. A., A. P. ROMANO, A. N. M. Elkhoury, e B. Flannery. 2011. Evolução histórica da vigilância epidemiológica e do controle da febre amarela no Brasil. Revista Pan-Amazônica de Saúde. 2: 11-26.

Cruz, R. C. D., S. L. C. E. Silva, I. A. Souza, S. A. Gualberto, K. S. Carvalho, F.R. SANTOS, e M.G. CARVALHO. 2017. Toxicological evaluation of essential oil from the leaves of *Croton argyrophyllus* (Euphorbiaceae) on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) and *Mus musculus* (Rodentia: Muridae). *J. Med. Entomol.* 54: 985-993.

Custódio, J. M. D. O., L. M. S. Nogueira, D. A. Souza, M. F. Fernandes, E. T. Oshiro, E. F. D. Oliveira, e A. G. D. Oliveira. 2019. Abiotic factors and population dynamic of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in an endemic area of dengue in Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.* 61: 1-9.

Trovão, D. M. B. M., P. D. Fernandes, L. A. De Andrade, e J. D. Neto. 2007. Variações sazonais de aspectos fisiológicos de espécies da Caatinga. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental.* 11: 307-311.

Das, N.G., I. Baruah, P.K, Talukdar e S.C, Das. 2003. Evaluation of botanicals as re-pellents against mosquitoes. *J Vector Borne Dis.* 40: 49–53.

De Albuquerque, U. P., e L.D.H.C. Andrade. 2002. Uso de recursos vegetais da Caatinga: o caso do agreste do estado de Pernambuco (Nordeste do Brasil). *Interciencia.* 27: 336-346.

De gerónimo, E., V. C. Aparicio, S. Bárbaro, R. Portocarrero, S. Jaime, e .L. Costa. 2014. Presence of pesticides in surface water from four sub-basins in Argentina. *Chemosphere.* 107: 423-431.

Debboun, M., S. P. Frances, e D. Strickman. 2006. *Insect repellents: principles, methods, and uses*, 1ed. CRC Press, EUA.

Degennaro, M. 2015. The mysterious multi-modal repellency of DEET. *Fly.* 9: 45-51.

Dennis, E. J., O. V. Goldman e L.B. Vosshall. 2019. *Aedes aegypti* mosquitoes use their legs to sense DEET on contact. *Curr. Biol.* 29: 1551-1556.

Dhifí, W., S. Bellili, S. Jazi, N. Bahloul, e W. MNIF. 2016. Essential oils' chemical characterization and investigation of some biological activities: a critical review. *Medicines.* 3: 2-16.

Dick, O. B., J. L. S. Martín, R. H. Montoya, J. D. DIEGO, B. Zambrano, e G. H. Dayan, G. H. 2012. *Am J Trop Med Hyg.*87: 584-593.

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

(DIVE) Diretoria de Vigilância Epidemiológica. Guia de orientação para treinamento de técnicos de laboratório de entomologia. 2015. (<http://www.dive.sc.gov.br/conteudos/zoonoses/capacitacao/guiaorientacaotreinamento-de-tecnicos.pdf>).

(DIVE) Diretoria de Vigilância Epidemiológica. Vigilância e controle do *Aedes aegypti* orientações técnicas para pessoal de campo. 2019. (<http://www.dive.sc.gov.br/conteudos/publicacoes/DengueManual-Visualizacao.pdf>).

(EMBRAPA) Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária .2010. Plantas Mediciniais nos Biomas Brasileiros: pesquisas da EMBRAPA.: 1-16.

Faull, K. J., e C. R. WILLIAMS. 2015. Intraspecific variation in desiccation survival time of *Aedes aegypti* (L.) mosquito eggs of Australian origin. *J Vector Ecol.* 40: 292-300.

Feio, M. J., e M. A. S. 2000. Graça. Food consumption by the larvae of *Sericostoma vittatum* (Trichoptera), an endemic species from the Iberian Peninsula. *Hydrobiologia.* 439: 7-11.

Félix, V. P. D. S. R., e A. M. D. 2019. Farias. Microcefalia e dinâmica familiar: a percepção do pai frente à deficiência do filho. *Cadernos de Saúde Pública.* 34: 0022-0316.

Felliu, D.A. 2011. Análise de Terpenos de Espécies de *Croton* sect. *Lamprocroton* (Mull.Arg) Pax (Euphorbiaceae). Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências das Universidade de São Paulo.: 108.

Feres, V. C. R., C. M. T. Martelli, M. D. Turchi, J. B. S, Junior, R. M. R. Nogueira, B. A. M. Rocha, e D.D.D. P. Cardoso. 2006. Laboratory surveillance of dengue virus in central Brazil. 1994–2003. *J. Clin. Virol.* 37: 179-183.

Ferreira, A. B. H. 1987. Novo Dicionário do Língua Portuguesa, 2ed. Nova Fronteira, BR.

Forattini, O. P. 2002. Culicidologia Médica, 1ed. Universidade de São Paulo, BR.

Freitas, M. T. 2017. Planeta invertebrados.(http://www.planetainvertebrados.com.br/index.asp?pagina=especies_ver&id_categoria=28&id_subcategoria=0&com=1&id=295&local=2>)

Garg, P., P. Khatri, e D. Gandhi. 2011. Plant tissue culture of *Jatropha curcas* L.: a review. *Imperial J. Pharm. Nat. Prod.* 1: 2248-9754.

Giulietti, A. M., A. L. D. Neta, A. A. C. Rojas, E. V. S. Sampaio, J. S. Virgínio, J. F. Virgínio,

L. P. Queiroz, M. J, Figueiredo, M. J. N, Rodal, M. R. V. Barbosa, R. M. Harley. 2004. Diagnóstico da vegetação nativa do bioma Caatinga. In: Biodiversidade da Caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação. Ministério do Meio Ambiente, Brasília.

Govindarajan, M., M. Rajeswary, S. Arivoli, S. Tennyson, e G. Benelli .2016a. Larvicidal and repellent potential of *Zingiber nimmonii* (J. Graham) Dalzell (Zingiberaceae) essential oil: an eco-friendly tool against malaria, dengue, and lymphatic filariasis mosquito vectors. *Parasitol. Res.* 115: 1807-1816.

Govindarajan, M., M. Rajeswary, S. Senthilmurugan, P. Vijayan, N. S. Alharbi, S. Kadaikunnan, e G. Benelli. 2018. Larvicidal activity of the essential oil from *Amomum subulatum* Roxb.(Zingiberaceae) against *Anopheles subpictus*, *Aedes albopictus* and *Culex tritaeniorhynchus* (Diptera: Culicidae), and non-target impact on four mosquito natural enemies. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 101: 219-224.

Govindarajan, M., S. Kadaikunnan, N.S. Alharbi, e G. Benelli. 2016b. Acute toxicity and repellent activity of the *Origanum scabrum* Boiss, e Heldr. (Lamiaceae) essential oil against four mosquito vectors of public health importance and its biosafety on non-target aquatic organisms. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23: 23228-23238.

Gutiérrez-Bugallo, G., R. Rodríguez-Roche, G. Díaz, A. A. Vázquez, M. Alvarez, M. Rodríguez, e M.G. Guzman. 2017. First record of natural vertical transmission of dengue virus in *Aedes aegypti* from Cuba. *Acta Trop.* 174: 146-148.

Hamid, H. A., N. Silvarajoo, e N. A. Hamid. 2020. Chemical composition and repellent activity against mosquito *Aedes aegypti* of *Pelargonium radula*, *Syzygium aromaticum* and *Citrus aurantifolia* essential oils. In: *Mater. Sci. Forum.* 981: 253-257.

Honorio, N. A., D. C. CAMARA, G. A. Calvet. 2015. Chikungunya: an arbovirus infection in the process of establishment and expansion in Brazil. *Cadernos de Saúde Pública.* 31: 906-908.

Howell. P., e F. H. Collins. 2018. *Aedes aegypti*: o mosquito mais temido da atualidade. (<<http://www.sporum.com.br/2018/11/aedes-aegypti-o-mosquito-mais-temido-da.html>>).

Hyland, K. C., E. R. Dickenson, J. E. Drewes, e C. P. Higgins. 2012. Sorption of ionized and neutral emerging trace organic compounds onto activated sludge from different wastewater treatment configurations. *Water Res.* 46: 1958-1968.

(IUPAC) International Union of Pure and Applied Chemistry. Pesticide properties database

(PPDB). 2016. (<http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/Reports/1190.htm>).

Jasem, D. A. F., C. A. Carmo, e L. C. Gelatti. 2016. Estudo entomológico da distribuição de larvas de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* conforme os criadouros, no município de Uruáçu, Goiás. *Fazem Ciências.* 8: 21-33.

Kantheti, P., e A. Padma. 2017. Ethnobotanical tribal practices for mosquito repellency followed by people of north India. *J. Pharmacogn. Phytochem.* 6: 942-494.

Koutsaviti, K., A. Giatropoulos, D. Pitarokili, D. Papachristos, A. Michaelakis, e O. 2015. Tzakou. Pinus essential oils: larvicidal activity and repellency against *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *Parasitol. Res.* 114: 583-592.

Laboissière, P. Decreto cria programa que oferece repelente para gestantes do Bolsa Família. Programa inclui prevenção e proteção individual de mulheres grávidas. *Brasileia.* 2016. (<http://agenciabrasil.ebc.com.br/geral/noticia/2016-04/decreto-cria-programa-que-oferece-repelente-para-gestantes-do-bolsa-familia>).

Leal, I. R., J. D. Silva, M. Tabarelli, e J. R. T. E. LACHER. 2005. Mudando o curso da conservação da biodiversidade na Caatinga do Nordeste do Brasil. *Megadiversidade.* 1: 139-146.

Leavell, S. & E. G. Clarck. 1976. *Medicina Preventiva.* McGraw-Hill.

- Lee, M. Y. 2018. Essential oils as repellents against arthropods. *BioMed Res. Int.* 2018: 9
- Legeay, S., N. Clere, G. Hilairet, Q. T. Do, P. Bernard. J. F. Quignard, e S. Faure. 2016. The insect repellent N, N-diethyl-m-toluamide (DEET) induces angiogenesis via allosteric modulation of the M3 muscarinic receptor in endothelial cells. *Sci. Rep.* 6: 28546.
- Lima, L. R., J. R. Pirani. 2008. Revisão taxonômica de *Croton* sect. *Lamprocroton* (Müll. Arg.) Pax (Euphorbiaceae s.s.). *Biota Neotrop.* 8: 177-231.
- Lima, S. G. D., A. M. Citó, J. A. Lopes. J. M. Neto, M. H. Chaves, e E. R. 2010. Silveira. Fixed and volatile constituents of genus *Croton* plants: *C. adenocalyx* Baill-Euphorbiaceae. *Rev. Latinoam. Quim.* 38: 133-144.
- Lin, H. H., B. S. Yip, L. M. Huang, e S. C. Wu. 2018. Zika virus structural biology and progress in vaccine development. *Biotechnol. Adv.* 36: 47-53.
- Lorenz, C., E. L. Breviglieri, e F. Virgínio. 2018. O fantástico mundo dos mosquitos, 1ª. ed. Livro novo, BR.
- Lucena, M. F. A., e M. Alves. 2010. Notas taxonômicas para Euphorbiaceae s.l. do Nordeste do Brasil. *Hoehnea.* 37: 71-85.
- M. T. Trindade. 2015. Espécies úteis da família Euphorbiaceae no Brasil. *Rev. Cubana Plant. Med.* :19: 4.
- Maciel, I. J., J. B. S. JÚNIOR, e C. M. T, Martelli. 2008. Epidemiologia e desafios no controle do dengue. *Revista de Patologia Tropical.* 37: 111-130.
- Maciel., V. 2018. Saúde amplia público-alvo para utilização de repelentes. Ministério da saúde. (<<https://www.saude.gov.br/noticias/agencia-saude/42607-saude-amplia-publico-alvo-para-utilizacao-de-repelentes>>).
- Maia, M. F., e S. J. MOORE. 2011. Plant-based insect repellents: a review of their efficacy, development and testing. *Malar. J.* 10: 11.
- Martinez, E., S. M. Vélez, M. Mayo, e M. P. Sastre. 2016. Acute toxicity assessment of N, N-diethyl-m-toluamide (DEET) on the oxygen flux of the dinoflagellate *Gymnodinium instriatum*. *Ecotoxicology.* 25: 248-252.
- Mcbride, C. S., F. Baier, A. B. Omondi, S. A. Spitzer, J. Lutomiah, R. Sang e L. B Vosshall. 2014. Evolution of mosquito preference for humans linked to an odorant receptor. *Nature.* 515: 222.
- Mdoe, F. P., S. S. Cheng, L. Lyaruu, G. Nkwengulila, S. T. Chang, e E. J. Kweka. 2024. Larvicidal efficacy of *Cryptomeria japonica* leaf essential oils against *Anopheles gambiae*. *Parasites Vector.* 7: 426.
- Medeiros, F. C. M. D. 2014. Caracterização química e atividade biológica de óleos essenciais de plantas do Cerrado contra fungos xilófagos.: 108.

Merel, S., e S. A. Snyder. 2016. Critical assessment of the ubiquitous occurrence and fate of the insect repellent N, N-diethyl-m-toluamide in water. *Environ Int.* 96: 98-117.

Ministério da saúde. 2002. Fundação Nacional de Saúde. Programa nacional de controle da dengue (PNCD). (<<http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/pncd>>).

Ministério da saúde. 2015. Secretaria de vigilância em saúde. Departamento de vigilância das doenças transmissíveis. Protocolo de vigilância e resposta à ocorrência de microcefalia relacionada à infecção pelo vírus Zika, 1ed. Ministerio da Saúde, BR.

Ministério da saúde. 2015. Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 51. *Boletim Epidemiológico.* 48: 1-9.

Ministério da saúde. 2016. Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 45. *Boletim Epidemiológico.* 47: 1-10.

Ministério da saúde. 2017. Vírus Zika no Brasil: a resposta do SUS, 1ª.ed. Ministerio da Saúde, BR. (http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/virus_zika_brasil_resposta_sus.pdf).

Maciel, V. 2018. Saúde amplia público-alvo para utilização de repelentes. (<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/saude-amplia-publico-alvo-para-utilizacao-de-repelentes>).

Ministério da saúde. 2018. Secretaria de vigilância em saúde. Febre amarela: guia para profissionais de saúde. Secretaria de Atenção à Saúde, 1ed. Ministerio da Saúde, BR. : 67.

Ministério da saúde. 2019. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e doença aguda pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 52 de 2018. 50: 1-14.

Ministério da saúde. 2020. Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo *Aedes* (dengue, chikungunya e Zika), semanas epidemiológicas 01 a 03. *Boletim Epidemiológico.* 51: 1-16.

Misni, N., Z. M. Nor e R. Ahmad. 2017. Repellent effect of microencapsulated essential oil in lotion formulation against mosquito bites. *J. Vector Borne Dis.* 54: 44.

MMA Ministério do meio ambiente. 2006. Plano de manejo floresta nacional contendas do Sincorá Informações gerais sobre a floresta nacional. Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. 1: 1-132.

Moore, E. L., M. A. Scott, S. D, Rodriguez, S. Mitra, J. Vulcan, J. J. Cordova, e I. A. Hansen. 2018. An online survey of personal mosquito-repellent strategies. *PeerJ.* 6: 5151.

Moore, S.J., e A.H.N. Ienglet. 2006. Plant-based insect repellents. *Insect repellents: principles methods, and use*, 1ed. CRC Press, EUA.

- Morais, S. M., E. S. Cavalcanti, L. M. Bertini, C. L. Oliveira, J. R. Rodrigues, e J. H. Cardoso. 2006. Larvicidal activity of essential oils from Brazilian *Croton* species against *Aedes aegypti* L. J. Am. Mosq. Control Assoc. 22: 161-164.
- Mwine, T. J., e P. Van damme. 2011. Why do Euphorbiaceae tick as medicinal plants: a review of Euphorbiaceae family and its medicinal features. J. Med. Plants Res. 5: 652-662.
- Nascimento, A. M. D., T. D. S. Maia, T. E. S. Soares, L. R. A. Menezes, R. SCHER, E. V. Costa, e R. L. Corte. 2017. Repellency and larvicidal activity of essential oils from *Xylopia laevigata*, *Xylopia frutescens*, *Lippia pedunculosa*, and their individual compounds against *Aedes aegypti* Linnaeus. Neotrop. Entomol. 46: 223-230.
- Omolo, M. O., D. Okinyo, I. O. Ndiege, W. Lwande, e A. Hassanali. 2004. Repellency of essential oils of some Kenyan plants against *Anopheles gambiae*. Phytochemistry. 65: 2797-2802.
- Onoabedje, U. S., S. I. Inya-Agha, C. O. Ezugwu, M. O. Agbo, e E. A. Onoabedje. 2019. Pharmacognostic, antimicrobial and mosquito repellent properties of *Acalypha fimbriata* (Euphorbiaceae) leaf extract. Trans. R. Soc. S. Afr. 74: 151-162.
- Owen, T.M. A. 1805. GEOPONIKA: agricultural pursuits.
- Padhye, L. P., H. Yao, F. T. 2014. KUNG'U e C. H. Huang. Year-long evaluation on the occurrence and fate of pharmaceuticals, personal care products, and endocrine disrupting chemicals in an urban drinking water treatment plant. Water Res. 51: 266-276.
- Paumgarten, F. J. R., e I. F. Delgado. 2016. Repelentes de mosquitos, eficácia para prevenção de doenças e segurança do uso na gravidez. 4: 97-104.
- Pavela, R., e G. Benelli. 2016a. Ethnobotanical knowledge on botanical repellents employed in the African region against mosquito vectors—a review. Exp. Parasitol. 100: 103-108.
- Pavela, R., e G. Benelli. 2016b. Essential oils as ecofriendly biopesticides Challenges and constraints. Trends Plant Sci. 21: 1000-1007.
- Peixoto, R. N. S., G. M. S. P. Guilhon, M. G. B. Zoghbi, I. S. ARAÚJO, A. P. T. Uetanabaro, L. S. Santos, D. S. B. BRASIL. 2013. Volatiles, a glutarimide alkaloid and antimicrobial effects of *Croton pullei* (Euphorbiaceae). Molecules. 18: 3195- 3205.
- Péry, A. R., R. Mons, P. Flammarion, L. Lagadic, e J. Garric. 2002. A modeling approach to link food availability, growth, emergence, and reproduction for the midge *Chironomus riparius*. Environ. Toxicol. Chem. 21: 2507-2513.
- Peterson, C., e J. Coats .2001. Insect repellents-past, present and future. Pestic. Outlook.12: 154-158.
- Pharma.I. 2014. IR 3535 Repelente de insetos. :1-2.
- Pinheiro, P. 2020. *Aedes aegypti* – aprenda a reconhecer o mosquito da dengue. (<<https://www.mdsaude.com/doencas-infecciosas/fotos-mosquito-dengue/>>).

- Powell, J. R., e W. J. Tabachnick. 2013. History of domestication and spread of *Aedes aegypti*-a review. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 108: 11-17.
- Prado, D. 2003. As caatingas da América do Sul. Universidade Federal de Pernambuco, BR.
- Prasadini, M., D. Dayananda, S. Fernando, I. Harischandra, e N. Silva. 2019. Blood Feeding preference of female *Aedes aegypti* mosquitoes for human blood group types and its impact on their fecundity: implications for vector control. Am. Entomol. . 3: 43-48.
- Quantin, P., A. Thélu, S. Catoire, e H. Ficheux. 2015. Perspectives and strategies of alternative methods used in the risk assessment of personal care products. In: Ann Pharm Fr. 73: 422-435.
- Ragonha, F. H. A. 2018. A evolução e potencialização do *Aedes aegypti* em relação às doenças no Brasil e no estado do Paraná. Arquivos do museu dinâmico interdisciplinar. 1: 48-78.
- Royal, D. N., R. Goswami, e A. PAL. 2017. The insect repellents: A silent environmental chemical toxicant to the health. Environ. Toxicol. Pharmacol. 50: 91-102.
- Salatino, A., F. S. Salatino, G. 2007. Negri. Traditional uses, chemistry and pharmacology of *Croton species* (Euphorbiaceae). J. Braz. Chem. Soc.18:11-33.
- Santos, G. K. N., K. A. Dutra., C. S. Lira., B. N. Lima, T.H. Napoleão, P. M. G. Paiva, C. A. Maranhão, S. S. F. Brandão, D. M. A. F. Navarro. 2014. Effects of *Croton rhamnifolioides* essential oil on *Aedes aegypti* oviposition, larval toxicity and trypsin activity. Molecules. 19: 16573-16587.
- Santos, J. S. D., J. I. M. D. Melo, M. C. D. Abreu e M. F. D. Sales. 2009. Verbenaceae sensu stricto na região de Xingó: Alagoas e Sergipe, Brasil. Rodriguésia. 60: 985-998, 2009.
- São João, R. E., e A. Raga. 2016. Mecanismo de defesa das plantas contra o ataque de insetos sugadores. Documento Técnico. 23: 1-13.
- Sahuquillo, M. R. 2016. OMS declara microcefalia por zika vírus uma emergência mundial: Organização Mundial da Saúde detectou casos de zika em 24 países da América. (https://brasil.elpais.com/brasil/2016/02/01/internacional/1454324995_784807.html).
- Sátiro, L.S., e N. 2007. Roque. A família Euphorbiaceae nas caatingas arenosas do médio rio São Francisco, BA, Brasil. Acta Botânica Brasileira. 22: 99-118.
- Saúde. S. M. 2016. *Aedes aegypti*. Conheça melhor seu inimigo E previna-se!. Secretaria Municipal de Iracemápolis. (< <http://saude.iracemapolis.sp.gov.br/index.php/2-uncategorised/125-aedes-aegypti-conheca-melhor-seu-inimigo-e-previna-se>>).
- Schistek, H., M, Drumond, e J. Seiffarth. 2012. Caatinga: um bioma exclusivamente brasileiro... e o mais frágil. Revista do Instituto de Humanitas Usininos. :1-60, 2012.
- Schneider, J. M. P. H. 2001. A timeline for dengue in the Americas to December 31, 2000 and

noted first occurrences.
(<https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2010/A%20timeline%20for%20dengue.pdf>)

Schoonhoven, L.M., J.J.A. Van loon, M. Dicke. 2005. Insect-plant biology, 2^a. ed. Oxford University Press, EUA.

Secco, R. D. S., I. Cordeiro, L. D. S. Vale, M. F. D. Sales, L. R. D. Lima, D. Medeiros, B. S. Haiad, A. S. Oliveira, M. B. R. Caruzo, D. C. Torres, N. C. Bigio. 2012. An overview of recent taxonomic studies on Euphorbiaceae sl in Brazil. *Rodriguésia*. 63: 227-242.

Senthil. N. S. 2015. A review of biopesticides and their mode of action against insect pests. In: *Environ. Sustainability*. :49-63.

SEPPIR Secretaria nacional de políticas de promoção da Igualdade Racial. Comunidades tradicionais - o que são. (<http://www.seppir.gov.br/comunidades-tradicionais/o-que-são-comunidades-tradicionais>).

Sgroi, M., P. Roccaro, G. V. Korshin, V. Greco, S. Sciuto. T. Anumol, e F. G Vagliasindi. 2017. Use of fluorescence EEM to monitor the removal of emerging contaminants in full scale wastewater treatment plants. *J. Hazard. Mater.* 323: 367-376.

Sherr, E. B., e B. F. Sherr. 2007. Heterotrophic dinoflagellates: a significant component of microzooplankton biomass and major grazers of diatoms in the sea. *Mar. Ecol.: Prog. Ser.* 352: 187-197.

Silva, J. S., M. F. Sales, A. P. S. Gomes, D. S. C. 2010. Torres. Sinopse das espécies de *Croton* L. (Euphorbiaceae) no estado de Pernambuco, Brasil. *Acta Bot Brasilica*. 24: 441-453.
Silva, S. D. S., J. R. Santos, M. S. S. Carvalho, e A. A. J. Castro. 1999. Flora do Estado do Piauí: famílias Annonaceae e a Abacardiaceae. :2-4.

Slam, J., K. Zaman, S. Duarah, P. S. Raju, e P. Chattopadhyay. 2017. Mosquito repellents: An insight into the chronological perspectives and novel discoveries. *Acta Trop.* 167: 216-230.

Soonwera, M. 2015. Efficacy of essential oils from Citrus plants against mosquito vectors *Aedes aegypti* (Linn.) and *Culex quinquefasciatus* (Say). *IJAT*. 11: 669-681.

Sorensen, J. P. R., D. J. Lapworth, D. C. W. Nkhuwa, M. E. Stuart, D. C. Gooddy, R. A. Bell, e S. Pedley. 2015. Emerging contaminants in urban groundwater sources in Africa. *Water Res.* 72: 51-63.

Sritabutra D., M. Soonwera. 2013. Repellent activity of herbal essential oils against *Aedes aegypti* (Linn.) and *Culex quin- quefasciatus* (Say.). *Asian Pac J Trop Dis.* 3: 271-276.

Stanczyk, N. M., J. F. Brookfield, L. M. Field, e J. G. Logan. 2013. *Aedes aegypti* mosquitoes exhibit decreased repellency by DEET following previous exposure. *PLoS One*. 8: 54438.

Stefani, G. P., A. C. Pastorino, A. P. B. Castro, A. B. F. Fomin, e C. M. A. Jacob. 2009. Repelentes de insetos: recomendações para uso em crianças. *Rev Paul Pediatr.* 27: 81-89.

Suter, T., M.M, Crespo M. F. de Oliveira, T. S. A. de Oliveira, M. A. V. de Melo-Santos, C. M. F. de Oliveira, C. F. J. Ayres, R. M. R. Barbosa, A. P. Araújo, L. N. Regis, E. Flacio, L. Engeler, P. Müller, M. H. N. L. Silva-Filha. 2017. *Parasit Vectors*. 10: 1-11.

Tabarelli, M., e J. M. C. D. Silva. 2003. Áreas e ações prioritárias para a conservação da biodiversidade da Caatinga. *Ecologia e conservação da Caatinga*. :777-796.

Taiz, L., e Zeiger. 2004. *Fisiologia vegetal*, 3ª ed. Artemed, BR.

Tavares, M., M. R. M. Da Silva, L. B. D. O. Siqueira, R. A. S. Rodrigues, L. Bodjolle-D'almeida, E. P. Dos Santos, e E. Ricci-Júnior. 2018. Trends in insect repellent formulations: A review. *Int J Pharm*. 539: 190-209.

Teixeira, M. G., M. D. C. N. Costa, F. Barreto e M. L. Barreto. 2009. Dengue: twenty-five years since reemergence in Brazil. *Cadernos de saúde pública*. 25: 18.

Thisyakorn, U., e C. Thisyakorn. 2014. Latest developments and future directions in dengue vaccines. *Ther Adv Vaccines*. 2: 3-9.

Uc-puc, V., J. Herrera-bojórquez, C. Carmona-Carballo, A. Chemendoza, A. Medina-Barreiro, J. Chablé-Santos, e P. Manriquesaide. 2016. Efectividad de repelentes comerciales disponibles contra el mosquito *Aedes aegypti* (L.) em Yucatán, México. *Rev. Invest. Salud Publica*. 58: 472-475.

Ulloa-Ulloa. U, C., P. A. Rodríguez, S. Beck, M. J. Belgrano, R. Bernal, P. E. Berry, L. Brako, M. Celis, G. Davidse, R. C. Forzza, S. R. Gradstein, O. Hokche, B. León, S. L. Yáñez, R. E. Magill, D. A. Neill, M. Nee, P.H. Raven, H. Stimmel, M.T. Strong, J. L. Villaseñor, J.L., J. L.

Zarucchi, F. O. Zuloaga, P. M. Jorgensen.2017. An integrated assessment of the vascular plant species of the Americas. *Sci*. 358:1614-1617.

Van-Breugel, F., J. Riffell, A. Fairhall, e M. H. Dickinson. 2015. Mosquitoes use vision to associate odor plumes with thermal targets. *Curr. Biol*. 2015. 25: 2123-2129.

Vasconcelos, P. F. D. C. 2015. Doença pelo vírus Zika: um novo problema emergente nas Américas. *Pan-Amazônica de Saúde*. 6: 9-10.

Vongsombath, C., K. Pålsson, L. Björk, A. B. Karlson, e T. G. Jaenson. 2014. Mosquito (Diptera: Culicidae) repellency field tests of essential oils from plants traditionally used in Laos. *J. Med. Entomol*. 49: 1398-1404.

Waldman, E. A., e A. P. S. Sato. 2016. Trajetória das doenças infecciosas no Brasil nos últimos 50 anos: um contínuo desafio. *Saúde Pública*. 50: 50-68.

Webb, C. E., e I. M. Hess. A review of recommendations on the safe and effective use of topical mosquito repellents. *Public Health Res Pract*. 26: 2651657.

(WHO) World health organization. 1970. Insecticide resistance and vector control: Seventeenth report of the WHO expert committee on insecticides. 443: 1-95.

(WHO) World Health Organization. 2009. Guidelines for efficacy testing of mosquito repellents for human skin. (<https://apps.who.int/iris/handle/10665/70072>).

(WHO) World Health Organization. 2012. International travel and health: situation as on 1 january 2012. World Health Organization, 2012.

(WHO) World Health Organization. 2013. Guidelines for efficacy testing of spatial repellents. (https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/78142/9789241505024_eng.pdf?sequence=)

(WHO) World Health Organization. 2017. Global vector control response 2017–2030. Geneva: World Health Organization. :53.

(WHO) World Health Organization. 2020. (<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/yellow-fever>).

Yoon, J. K., K. C. Kim, Y. Cho, Y. D. Gwon, H. S. Cho, Y. Heo, Y., K. Park, Y. W. Lee, M. Kim, Y. K. Oh, e Y.B . Kim. 2015. Comparison of repellency effect of mosquito repellents for DEET, citronella, and fennel oil. *J Parasitol Res.* 2015: 361021.

Zanluca, C., V. C. A. Dmelo, A. L. P. Mosimann, G. I. V. D. Santos, C. N. D. D. Santos, e K. Luz. 2015. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* 110: 569-572.

Zappi, D. C., F. L. R. Filardi, P. Leitman, V. C. Souza, B. M. Walter, J. R. Pirani,... e R. C. Forzza. 2015. Growing knowledge: an overview of seed plant diversity in Brazil. *Rodriguésia.* 66: 1085-1113.

ANEXO I

Normas de submissão para Journal of Medical Entomology

New Submissions

Fomattting

For new submissions, our formatting requirements are simple—just make sure your paper has the following items:

- Continuous line numbers
- Double-spaced lines
- A title page and abstract in the main document
- A main document in a doc, docx, tex (converted to PDF for review) or rtf file type
- Tables in a Word document (we cannot accept Excel files, unless they are supplementary files)
- Figure and table legends in the main document
- All coauthors entered into the online review system (email addresses required)

Please note there are more formatting guidelines for revised versions, as those are closer to being accepted (see the Revised Versions section of these author instructions).

- References listed in alphabetical order, cited by author and year in the text (not numbered)
- Figures and tables at the end of the main document after the references, or uploaded as separate files. Figure legends should be included at the end of the main text after the references, and table legends should be next to their corresponding tables
- Text is single-column

Article types and lengths

- Research article: No limit (under 7500 words recommended)
- Review: No limit
- Forum: No limit
- Short Communication: 2,000 words or less (not including abstract, references, or figure and table legends)
- Letter to the Editor: 2,000 words or less

For explanations of the different article types, please see the Article Types section of these author instructions.

Language

- English. A second abstract in a second language is permitted. Authors are responsible for the accuracy of non-English abstracts.
- Manuscripts with poor English will be withdrawn before review. Those authors are encouraged to pursue English assistance prior to resubmission. For a professional editing service, ESA journals have a partnership with the Charlesworth Group, whereby ESA members receive a 10% discount on editing services. The discount is automatically applied if authors follow the hyperlink above.

Acceptable file types

- Main document: doc, docx, rtf
- Tables: Editable tables at the end of the main document. xls and xlsx files are not accepted (except as supplementary files)
- Figures: tif (preferred), eps (preferred), rtf, doc/docx, ppt/pptx, pdf, ps, psd, ai, gif, png
- Supplementary files: Most file types accessible to users. Extremely large files should be uploaded in a third-party repository.

Page charges

In order to publish in JME, authors are required to pay page charges or an Open Access fee. ESA members are exempt from page charges and receive a discount on the Open Access fee. For more information, including pricing, please visit the [Charges and Licensing](#) page.

Plagiarism and text recycling

All submitted papers are evaluated for excessive direct copying through CrossRef's Ithenticate service. Papers should be written in the authors' own words. Direct copying of sentences or paragraphs, even if the original source is cited or if it is your own previous work, is unacceptable (although some overlap is expected in materials and methods). For more information, please see the Publication Ethics section of these author instructions.

Theses, dissertations, and pre-prints

If your paper (or a previous version of it) was posted on a pre-print server or is part of a thesis or dissertation that has been published online or in an institutional repository, please note this in your cover letter so that it won't be flagged for plagiarism.

CrossRef Funding Data Registry

In order to meet your funding requirements authors are required to name their funding sources, or state if there are none, during the submission process. For further information on this process or to find out more about CHORUS, visit the [CHORUS](#) initiative.

Previous rejections

Papers that have been rejected from one ESA journal cannot be resubmitted to any other ESA journal. Papers that have been withdrawn can be resubmitted to the same journal or another ESA journal. Authors whose papers have been rejected are entitled to appeal their rejection to the journal's editorial board. More information on the appeals process can be found on the [Journal Policies](#) page.

Statistics and sample size

Statistics should be fully reported (i.e., F-value, both degrees of freedom [treatments and replicates], and exact P-value [unless it's less than 0.001]). Furthermore, the paper will be withdrawn if Duncan's Multiple Range Test is used for papers that do not deal with plant resistance. For more information on statistics, please see the Statistics section of these author instructions.

Papers that have insufficient sample sizes (e.g., only a single year of data collected at one location for either insect surveys, pesticide studies, or other field data) are immediately withdrawn. The duration and size of trials/sampling must be biologically significant.

Plant extract papers

For papers that test the efficacy of plant extracts or other compounds on control or behavior modification of insects, the concentrations of the chemical constituents must be listed.

Petri dish tests

Petri dish experiments are not accepted unless they contain a field, semi-field, or greenhouse test.

Personal communications

Personal communication citations should be accompanied by a letter from the person being cited giving permission to use him or her as a citation and verifying the claim being cited. This letter should be uploaded as a supplementary file.

Abbreviations

Abbreviations should be used sparingly. Standard abbreviations for measurements according to *Scientific Style and Format*, 8th edition, are acceptable, as well as common abbreviations that improve the readability of a manuscript (e.g., DNA, PCR). All other abbreviations used should be defined at the first use.

Publication Ethics

JME is committed to ethical behavior in all aspects of scholarly publishing. Please ensure your paper meets the following ethical criteria:

- The author list is complete and correct. Please see the "Journal Policies" page for authorship information and policies.

- No portions of text are directly copied from other sources, including one's own previous papers (although some overlap is tolerated in materials and methods). Direct quotes should be placed in quotation marks. All manuscripts undergo a plagiarism test before they are sent out for review.
- The data have not been published elsewhere. Data published in another paper, including in a paper in another language, may not be published again. If portions of data published previously are being used, the author must provide explicit written consent from the publisher of the previous paper to reuse the data.

Experimental Ethics

Research published in JME must adhere to minimal ethical and compliance requirements for medical, veterinary, and wildlife conservation research. Medical entomology research may include human subjects and/or domestic and wild animals and therefore requires that authors reference compliance protocols to indicate adherence to federal, state, and local regulations, permits, and authorizations. International authors should reference similar compliance documents from their government and/or institution.

Listed below is a minimal series of basic requirements requested from USA and international researchers to be included, as needed, within an ethical section positioned in the Materials and Methods section of each manuscript:

1. **Biological Use Authorization (BUA).** Surveillance, epidemiological, and experimental infection studies with pathogens require containment for diagnostics and culture depending upon the virulence of the organism and the risk of vectorborne, contact, and/or aerosol transmission. Descriptions of appropriate containment for different biosafety levels can be downloaded as a pdf.
A search engine and database to determine the Risk Group of the organism[s] concerned can be found at the **ABSA International** website.
Researchers should report their institution's required compliance review and approved containment level BUA protocol for the pathogen(s) or arthropods used.
2. **Institutional Review Board (IRB) compliance.** Use of human subjects in research must be approved by IRB committees adhering to US Department of Health and Human Services guidelines. Each organization may have different interpretations of guidelines required for human subject activities which may range from surveys, house entry for arthropod collection, use of humans to feed arthropods, use of humans as bait for sampling host-seeking insects, test subjects for candidate repellents, etc.¹
3. **Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) compliance.** Use of animals in research must adhere to protocols meeting minimal ethical requirements for collection, maintenance, and experimental procedures. Research done within the USA or funded by USA agencies must adhere to requirements described by the US National Institutes of Health, and these protocols should be appropriately referenced.
4. **Sampling wildlife.** Most countries and states/provinces/districts require permits to collect vertebrate animals and some insects for research purposes. This is especially true for migratory species, such as birds, where international agreements are in place; for example, see permitting requirements for collecting and banding birds in North America.
An example of state permits required for taking or trapping and release of wildlife within California can be found at **Department of Fish and Wildlife** website.
Additional permits may be required for sampling on wildlife refuges or nature conservatory properties. Reference to these permits should be required to ensure

sampling was done in compliance with regional oversight, especially for endangered or threatened species.

5. Transport and release of organisms. With the increasing use of genetically modified arthropods for population or pathogen control, medical entomologists must adhere to correct oversight governing production and release. The US Department of Agriculture has strict requirements for the transport and/or release of organisms as well as experimental use permitting for applications of experimental compounds for arthropod control.

The Biotechnology Quality Management System (BQMS) Program within the USDA helps organizations, including small businesses and academic researchers, analyze the critical control points within their management systems to better maintain compliance with the APHIS regulations (7 CFR part 340) for the import, interstate movement, and field release of regulated genetically engineered (GE) organisms.

¹Aultman, K. S., E. D. Walker, F. Gifford, D. W. Severson, C. B. Beard, and T. W. Scott. 2000. Managing risks of arthropod vector research. *Science* 288: 2321-2322.

Conflicts of interest

Potential conflicts of interest include any relationships of a financial or personal nature between an author or coauthor and individuals or organizations which, in theory, could affect or bias an author's scientific judgment, or limit an author's freedom to publish, analyze, discuss, or interpret relevant data.

Sources of financial support originating outside the coauthors' home institution(s) for any aspect of a study must be indicated in the Acknowledgments section of the paper. Financial support includes not only funding, but gratis provision of materials, services, or equipment. Any additional potential conflicts of interest, not covered in the acknowledgments of financial support, must be revealed to the editor at submission, and disclosed in a statement immediately following the Acknowledgments.

If an author or coauthor has entered into an agreement with any entity outside that authors' home institution, including the home institution of another coauthor, giving that entity veto power over publication of the study or over presentation, analysis, discussion, or interpretation of any results of the study, whether or not such veto power was exercised, this information must be disclosed in a statement immediately following the Acknowledgments.

Title Page

The title page should include:

1. *Corresponding author*: Include full name, mailing address, telephone number, and email address.
2. *Title*: Should be as short as possible. Only include common names that are listed in the ESA Common Names of Insects & Related Organisms. Do not include authors of scientific names. Insert "[Order]: [Family]" immediately after the name of the organism.
3. *Author list*: Include all authors in the order the names should be published.
4. *Affiliation line*: Include full addresses of all authors. If there are multiple affiliations, designate through numbered footnotes.

5. Abstract

- a. 250 words or less.
- b. Give scientific name and authority at first mention of each organism.
- c. Do not cite references, figures, tables, probability levels, or results.
- d. Refer to results only in the general sense.
- e. A second abstract in a second language is permitted.

6. *Keywords*

- a. Below the abstract, provide three to five keywords, separated by commas.
- b. Do not use abbreviations, combined keywords, or species names.

A sample page can be downloaded as a pdf.

Body

Introduction

Clearly state the basis of your study along with background information and a statement of purpose.

Materials and Methods

Include a clear and concise description of the study design, experiment, materials, and method of statistical analysis.

Results

Clearly present the results. Do not include interpretation of results or interpretation of statistical analysis—simply present the results of the experiment and the results of the statistical analysis. Data listed in tables should not be listed in the results; instead, refer to the table.

Discussion

Interpret and discuss results of the study and their implications. Include suggestions for direction of future studies, if appropriate.

Acknowledgments

Place the acknowledgments after the text. Organize acknowledgments in paragraph form in the following order: persons, groups, granting institutions, grant numbers, and serial publication number.

Following the Acknowledgments, you may include a statement of author contribution outlining the specific contributions of each author to the article. A statement of author contribution is welcomed but not required.

References

- EndNote style is “Environmental Entomology,” and Reference Manager style is “*Journal of Medical Entomology*.”
- Only cite published or formally accepted (in press) articles, not submitted articles.
- References should be in alphabetical order. If multiple references from the same author are cited, those references should be in chronological order.
- Abbreviate journal titles according to the most recent issue of BIOSIS Serial Sources.
- For non-English titled journals that are cited in the references, the title of the journal should be spelled out.
- Systematics-related articles may specify that all serial titles be spelled out for final publication.

Sample reference styles

Journal Articles

Evans, M. A. 2000. Article title: subtitle (begin with lowercase after colon or dash unless first word is a proper noun). J. Abbr. 00:000–000.

Evans, M. A. 2001a. Article title. J. Abbr. 00: 000–000.

Evans, M. A., and R. Burns. 2001. Article title. J. Abbr. 00: 000–000.

Evans, M. A., and A. Tyler. 2001. Article title. J. Abbr. 00: 000–000.

Evans, M. A., A. Tyler, and H. H. Munro. 2000. Article title. J. Abbr. 00: 000–000.

Evans, M. A., R. Burns, and A. A. Dunn. 2001. Article title. J. Abbr. 00: 000–000.

In Press

Evans, M. A. 2002. Article title. J. Econ. Entomol. (in press).

Books

Burns, R. 2001. Title (initial cap only): subtitle (no initial cap after colon). Publisher, city, state abbreviation or country.

Evans, M. A. 2001. Colorado potato beetle, 2nd ed. Publisher, city, state abbreviation or country.

Tyler, A. 2001. Western corn rootworm, vol. 2. Publisher, city, state abbreviation or country.

Article/Chapter in Book

Tyler, A. 2001. Article or chapter title, pp. 000–000. In T.A.J. Royer and R. B. Burns (eds.), Book title. Publisher, city, state abbreviation or country.

Tyler, A., R.S.T. Smith, and H. Brown. 2001. Onion thrips control, pp. 178–195. In R. S. Green and P. W. White (eds.), Book title, vol. 13. Entomological Society of America, Lanham, MD.

No Author Given

(USDA) U.S. Department of Agriculture. 2001. Title. USDA, Beltsville, MD.

(IRRI) International Rice Research Institute. 2001. Title. IRRI, City, State or Country.

Patents

Harred, J. F., A. R. Knight, and J. S. McIntyre, inventors; Dow Chemical Company, assignee. 1972 Apr 4. Epoxidation process. U.S. patent 3,654,317.

Proceedings

Martin, P. D., J. Kuhlman, and S. Moore. 2001. Yield effects of European corn borer (Lepidoptera: Pyralidae) feeding, pp. 345–356. In Proceedings, 19th Illinois Cooperative Extension Service Spray School, 24–27 June 1985, Chicago, IL. Publisher, City, State.

Rossignol, P. A. 2001. Parasite modification of mosquito probing behavior, pp. 25–28. In T. W. Scott and J. Grumstrup-Scott (eds.), Proceedings, Symposium: the Role of Vector-Host Interactions in Disease Transmission. National Conference of the Entomological Society of America, 10 December 1985, Hollywood, FL. Miscellaneous Publication 68. Entomological

Society of America, Lanham, MD.

Theses/Dissertations

James, H. 2001. Thesis or dissertation title. M.S. thesis or Ph.D. dissertation, University of Pennsylvania, Philadelphia.

Software SAS Institute. 2001. PROC user's manual, version 6th ed. SAS Institute, Cary, NC.

Online Citations

Reisen, W. 2001. Title. Complete URL (protocol://host.name/path/file.name) and/or DOI (Digital Object Identifier)

Tables

- Tables should be editable tables in a Word document.
- If a table continues on more than one page, repeat column headings on subsequent page(s).
- All columns must have headings.
- Leave no space between lowercase letters and their preceding values (e.g., 731.2ab).
- Do not footnote the title—use the unlettered first footnote to include general information necessary to understand the title (e.g., define terms, abbreviations, and statistical tests).
- Use approved abbreviations or abbreviations already defined in the text and define others in the general footnote.
- Use the following abbreviations in the body or column headings of tables only: amt (amount), avg (average), concn (concentration), diam (diameter), exp (experiment), ht (height), max (maximum), min (minimum), no. (number), prepn (preparation), temp (temperature), vs (versus), vol (volume), wt (weight) Jan (January), Feb (February), Mar (March), April, May, June, July, Aug (August), Sept (September), Oct (October), Nov (November), and Dec (December).

Figures

- Figures should be at least 300 dpi, or 1200 dpi for line graphs.
- The quality in which figures are submitted is the quality in which they will print—please ensure figures are high quality.
- The following file types of figures are accepted: tif (preferred), eps (preferred), rtf, ppt/pptx, pdf, ps, psd, ai, gif, png. Figures should be in their native format for best quality.
- Figures should be prepared in CMYK color.
- Maximum height: 240 mm.
- Maximum width (one-column figure): 82 mm.
- Maximum width (two-column figure): 171 mm.
- For more information on preparing figures, see OUP's Author Resource Centre on figures.

- All authors are required to pay additional charges for color figures. Authors may elect to publish in grayscale in print and in color online for no charge.

Authors are encouraged to submit a graphical abstract as part of the article, in addition to the text abstract. The graphical abstract should clearly summarize the focus and findings of the article, and will be published as part of the article online and in PDF. The graphical abstract should be submitted for peer review as a separate file, selecting the appropriate file-type designation in the journal's online submission system. The file should be clearly named, e.g. *graphical_abstract.tiff*. See [this page](#) for guidance on appropriate file format and resolution for graphics. Please ensure graphical abstracts are in landscape format.

Note that graphical abstracts will be subject to any print reproduction charges that the journal levies for colour figures.

Supplementary Material

Supplementary Material may be submitted in the form of one or more files to accompany the online version of an article. Such material often consists of large tables, data sets, or videos that are not possible or convenient to present in print media. Supplementary Material represents substantive information to be posted on the ESA journal website that enhances and enriches the information presented in the main body of a paper; however, the paper must stand on its own without the need for the reader to access the supplementary information to understand and judge the merits of the paper. All Supplementary Material must be provided at the time of manuscript submission and will be distributed to reviewers as part of the normal peer-review process. It will not be edited during production and will be published as submitted.

Supplementary Material should be:

- Referenced in the body of the main paper (e.g., Supp. Table S1), where a link will take the online reader to the file.
- Be labeled with an appropriate title and caption.
- Citations for any literature referenced within a Supplementary Material file should be listed in a References Cited section at the end of the file, even when a citation is duplicated in the main body of the paper.
- Videos should be kept to a reasonable size to facilitate downloading by readers.

Species Authority, Order, Family, and Common Names

- Authors should provide the authority, order, and family for all organisms that are central to the paper (including plants, bacteria, and other non-arthropod organisms) at the first mention of the organism. It is the author's responsibility to provide accurate authority, order, and family information. Organisms mentioned in passing or whose importance to the paper is limited do not need to have full authority, order, and family listed, nor do mentions of common names of groups (e.g., mosquitoes, beetles, ticks, etc.).
- If a species name is included in the title of a paper, either the ESA-approved common name or the Latin name, the order and family should also be provided. If the order and

family of an organism is provided in the title of the paper, it does not need to be provided again in the abstract and main text.

- If an organism is not listed in the title but is central to the paper, the order and family should be provided at first mention of the organism in both the abstract and the main text.
- The taxonomic authority of an organism that is central to the paper should be given the first time the organism is mentioned in both the abstract and the main text, but not in the title. For tables that include lists of species, authority should be given for each species if it is the first time it is being mentioned in the paper.
- If multiple organisms in the same genus are central to the paper, order and family only need to be provided for the first species mentioned in the genus. If multiple organisms are central to the paper, are in different genera, but are in the same order and family, order and family should be provided at first mention of each organism.
- If two organisms that share the same order and family are mentioned in the title or listed in the text of the paper together, the order and family should be placed after the first species listed and does not need to be repeated after the second species.
- A genus can be abbreviated after the first mention (except to start a sentence, in which case the genus should be spelled out). If two species belong to different genera but the genera start with the same letter, the first two letters can be used for abbreviations.
- Only ESA approved common names should be used. Common names are lower case, except for proper nouns and their derivations.

Statistics

All data reported (except for descriptive biology) must be subjected to statistical analysis. Results of statistical tests may be presented in the text, in tables, and in figures. Statistical methods should be described in Materials and Methods with appropriate references. Descriptions should include information such as sample sizes and number of replications. Only t-tests, Chi square, and analyses of variance require no citation. Cite the computer program user's manual in the References Cited.

Probit/logit

When presenting results of probit/logit analysis, the following columns should be included in tables in the following order (left to right); n, slope + SE, LD (or LC) (95% CL), and chi-square. When a ratio of one LD versus another is given, it should be given with its 95% CI. Statistical tests to show what model best fits data intended to estimate the 99.9986% level of effectiveness should be presented to justify use of any model, including the probit model. Thus, we do not recommend use of the Probit 9 without tests to show that the probit model fits the data.

Analysis of Variance or t-test

When presenting the results of analysis of variance or a t-test, specify F (or t) values, degrees of freedom, and P values. This information should be placed in parentheses in the text. Example: (F = 9.26; df = 4, 26; P < 0.001). If readability of the text is affected by the presence of repeated parenthetical statistical statements, place them in a table instead.

Regression

In regressions, specify the model, define all variables, and provide estimates of variances for parameters and the residual mean-square error. Italicize variables in equations and text.

Variance and sample size

Include an estimate of the variance (or standard error) and sample size for each mean regardless of the method chosen for unplanned multiple comparisons. The use of Duncan's Multiple Range Test (DMRT) is not acceptable as a mean separation test as it was designed to be a very liberal test intended to find even minor differences in resistance between plant lines used for breeding.

ORCID

O JME exige que os autores de submissão forneçam um ID de ORCID no momento da submissão à revista. Mais informações sobre o ORCID e os benefícios do uso de um ORCID iD estão disponíveis. Se você ainda não possui um ORCID iD, pode se registrar gratuitamente no site do ORCID.

ANEXO II



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO-UFPE
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS



DECLARAÇÃO

Eu, **Ivone Antonia de Souza** inscrita no CPF **097.456.104-53** e no RG **671126**, Professora Doutora lotada no Centro de Biociências, vinculada ao Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE, Recife-PE) e coordenadora do Laboratório de Toxicologia e Farmacologia da UFPE, declaro para os devidos, que o projeto de pesquisa intitulado: “Avaliação repelente do óleo essencial obtido das folhas de *Croton tetradenius* (Euphorbiaceae) sobre fêmeas do *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762)”, está sendo realizado em parceria oficial junto a UFPE, e está sob a responsabilidade da Prof^ª. Dra. Ivone Antonia de Souza, disponibilizando a infraestrutura do referido laboratório para o desenvolvimento parcial do projeto.

A aceitação está condicionada ao cumprimento da pesquisadora aos requisitos do Comitê de Ética de Uso Animal (CEUA) e suas complementares, comprometendo-se a utilizar os dados coletados, exclusivamente para os fins de pesquisa. O referido projeto está registrado no CEUA sobre o número 23076.058811/2020. O manejo e cuidado com os animais estão de acordo aos princípios éticos da experimentação animal segundo critérios estabelecidos pelo comitê.

Recife, 10 de setembro de 2020.

Ivone Antonia de Souza Prof^ª. Responsável

Recife-PE 2020