

**UNIVERSIDADE COMUNITÁRIA DA REGIÃO DE
CHAPECÓ**

Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais

Carine Gallon

**AVALIAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE EUCALIPTO
SOBRE A ATIVIDADE LARVICIDA E DESENVOLVIMENTO
DO MOSQUITO *Aedes aegypti***

**Carine
Gallon**

Chapecó – SC, maio de 2019

**UNIVERSIDADE COMUNITÁRIA DA REGIÃO DE
CHAPECÓ**

Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais

**AVALIAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE EUCALIPTO
SOBRE A ATIVIDADE LARVICIDA E DESENVOLVIMENTO
DO MOSQUITO *Aedes aegypti***

Carine Gallon

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Universidade Comunitária Regional de Chapecó, como parte dos pré-requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais.

Orientador: Prof. Dr Daniel Albeny Simões

Coorientador: Prof. Dr Jacir Dal Magro

Coorientador: Prof. Dr Renan de Souza Rezende

Chapecó – SC, maio de 2019

G172a Gallon, Carine
Avaliação de óleos essenciais de eucalipto sobre a atividade larvicida e desenvolvimento do mosquito *Aedes Aegypti*. / Carine Gallon. 2019.
58 f.: il;

Orientador: Prof. Dr. Daniel Albeny Simões
Coorientador: Prof. Dr. Jacir Dal Magro
Coorientador: Prof. Dr. Renan de Souza Rezende
Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) - Universidade Comunitária da Região de Chapecó, 2019.
Inclui Bibliografias

1. Dengue – *Aedes Aegypti*. 2. Óleos essenciais. I. Simões, Daniel Albeny. II. Dal Magro, Jacir. III. Rezende, Renan de Souza. IV. Título.

CDD: Ed. 23 – 616.921



**AVALIAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE EUCALIPTO SOBRE A ATIVIDADE
LARVICIDA E DESENVOLVIMENTO DO MOSQUITO *Aedes aegypti***

CARINE GALLON

Essa dissertação foi julgada adequada para obtenção do grau de Mestre em Ciências Ambientais, APROVADA em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Ambientais da Universidade Comunitária da Região de Chapecó.

Banca examinadora:

Orientador: Prof. Daniel Albeny Simões
Dr. em Entomologia (Unochapecó)

Coorientador: Prof. Jacir Dal Magro
Dr. Química (Unochapecó)

Coorientador: Prof. Renan de Souza Rezende
Dr. Ecologia (Unochapecó)

Membro: Mateus Ramos de Andrade
Dr. em Entomologia (Instituto Federal de Rondônia)

Membro: Prof. Cássia Alves Lima Rezende
Dr. em Biologia Animal (Unochapecó)

Prof. Dr. Daniel Albeny Simões
Orientador

Prof^a. Dra. Anna Maria Siebel
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Ambientais

Chapecó, 03 de Maio de 2019.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Dr. Daniel Albeny-Simões, pela paciência e dedicação em me conduzir na execução deste trabalho, pelas valiosas críticas e sugestões, pelos ensinamentos e apoio constante.

Aos meus coorientadores prof. Dr. Jacir Dal Magro e prof. Dr. Renan de Souza Rezende, pelas contribuições indispensáveis na parte química e estatística, além das sugestões que permitiram o aperfeiçoamento deste trabalho.

Ao meus pais Jair e Mercedes Gallon e familiares deixo um agradecimento especial, por toda a compreensão e apoio em mais uma etapa de minha vida. Ao meu namorado Júlio C. Fazolo, por todo amor, carinho, compreensão e apoio incondicional em tantos momentos difíceis desta caminhada.

À Deus, por me permitir realizar este sonho e por me iluminar nos momentos mais difíceis.

Ao professor Dr. Paulo Afonso Floss da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina – Epagri, pela ajuda e apoio durante as coletas e identificação das amostras vegetais.

Ao bolsista de iniciação científica, Jean F. F. Calisto do laboratório de Tecnologias Ambientais da Unochapecó, pela ajuda na identificação dos compostos químicos e pela amizade. À Técnica do laboratório de Ecologia Veluma I. M. De Bastiani pela ajuda com a extração dos óleos vegetais. Aos bolsistas de iniciação científica Gilberto Cozzer e Gabriel de Carvalho do laboratório de Entomologia da Unochapecó, por toda a ajuda e paciência na criação, contagem de larvas e desenvolvimento de *Aedes aegypti*.

Aos colegas de Pós-Graduação em Ciências Ambientais, Fernanda Weinmann Oliveira, Maryelen Alijar Souza e Mônica Santin Zanatta Schindler pela ajuda com os mosquitos, coleguismo, mas principalmente pelas palavras de apoio e amizade. Em especial, ao meu colega Rafael H. Martello por todo o tempo que dedicou me ajudando nos experimentos, nas análises dos dados e principalmente pela compreensão e amizade.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais, Unochapecó.

À Unochapecó e UNIEDU, pelo auxílio financeiro.

RESUMO

A incidência de doenças transmitidas pelo mosquito *Aedes aegypti*, tem aumentado nos últimos anos, dentre elas, a dengue. Atualmente, a principal ferramenta na operação de controle de mosquitos é a aplicação de inseticidas sintéticos aplicados em sua maioria na sua fase adulta, no entanto sabe-se que as condições experimentadas pelo mosquito vetor na fase larval, pode ser um fator chave para predizer a qualidade do adulto, afetando inclusive a capacidade vetorial. Quando uma fonte de mortalidade externa, é adicionada ao sistema, assumimos intuitivamente que a população diminuirá de tamanho. Contudo, essa mortalidade adicionada pode contribuir para o efeito de supercompensação, em que a mortalidade adicionada aumenta o equilíbrio e tamanho da população. Os inseticidas sintéticos têm apresentado resistência das populações, além de causar danos ao ambiente e a saúde humana. Diante deste cenário, surgem métodos alternativos de controle de vetores, como os produtos botânicos. Esse estudo propôs avaliar se os efeitos da atividade biológica dos óleos essenciais de eucalipto interferem na sobrevivência das larvas de *Aedes aegypti* e avaliar ainda como os efeitos da densidade promovidos pela atividade inseticida do óleo essencial de *Eucalyptus benthamii* interfere no desenvolvimento larval e na produção de mosquitos adultos da espécie *A. aegypti*. Os óleos essenciais foram extraídos por hidrodestilação e analisados por cromatografia gasosa, acoplada a espectrofotometria de massa (CG-MS), posteriormente foram feitos testes de toxicidade larval com óleos essenciais de setes variedades de eucaliptos nas concentrações: 100, 50, 25, 10, e 0ppm. Os principais compostos identificados nos óleos essenciais fora 1,8 cineol e α - pineno. Os óleos essenciais de *Eucalyptus* testados apresentaram atividade larvicida em grande parte das concentrações avaliadas, principalmente nas de 50 e 100ppm. O maior potencial larvicida foi de 100% para a concentração de 100ppm para os óleos de *E. benthamii* e *Urograndis* (24h). Segundo análise PCA, a mortalidade larval de *A. aegypti* apresenta correlação positiva com os compostos terpineno, O-cymol, O-cymene, terpineol, 2,5-Furandiona, 3-dodecil, α -pineno, globulol e ledol. No teste de desenvolvimento, larvas de *A. aegypti* foram expostas a dois tratamentos subletais CL90 e CL50 de óleo essencial de *E. benthamii* e a um controle. Nossos resultados apontam que o número de adultos que alcançaram a maioridade e o tempo de desenvolvimento larval não foram afetados pelos tratamentos, descartando assim o efeito de supercompensação. Já em relação ao tamanho de machos e fêmeas, foi obtido no tratamento CL90 indivíduos maiores em relação ao controle e com maior longevidade do adulto. Esperamos que os larvicidas naturais possam reduzir o número de adultos emergentes, mas caso existam sobreviventes, segundo nossos resultados, esses terão vantagens no seu tamanho corporal e no tempo de vida do adulto, o que indica que as fêmeas maiores, teriam melhor competência vetorial e maior fecundidade.

Palavras-chave: *Aedes aegypti*; *Eucalyptus*; α - pineno; Supercompensação;

ABSTRACT

The incidence of diseases transmitted by *Aedes aegypti* mosquitoes has increased in the recent years, among them dengue. Nowadays the main tool for mosquitoes control is the application of synthetic insecticides which mainly affect adult insects, however it is known that the experienced conditions of the larval phase can be a key factor to predict the adult quality, affecting even the vector capacity. When an external mortality source, as a natural insecticide, is added to the system, it is assumed intuitively that the population will decrease in size, however, this mortality source can contribute to the effect of supercompensation, in which the mortality rises the equilibrium and population size. Synthetic insecticides have shown resistance of insect populations and environment impacts. In this scenario, alternative methods of vector control arise, such as natural compounds from plants. This study proposed to evaluate if the effects of the biological activity of the essential oils of eucalyptus interfere in the survival of the larvae of *A. aegypti* and evaluates the effects of density promoted by the insecticide activity of *Eucalyptus benthamii* essential oil interfere in larval development and production of adult mosquitoes. The essential oils were extracted by hydrodistillation in a Clevenger apparatus and analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS), subsequently, larval toxicity tests were performed with seven varieties of eucalyptus essential oil at the concentrations: 100, 50, 25, 10, and 0ppm. The major compounds identified in the essential oils were 1,8-cineole and α -pinene. The *Eucalyptus* essential oils tested showed larvicidal activity in most of the evaluated concentrations, mainly in the 50 and 100ppm. The highest larvicidal potential was 100% for the concentration of 100ppm for the oils of *E. benthamii* and *Urograndis* (24h). According to PCA analysis, the larval mortality of *A. aegypti* shows a positive correlation with the compounds terpinene, O-cymol, O-cymene, terpineol, 2,5-furandione, 3-dodecyl, α -pinene, globulol and ledol. *A. aegypti* larvae was exposed to sublethal treatments (LC90 and LC50) with essential oil of *E. benthamii* and a control group. The results show that the number of insects that reach the adulthood and the time of larval development were not affected by the treatments, therefore discarding the supercompensation effect. In LC90 treatment males and females have changed, with bigger sizes and adult longevity in comparison with control groups. It is expected that natural larvicides reduce the number of emerging adults, however the survivors, according to the results obtained, will have advances in body size and adult life time, what indicates that bigger females would have better vectorial competency and fertility.

Keywords: *Aedes aegypti*; *Eucalyptus*; α -pinene; Supercompensation;

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo de vida do mosquito <i>A. aegypti</i>	10
Figura 2 - Análise de Componentes Principais (PCA). A - Correlação dos compostos químicos com a mortalidade larval de <i>Aedes aegypti</i> . B - <i>Eucalyptus benthamii</i> (1 a 5). <i>Eucalyptus dunnii</i> (6 a 10). <i>Grancam</i> (11 a 15). <i>Eucalyptus grandis</i> (16 a 20). <i>Eucalyptus saligna</i>	33
Figura 3 - Árvore de regressão. Indicação da relação de mortalidade de <i>Aedes aegypti</i> aos compostos químicos.	36
Figura 4 - Proporções de mortalidade média de larvas de <i>A. aegypti</i> ao longo de um período de sete semanas de exposição ao óleo essencial <i>E. benthamii</i> nas concentrações de 18,5 ppm (triângulo fechado), 8,5 ppm (círculo fechado) e controle (círculo aberto).	50
Figura 5 - Proporção média de larvas que sobreviveram até a idade adulta em cada uma das concentrações, 0 (controle); 8,5 ppm (CL50) e 18,5 ppm (CL90) do óleo essencial <i>E. benthamii</i> , após todo o período de desenvolvimento larval.	50
Figura 6 - Comparação entre a longevidade média de adultos (dias) do mosquito <i>A. aegypti</i> quando submetidas a uma concentração do óleo essencial <i>E. benthamii</i> de 18,5 ppm comparada ao controle (0 ppm).....	51
Figura 7 - Tamanho médio das asas de indivíduos adultos, machos (triângulos fechados) e fêmeas (círculos abertos), do mosquito <i>A. aegypti</i> em cada uma das concentrações (0, 8,5 e 18,5 ppm) do óleo essencial <i>E. benthamii</i>	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais compostos químicos identificados com a porcentagem relativa da área total no cromatograma dos óleos essenciais de sete espécies de Eucalyptus analisados por cromatografia gasosa acoplada a espectrofotometria de massa (GC-MS).	30
Tabela 2 - Valor de p. Índice de indicação e grupo correspondente a indicação da análise de compostos indicadores (%) nos óleos essenciais em 100 ppm.....	31
Tabela 3 - Mortalidade Larval de mosquito Aedes aegypti (%) e Desvio Padrão (%) no tempo de 24 horas nas diferentes concentrações.	32
Tabela 4 - Valores de graus de liberdade (GL), Modelo F, significância (p) e análise de contraste (AC) no Modelo Linear Generalizado (GLM - A) entre espécie de planta, Concentração química e interação Planta:Concentração sobre a proporção de mortalidade larval.	35

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	9
1.1 Mosquito vetor.....	9
1.2 Ciclo de vida do mosquito vetor <i>A. aegypti</i>	10
1.3 Medidas de controle do <i>A. aegypti</i>	12
1.4 Óleos essenciais de plantas como inseticidas	13
1.5 Gênero <i>Eucalyptus</i>	14
1.6 Efeito no desenvolvimento	16
2 HIPÓTESES	17
3 OBJETIVOS	17
3.1 Objetivo geral	17
3.2 Objetivos específicos	17
4 REFERÊNCIAS	18
CAPÍTULO I	22
CAPÍTULO II.....	44

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Mosquito vetor

O mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762), (Diptera, Culicidae), é o vetor de algumas doenças, dentre elas a dengue, febre amarela, febre chikungunya e a febre pelo zika vírus (ZIKV). A dengue emergiu como a principal arbovirose no mundo, atingindo milhões de pessoas anualmente em vários continentes, esse resultado deve-se ao ciclo urbano do vírus, transmitido pelo *A. aegypti* (WHO, 2009). É praticamente impossível discutir a erradicação do mosquito vetor devido à sua capacidade de adaptação ao ambiente urbano e ao clima tropical, sendo possível apenas atuar no sentido de controle da população. É necessário estudar técnicas de maiores resultados e estudos científicos, para controle químico, controle biológico e controle físico (SILVA; ARIANO; SCOPEL, 2008).

O Zika vírus teve o primeiro relato de transmissão na América Latina em 2015, com casos identificados no Brasil (ZANLUCA *et al.*, 2015). Como o mosquito *Aedes aegypti* pode transmitir ZIKV e é um inseto abundante no Brasil, a transmissão autóctone foi estabelecida (HENNESSEY; FISCHER; STAPLES, 2016). No caso da dengue, 50 milhões de infecções ocorrem anualmente com 500 mil casos de dengue hemorrágica e 22 mil mortes, principalmente entre crianças (WHO, 2012). Dentre os fatores condicionantes para o desenvolvimento destas doenças pode-se destacar as condições inadequadas de moradia, o destino incorreto de resíduos sólidos urbanos, a intermitência no abastecimento de água, as precárias condições de infraestrutura urbana e a gestão incorreta do lixo (CUNHA *et al.*, 2008). Ainda, o crescimento urbano gera concentração de pessoas, que aliado às condições precárias de saneamento básico, à moradia inadequada e à fatores culturais e educacionais proporciona condições favoráveis à transmissão do vírus da dengue (CUNHA *et al.*, 2008; MACHADO; OLIVEIRA; SOUZA-SANTOS, 2009).

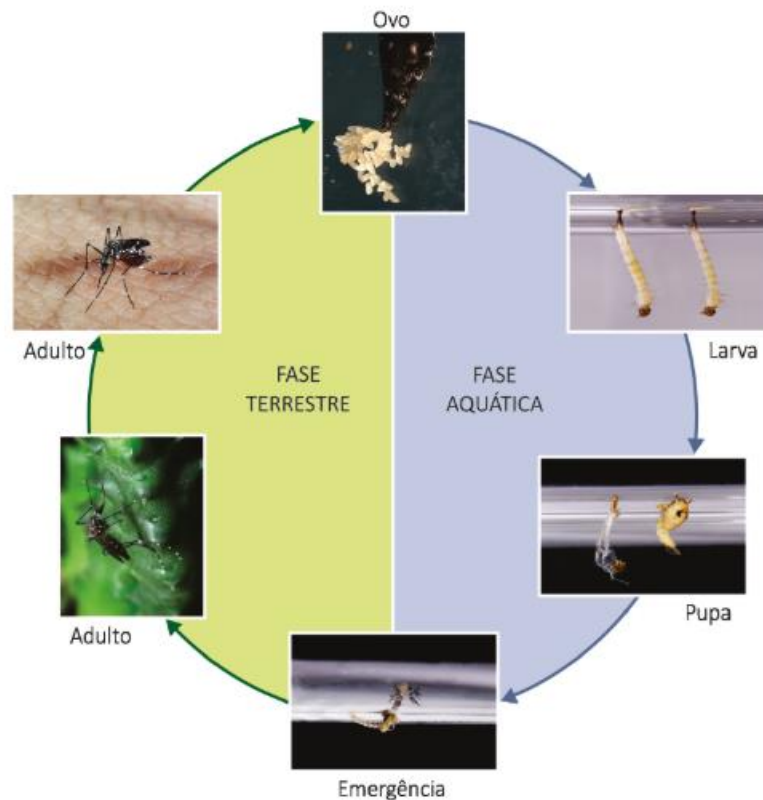
Os esforços são direcionados para evitar a proliferação da população de mosquitos. Os mecanismos de controle incluem (1) o controle químico da população adulta por pulverização e pulverização com volume ultrabaixo (ULV); (2) o controle químico de larvas por larvicidas; (3) a redução de criadouros de mosquitos pela eliminação de pneus descartados e lixo, drenagem de recipientes desnecessários, etc.; (4) o controle biológico usando parasitas ou / e predadores de mosquitos; e (5) a manipulação

genética de mosquitos para produzir mosquitos refratários à infecção de transmissão, ou insetos estéreis (THOMÉ; YANG; ESTEVA, 2010).

1.2 Ciclo de vida do mosquito vetor *A. aegypti*

O mosquito vetor *A. aegypti* é típico de regiões urbanas de clima tropical e subtropical, com presença de calor e chuvas. O desenvolvimento do mosquito ocorre por metamorfose completa, conforme a figura 1. O processo se inicia com a eclosão do ovo, dando origem à larva de primeiro ínstar. Este processo é seguido por três mudas ou ecdises (processo de troca de pele que permite o crescimento do inseto), conduzindo às fases de segundo, terceiro e quarto ínstar larval. Uma quarta ecdise, dá origem à pupa, e finalmente ocorre a emergência do mosquito adulto, masculino ou feminino (SAÚDE (BRASIL), 2001). Os machos adultos buscam ativamente copular as fêmeas, que necessitam ingerir sangue para que ocorra o desenvolvimento completo do ovário, quando então, tornam-se grávidas (VALLE; PIMENTA; CUNHA, 2015). Embora as fêmeas possam sugar o sangue de outros animais vertebrados, são os humanos as fontes sanguíneas mais procuradas (FOOTE, 1961; SAÚDE (BRASIL), 2001; VALLE; PIMENTA; CUNHA, 2015).

Figura 1 - Ciclo de vida do mosquito *A. aegypti*



Fonte: Valle; Pimenta; Cunha, (2015).

Os ovos do *A. aegypti* medem aproximadamente 1 mm de comprimento e apresentam contorno alongado e fusiforme (SAÚDE (BRASIL), 2001). As fêmeas grávidas depositam seus ovos fora da água, aderindo-os na parede interna e úmida do recipiente, próxima a superfície da água. Os ovos ficam aderidos durante toda a embriogênese. A embriogênese se completa em 2-3 dias após postura quando a temperatura está acima de 25°C, mas pode demorar mais tempo se a temperatura for abaixo de 20 °C (FARNESI *et al.*, 2009).

A postura de ovos está diretamente relacionada a quantidade de sangue ingerido, sendo que após a fecundação a fêmea *A. aegypti* suga cerca de 2 µl de sangue, quase duplicando seu peso corporal. Após a hematofagia, a fêmea engorgitada passa por período de digestão do sangue ingerido que é rico em proteínas e produz os ovos (JOY *et al.*, 2010). Os ovos são capazes de resistir a longos períodos de dessecação, que podem sobreviver por mais de um ano (SAÚDE (BRASIL), 2001). A capacidade de resistência dos ovos de *A. aegypti* à dessecação é um sério obstáculo para sua erradicação e explica o sucesso evolutivo da espécie na colonização de diversas e distintas regiões do planeta (SAÚDE (BRASIL), 2001).

A estrutura corporal de uma larva de *A. aegypti* é composto por três regiões distintas: cabeça, tórax e abdômen, sendo o último dividido em oito segmentos (SAÚDE (BRASIL), 2001). O segmento posterior e anal do abdômen tem quatro brânquias lobuladas para regulação osmótica e um sifão, ou tubo de ar, que é utilizado para capturar o oxigênio da atmosfera proporcionando o processo de respiração. O sifão é curto, grosso e esclerotizado, o que o torna mais escuro que os demais segmentos corpóreos. A larva é fotossensível e também sensível a movimentos bruscos, apresentando o comportamento de deslocar-se com rapidez para buscar refúgio no fundo do recipiente (SAÚDE (BRASIL), 2001).

A duração da fase larvária dura entre 7 a 10 dias em condições favoráveis de alimentos e temperatura média entre 26 e 28 °C. Porém em condições desfavoráveis, como as de elevada densidade e pouco alimento, as larvas de *A. aegypti* podem levar mais de duas semanas para entrarem no estágio de pupa e também podem gerar fêmeas menores (VALLE; PIMENTA; CUNHA, 2015). As larvas se alimentam de matéria orgânica em suspensão, aderida às paredes ou sedimentada no fundo dos criadouros, variando desde bactérias e algas até detritos vegetais e de animais invertebrados (VALLE;

PIMENTA; CUNHA, 2015). Durante o período larval, a quantidade de alimento *per capita*, a densidade larval, a temperatura ambiente e o volume de água influenciam na taxa de sobrevivência da larva, sua velocidade de desenvolvimento, o percentual de larvas que conseguirá se transformar em pupa, o tamanho e o peso das pupas formadas e dos adultos emergidos delas (VALLE; PIMENTA; CUNHA, 2015). Fatores estressores em recipientes de mosquitos podem ser mediados por competição intraespecífica (BREAUX; SCHUMACHER; JULIANO, 2014; JULIANO, 2009), interespecífica e predação (ALBENY-SIMÕES *et al.*, 2015).

A fase de pupa é a mais vulnerável do inseto, principalmente porque as pupas não se alimentam e não conseguem se defender do ataque de predadores (VALLE; PIMENTA; CUNHA, 2015). O período de desenvolvimento pupal leva em torno de dois a três dias, mas também dependerá diretamente da história de vida larval, principalmente no que tange a obtenção de alimento. Quando inativas, as pupas se mantêm na superfície da água flutuando e respirando oxigênio atmosférico através de um par de sifões presentes na região dorsal (SAÚDE (BRASIL), 2001). É nesta fase que ocorre a metamorfose do estágio larval para o adulto.

O adulto que eclode, voa em busca de abrigo, que consiste em locais úmidos e protegidos da luz e do vento (VALLE; PIMENTA; CUNHA, 2015). Os mosquitos adultos são escuros, com faixas brancas nas bases dos segmentos tarsais e um desenho em forma de lira no mesonoto (SAÚDE (BRASIL), 2001). O macho se distingue essencialmente da fêmea por possuir antenas plumosas e palpos mais longos. Os mosquitos podem acasalar dentro de 24 horas após emergirem (SAÚDE (BRASIL), 2001).

1.3 Medidas de controle do *A. aegypti*

O controle do *A. aegypti* nas últimas décadas tem sido realizado principalmente com inseticidas químicos sintéticos (EBADOLLAHI, 2013; LEES *et al.*, 2014). Contudo, as populações de *A. aegypti* que persistem a esses inseticidas tornam-se resistentes (CANDIDO *et al.*, 2013; HEMINGWAY; RANSON, 2000). Entre os principais inseticidas sintéticos utilizados no controle de mosquitos estão os organofosforados, carbamatos, piretróides e neonicotinóides (EBADOLLAHI, 2013). Embora eficazes em alguns momentos, o uso desses inseticidas altera os sistemas naturais de controle biológico e leva a surtos de população de insetos (CHENG *et al.*, 2003). Assim, o uso de inseticidas muitas vezes resulta no desenvolvimento generalizado de resistência,

provocando efeitos indesejáveis em organismos não alvos e impactos na saúde ambiental e humana (YANG *et al.*, 2002).

A seleção de populações de mosquitos resistentes aos inseticidas resulta no aumento da frequência de aplicação de inseticida, com dosagens crescentes, rendimentos diminuídos, causando danos ambientais e recrudescimento de doenças quando os vetores não podem ser controlados (SIMAS *et al.*, 2004). Ainda sobre os organofosforados, embora forneçam bom efeito larvicida e sejam de baixo custo, frequentemente são rejeitados pelas pessoas por causa do forte cheiro e ligeira turbidez na água. Além disso, esse inseticida tem a desvantagem de efeitos negativos sobre organismos não-alvo (LUCIA *et al.*, 2007). Em relação à proteção individual contra o mosquito adulto, o método mais adotado é a aplicação de repelentes para se proteger das picadas (LALTHAZUALI; MATHEW, 2017). O N, N-dietil-m-metilbenzamida (Deet), tem sido considerado um dos mais eficazes repelentes sintéticos contra mosquitos (ZHU *et al.*, 2006). Contudo, o Deet é especialmente perigoso em crianças, induzindo a encefalopatia (BRIASSOULIS; NARLIOGLOU; HATZIS, 2001).

Para minimizar o impacto dos compostos sintéticos no ambiente e na saúde humana têm sido adotadas estratégias alternativas usando pesticidas com base em óleos essenciais de plantas, visando diminuir os vetores de doenças, sendo que atualmente tal prática tem se apresentado uma das soluções mais promissoras (PAVELA, 2015).

1.4 Óleos essenciais de plantas como inseticidas

Os óleos essenciais são metabólitos secundários importantes para a defesa de plantas (FRAENKEL, 1959). São considerados óleos voláteis que possuem fortes componentes aromáticos e são subprodutos do metabolismo das plantas (GHOSH; CHOWDHURY; CHANDRA, 2012). Os insetos se alimentam desses metabólitos secundários que apresentam efeitos relativamente inespecíficos em uma ampla gama de alvos moleculares. Os óleos possuem composto sintetizados e armazenados em estruturas de secreção (BAKKALI *et al.*, 2008). Ademais, podem conter cerca de 20 a 60 componentes em concentrações bastante diferentes, sendo que dois ou três componentes principais podem se apresentar em concentrações bastante elevadas (20 - 70 %) e, geralmente, esses principais componentes determinam as propriedades biológicas dos óleos essenciais (PAVELA, 2015).

Os óleos essenciais são misturas complexas compostas principalmente de terpenóides, particularmente monoterpenos (C10) e sesquiterpenos (C15), e uma

variedade de compostos aromáticos como fenóis, óxidos, éteres, álcoois, ésteres, aldeídos e cetonas que determinam o aroma e o odor característicos da planta (BAKKALI *et al.*, 2008). Os monoterpenos são as moléculas mais representativas constituindo 90 % dos óleos essenciais (BAKKALI *et al.*, 2008). Os principais constituintes de monoterpenos incluem os álcoois, aldeídos, carburas, cetonas, éteres, ésteres, peróxidos, fenóis e lactonas (BAKKALI *et al.*, 2008). Os principais fitoquímicos dos grupos acima referidos incluem o α -pinene, mentol, linalol, carvona, cânfora, eucaliptol, tujona, mirceno, timol, cineol, ascaridol e nepetalactona (PAVELA; BENELLI, 2016).

Apresentam uma rápida degradação de seus compostos químicos pelos raios ultravioletas, por isso o seu efeito residual é baixo, portanto, podem ser mais específicos para o inseto e menos agressivo com os inimigos naturais dos insetos (EBADOLLAHI, 2013). Os óleos essenciais, ainda, desenvolvem resistência mais lenta em comparação com inseticidas sintéticos (EBADOLLAHI, 2013). Essas características permitem que óleos essenciais com bioatividade possam ser utilizados mesmo em áreas sensíveis como escolas, restaurantes, hospitais e residências, ganhando destaque na área de pesquisa sobre seus reais efeitos sobre determinadas espécies de mosquitos vetores de doença (BATISH *et al.*, 2008). O desenvolvimento de inseticidas naturais ou biológicos pode ajudar a diminuir os efeitos negativos dos produtos químicos sintéticos, permitindo que sejam usados para complementar, otimizar e aumentar as atuais estratégias integradas de controle de pragas (EBADOLLAHI, 2013).

É possível obter óleos essenciais de partes não lenhosas do planta, particularmente das folhas (BATISH *et al.*, 2008). Esses óleos são definidos como produtos obtidos de hidrodestilação, desidratação a vapor, destilação a seco ou prensagem mecânica a frio de plantas (PAVELA, 2015). O método clássico de preparação é baseado no aparato de destilação a vapor Clevenger desenvolvido em 1928. Hoje, este método foi adaptado e ampliado para uso industrial (PAVELA, 2015). Os métodos modernos de extração incluem um processo assistido por micro-ondas e extração com fluido supercrítico (CHIASSON *et al.*, 2001; REVERCHON, 1997).

1.5 Gênero Eucalyptus

No universo dos óleos essenciais, o eucalipto tem recebido grande destaque. O eucalipto pertence a ordem Myrtales, família Myrtaceae, incluindo pelo menos 133

gêneros e 3.800 espécies. Encontradas na Austrália, sudeste asiático, Sul do continente Americano e pequena representação na África (EBADOLLAHI, 2013). Estas espécies têm propriedades físicas e químicas diversas, sendo utilizadas amplamente para as mais distintas finalidades como, lenha, carvão vegetal, celulose, geração de energia, medicamentos, entre outros. Os óleos essenciais de eucalipto possuem reconhecida atividade contra fungos, bactérias, insetos, ácaros e ervas daninhas, é um produto simples e alternativo ao controle de pragas (MOSSI *et al.*, 2011).

O óleo essencial de eucalipto já foi utilizado em estudos referentes ao seu efeito inseticida e até antimicrobiano (AUYSAWASDI *et al.*, 2016; DELAQUIS *et al.*, 2002). Apresentou resultados positivos para a repelência dos mosquitos adultos de *A. aegypti* com óleos essenciais do eucalipto da espécie *Eucalyptus globulus*. Outros estudos mostraram também atividade antimicrobiana ligadas a espécies de *Eucalyptus* (DELAQUIS *et al.*, 2002; FRANCO *et al.*, 2005). Na pesquisa realizada por LUCIA *et al.* (2012a) para testar a atividades larvicida de 13 óleos essenciais de eucalipto em *A. aegypti*, foram obtidos resultados positivos, no qual o óleo essencial de *E. fastigata* foi o mais eficaz com uma mortalidade larval de 92,85 %, embora não apresente diferenças significativas em relação à *E. radiata* ssp., *E. nobilis* e *E. robusta*.

Os plantios de eucalipto ocupam 5,7 milhões de hectares da área de árvores plantadas do Brasil (“Ibá - Dados Estatísticos”, 2017). No estado de Santa Catarina, em especial na região oeste, o plantio de eucalipto tem se expandido muito nos últimos anos. Em 2016, a área plantada com eucalipto foi de 116.240 ha (“Ibá - Dados Estatísticos”, 2017). O eucalipto tem muito potencial não só na área econômica mas também na indústria farmacêutica, na medicina e no uso contra pragas (LUCIA *et al.*, 2008).

Dentre os estudos realizados sobre o potencial do eucalipto, frente ao mosquito *A. aegypti*, já se tem conhecimento que algumas espécies de *Eucalyptus* que apresentam em sua composição compostos químicos potentes contra insetos e, portanto, podem ser utilizadas ainda na fase larval para evitar que os insetos, em especial o mosquito *A. aegypti*, cheguem na sua fase adulta e transmitam doenças ao ser humano (CHENG *et al.*, 2009, LUCIA *et al.*, 2007, 2012b). Ainda, as medidas de controle destinadas a redução a população larval podem ter resultados distintos sobre os números de adultos, bem como as características dos sobreviventes (ALTO; LORD, 2016).

1.6 Efeito no desenvolvimento

Há pouca compreensão sobre como as intervenções de controle larval utilizando inseticidas biológicos atuam em conjunto com outras fontes de mortalidade na natureza, influenciando no tamanho populacional de adultos e nas características dos mosquitos adultos sobreviventes, que por sua vez influenciam o risco de transmissão de doenças (ALTO; LORD, 2016). Populações de larvas de mosquito em ambientes naturais estão sujeitas à inúmeros fatores estressores que influenciam na densidade populacional, como competição intraespecífica (BREAUX; SCHUMACHER; JULIANO, 2014; JULIANO, 2009), interespecífica e predação (ALBENY-SIMÕES *et al.*, 2015). Existe um padrão de densidade dependente, onde existe maior mortalidade em sistemas com grande densidade de larvas, atribuível na maioria dos casos à concorrência por recursos alimentares (ALTO; LORD, 2016).

Hancock *et al.* (2016) testaram o efeito da infecção da bactéria *Wolbachia* em larvas de mosquitos *A. aegypti*, consideraram a densidade populacional sobre o desenvolvimento do mosquito e constataram que a passagem do estágio de larva para pupa levou um tempo maior para ocorrer em populações com altas densidades. Verificaram também um declínio da fecundidade das fêmeas. Os tempos de desenvolvimento foram dependentes da densidade de maneira geral para ambos indivíduos infectados e não infectados pela bactéria.

É provável que a introdução de biolarvicidas (em concentrações específicas) em ambientes com uma alta densidade larvas pode reduzir a densidade destas, reduzindo a competição. As fontes de mortalidade podem ter dois efeitos, os aditivos, que se referem à soma dos efeitos individuais, e os não aditivos, que se referem à saída da aditividade, podendo ser observada na mortalidade compensatória, onde o número total de sobreviventes não é afetado por múltiplas causas de mortalidade (ALTO; LORD, 2016). Quando a mortalidade causada por um larvicida resulta em uma produção final de adultos igual à habitats sem larvicida considera-se um efeito aditivo e quando a mortalidade causada por um larvicida resulta em uma produção final de adultos maior do que habitats sem larvicida é observado um efeito não aditivo (mortalidade sobrecompensatória ou “efeito Hydra” (ABRAMS; MATSUDA, 2005; MCINTIRE; JULIANO, 2018).

Após um aumento na mortalidade causada pelas mudanças na densidade populacional, ocorrem mudanças compensatórias nos recursos, muitas dessas mudanças têm potencial para reverter o declínio inicial, produzindo uma eventual aumento no equilíbrio ou densidade populacional (ABRAMS, 2009). Este aumento no crescimento

populacional ou supercompensação específica do estágio resulta na produção de mais indivíduos no próximo estágio do ciclo de vida (DE ROOS *et al.*, 2007), no caso do *A. aegypti* maior número de adultos.

2 HIPÓTESES

Como resultados, esperamos verificar que óleos essenciais de eucalipto tem efeitos sobre: A capacidade de letalidade sobre as larvas do mosquito; Quando as larvas forem expostas a dosagens sub-letais provoque interferências no desenvolvimento dos mosquitos (Tamanho, fecundidade e longevidade);

Acreditamos que os óleos essenciais de eucalipto, quando utilizados em concentrações sub-letais, podem interferir do mosquito adulto. Essa interferência se dá pelo stress sofrido pela larva. Esse stress será positivo para tratamentos com concentrações sub-letais, simplesmente porque isso irá diminuir a densidade larval e a competição no sistema. Um sistema menos adensado irá produzir adultos maiores, que vivem mais, que colocam mais ovos e mais aptos a transmitir doenças.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar se os efeitos da atividade biológica dos óleos essenciais de sete espécies de eucalipto interferem na sobrevivência das larvas e no desenvolvimento de mosquitos adultos da espécie *Aedes aegypti*.

3.2 Objetivos específicos

- I. Realizar extração de óleos essenciais de quatro espécies de eucalipto (*Eucalyptus benthamii*, *Eucalyptus dunnii*, *Eucalyptus saligna* e *Eucalyptus grandis*) e de três híbridos (Urograndis Grancam e Urocam).
- II. Identificar compostos químicos presentes nos óleos essenciais das quatro espécies de eucalipto e dos três híbridos;
- III. Avaliar a mortalidade de larvas de *A. aegypti* expostas a óleos essenciais das quatro espécies de eucalipto e dos três híbridos;
- IV. Determinar as concentrações do óleo essencial de *Eucalyptus benthamii* com capacidade de letalidade e sub-letalidade sobre as larvas do mosquito;

- V. Verificar se o óleo essencial de *Eucalyptus benthamii* afeta o desenvolvimento larval, tamanho e longevidade de mosquitos adultos da espécie *A. aegypti*

4 REFERÊNCIAS

- ABRAMS, Peter A. When does greater mortality increase population size? The long history and diverse mechanisms underlying the hydra effect. *Ecology Letters*, v. 12, n. 5, p. 462–474, 2009.
- ABRAMS, Peter A; MATSUDA, Hiroyuki. The effect of adaptive change in the prey on the dynamics of an exploited predator population. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, v. 62, n. 4, p. 758–766, 1 abr. 2005.
- ALBENY-SIMÕES, Daniel *et al.* A multifaceted trophic cascade in a detritus-based system: density-, trait-, or processing-chain-mediated effects? *Ecosphere*, v. 6, n. 3, p. art32, mar. 2015.
- ALTO, Barry W.; LORD, Cynthia C. Transstadial Effects of Bti on Traits of *Aedes aegypti* and Infection with Dengue Virus. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 10, n. 2, p. e0004370, 12 fev. 2016.
- AUYSAWASDI, Nutthanun *et al.* Improving the effectiveness of three essential oils against *Aedes aegypti* (Linn.) and *Anopheles dirus* (Peyton and Harrison). *Parasitology Research*, v. 115, n. 1, p. 99–106, jan. 2016.
- BAKKALI, F. *et al.* Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, v. 46, n. 2, p. 446–475, 1 fev. 2008.
- BATISH, Daizy R. *et al.* *Eucalyptus* essential oil as a natural pesticide. *Forest ecology and management*, 2008. Disponível em: <<http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201301562017>>. Acesso em: 25 nov. 2018.
- BREAUX, Jennifer A.; SCHUMACHER, Molly K.; JULIANO, Steven A. What does not kill them makes them stronger: larval environment and infectious dose alter mosquito potential to transmit filarial worms. *Proceedings. Biological Sciences*, v. 281, n. 1786, 7 jul. 2014.
- BRIASSOULIS, G; NARLIOGLOU, M; HATZIS, T. Toxic encephalopathy associated with use of DEET insect repellents: a case analysis of its toxicity in children. *Human & Experimental Toxicology*, v. 20, n. 1, p. 8–14, 1 jan. 2001.
- CANDIDO, Lafayette Pereira *et al.* Bioactivity of plant extracts on the larval and pupal stages of *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 46, n. 4, p. 420–425, ago. 2013.
- CHENG, Sen-Sung *et al.* Bioactivity of selected plant essential oils against the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* larvae. *Bioresource Technology*, v. 89, n. 1, p. 99–102, ago. 2003.

- CHENG, Sen-Sung *et al.* Chemical compositions and larvicidal activities of leaf essential oils from two eucalyptus species. *Bioresource Technology*, v. 100, n. 1, p. 452–456, 1 jan. 2009.
- CHIASSON, H. *et al.* Acaricidal properties of *Artemisia absinthium* and *Tanacetum vulgare* (Asteraceae) essential oils obtained by three methods of extraction. *Journal of Economic Entomology*, v. 94, n. 1, p. 167–171, fev. 2001.
- CUNHA, Maria da Consolação Magalhães *et al.* Fatores associados à infecção pelo vírus do dengue no Município de Belo Horizonte, Estado de Minas Gerais, Brasil: características individuais e diferenças intra-urbanas. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, v. 17, n. 3, p. 217–230, set. 2008.
- DE ROOS, André *et al.* Food-Dependent Growth Leads to Overcompensation in Stage-Specific Biomass When Mortality Increases: The Influence of Maturation versus Reproduction Regulation. *The American naturalist*, v. 170, p. E59-76, 1 out. 2007.
- DELAQUIS, Pascal J. *et al.* Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *International Journal of Food Microbiology*, v. 74, n. 1–2, p. 101–109, 25 mar. 2002.
- EBADOLLAHI, Asgar. Essential Oils Isolated from Myrtaceae Family as Natural Insecticides. *Annual Review & Research in Biology*, v. 3, 4 mar. 2013.
- FARNESI, Luana Cristina *et al.* Embryonic development of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): influence of different constant temperatures. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 104, n. 1, p. 124–126, fev. 2009.
- FOOTE, Richard H. *Aedes aegypti* (L.), the Yellow Fever Mosquito. Its life history, bionomics, and structure. Sir S. Rickard Christophers. Cambridge University Press, New York, 1960. xii + 739 pp. Illus. \$14.50. *Science*, v. 133, n. 3463, p. 1473–1474, 12 maio 1961.
- FRAENKEL, Gottfried S. The Raison d'Être of Secondary Plant Substances: These odd chemicals arose as a means of protecting plants from insects and now guide insects to food. *Science*, v. 129, n. 3361, p. 1466–1470, 29 maio 1959.
- FRANCO, J. *et al.* Composição química e atividade antimicrobiana in vitro do óleo essencial de *Eucalyptus cinerea* F. Mull. ex Benth., Myrtaceae, extraído em diferentes intervalos de tempo. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 15, n. 3, p. 191–194, set. 2005.
- GHOSH, Anupam; CHOWDHURY, Nandita; CHANDRA, Goutam. Plant extracts as potential mosquito larvicides. *The Indian Journal of Medical Research*, v. 135, n. 5, p. 581–598, maio 2012.
- HANCOCK, Penelope A. *et al.* Predicting Wolbachia invasion dynamics in *Aedes aegypti* populations using models of density-dependent demographic traits. *BMC Biology*, v. 14, n. 1, p. 96, 8 nov. 2016.
- HEMINGWAY, Janet; RANSON, Hilary. Insecticide Resistance in Insect Vectors of Human Disease. *Annual Review of Entomology*, v. 45, n. 1, p. 371–391, jan. 2000.

HENNESSEY, Morgan; FISCHER, Marc; STAPLES, J. Erin. Zika Virus Spreads to New Areas - Region of the Americas, May 2015-January 2016. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*, v. 65, n. 3, p. 55–58, 29 jan. 2016.

Ibá - Dados Estatísticos. Disponível em: <<https://iba.org/dados-estatisticos>>. Acesso em: 6 abr. 2019.

JOY, Teresa K. *et al.* The impact of larval and adult dietary restriction on lifespan, reproduction and growth in the mosquito *Aedes aegypti*. *Experimental Gerontology*, v. 45, n. 9, p. 685–690, set. 2010.

JULIANO, Steven A. Species interactions among larval mosquitoes: context dependence across habitat gradients. *Annual Review of Entomology*, v. 54, p. 37–56, 2009.

LALTHAZUALI, Null; MATHEW, Nisha. Mosquito repellent activity of volatile oils from selected aromatic plants. *Parasitology Research*, v. 116, n. 2, p. 821–825, fev. 2017.

LEES, Rosemary Susan *et al.* Review: Improving our knowledge of male mosquito biology in relation to genetic control programmes. *Acta Tropica*, v. 132, p. S2–S11, abr. 2014.

LUCIA, Alejandro *et al.* Larvicidal effect of *Eucalyptus grandis* essential oil and turpentine and their major components on *Aedes aegypti* larvae. *Journal of the American Mosquito Control Association*, v. 23, n. 3, p. 299–303, set. 2007.

LUCIA, Alejandro *et al.* Validation of models to estimate the fumigant and larvicidal activity of *Eucalyptus* essential oils against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research*, v. 110, n. 5, p. 1675–1686, maio 2012a.

LUCIA, Alejandro *et al.* Validation of models to estimate the fumigant and larvicidal activity of *Eucalyptus* essential oils against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research*, v. 110, n. 5, p. 1675–1686, maio 2012b.

LUCIA, Alejandro *et al.* Yield, chemical composition, and bioactivity of essential oils from 12 species of *Eucalyptus* on *Aedes aegypti* larvae. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, v. 129, n. 1, p. 107–114, 1 out. 2008.

MACHADO, Juliana Pires; OLIVEIRA, Rosely Magalhães De; SOUZA-SANTOS, Reinaldo. Análise espacial da ocorrência de dengue e condições de vida na cidade de Nova Iguaçu, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 25, n. 5, p. 1025–1034, maio 2009.

MCINTIRE, Kristina M.; JULIANO, Steven A. How can mortality increase population size? A test of two mechanistic hypotheses. *Ecology*, v. 99, n. 7, p. 1660–1670, 2018.

MOSSI, Altemir J. *et al.* Insecticidal and repellency activity of essential oil of *Eucalyptus* sp. against *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera, Curculionidae). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 91, n. 2, p. 273–277, 30 jan. 2011.

PAVELA, Roman. Essential oils for the development of eco-friendly mosquito

larvicidas: A review. *Industrial Crops and Products*, v. 76, p. 174–187, 15 dez. 2015.

PAVELA, Roman; BENELLI, Giovanni. Ethnobotanical knowledge on botanical repellents employed in the African region against mosquito vectors – A review. *Experimental Parasitology*, v. 167, p. 103–108, 1 ago. 2016.

REVERCHON, Ernesto. Supercritical fluid extraction and fractionation of essential oils and related products. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 10, n. 1, p. 1–37, 14 abr. 1997.

SAÚDE (BRASIL), Fundação Nacional De. *Dengue: instruções para pessoal de combate ao vetor: manual de normas técnicas*. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/funasa/man_dengue.pdf>. Acesso em: 6 abr. 2019.

SILVA, Jesiel Souza; ARIANO, Zilda de Fátima; SCOPEL, Irací. A dengue no Brasil e as políticas de combate ao *Aedes aegypti*: da tentativa de erradicação às políticas de controle - The dengue fever in Brazil and combat dengue fever to the *Aedes aegypti*: of the try eradication to control policies. *Hygeia*, v. 4, n. 6, 25 jun. 2008. Disponível em: <<http://www.seer.ufu.br/index.php/hygeia/article/view/16906>>. Acesso em: 30 nov. 2018.

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

THOMÉ, Roberto C. A.; YANG, Hyun Mo; ESTEVA, Lourdes. Optimal control of *Aedes aegypti* mosquitoes by the sterile insect technique and insecticide. *Mathematical Biosciences*, v. 223, n. 1, p. 12–23, 1 jan. 2010.

VALLE, Denise; PIMENTA, Denise Nacif; CUNHA, Rivaldo Venâncio Da. *Dengue: teorias e práticas*. [S.l.]: SciELO - Editora FIOCRUZ, 2015.

YANG, Young-Cheol *et al.* A piperidine amide extracted from *Piper longum* L. fruit shows activity against *Aedes aegypti* mosquito larvae. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 50, n. 13, p. 3765–3767, 19 jun. 2002.

ZANLUCA, Camila *et al.* First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 110, n. 4, p. 569–572, 9 jun. 2015.

ZHU, Junwei *et al.* Adult repellency and larvicidal activity of five plant essential oils against mosquitoes. *Journal of the American Mosquito Control Association*, v. 22, n. 3, p. 515–522, set. 2006.

CAPÍTULO I

AValiação de Atividade Larvívica de Óleos Essenciais de Eucalipto sobre o *Aedes aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE)

Carine Gallon¹; Rafael H. Martello¹; Gilberto Cozzer²; Veluma I. M. De Bastiani³; Jean F. F. Calisto³; Paulo Floss⁴; Renan de Souza Rezende¹; Jacir Dal Magro¹; Daniel Albeny-Simões¹

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais, Universidade Comunitária da Região de Chapecó, 3321-8045, Chapecó-SC, Brasil.

²Curso de Ciências Biológicas, Universidade Comunitária da Região de Chapecó, 3321-8045, Chapecó-SC, Brasil.

³Universidade Comunitária da Região de Chapecó, 3321-8045, Chapecó-SC, Brasil.

⁴EPAGRI - Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina, Chapecó - SC

ABSTRACT

The mosquito *Aedes aegypti* is the vector of diseases, among them dengue. Currently, the main tool in mosquito control is the application of synthetic insecticides, which has shown resistance of insect populations and environment impacts. In this scenario, alternative methods of vector control arise, such as natural compounds from plants. This study proposed to evaluate if the effects of the biological activity of the essential oils of *Eucalyptus* interfere in the survival of the larvae of *A. aegypti*. The essential oils were extracted by hydrodistillation in a Clevenger apparatus and analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS), further diluted in water with acetone (0.40%) at the concentrations: 100, 50, 25, 10, and 0ppm. The tests were conducted in plastic containers with a capacity of 80mL, where 200µL of solution was mixed with ultrapure water, totaling 50mL of solution. To these solutions were added 20 third and fourth instar larvae. The experiment was performed in triplicate, using a control containing only water and acetone. The observations and count of the number of dead larvae were made in the intervals of 1h, 2h, 4h, and 24h. The major compounds identified in the essential oils were 1,8-cineole and α -pinene. The *Eucalyptus* essential oils tested showed larvicidal activity in most of the evaluated concentrations, mainly in the 50 and 100ppm. The highest larvicidal potential was 100% for the concentration of 100ppm for the oils of *E. benthamii* and *Urograndis* (24h). According to PCA analysis, the larval mortality of *A. aegypti* shows a positive correlation with the compounds terpinene, O-

cymol, O-cymene, terpineol, 2,5-furandione, 3-dodecyl, α -pinene, globulol and ledol. The essential oils of *Eucalyptus* had a larvicidal effect on the larvae of *A. aegypti*. Thus, our results may be useful in the search for natural larvicidal products.

Palavras-chave: Larvicide activity; *Eucalyptus*; α -pinene.

1 INTRODUÇÃO

O controle natural de vetores com o uso de produtos naturais é menos impactante em relação aos inseticidas sintéticos, pois produtos naturais são biodegradáveis e têm efeitos mínimos sobre os organismos não-alvo e sobre o meio ambiente (MUTURI *et al.*, 2011). Neste sentido, extratos vegetais e óleos essenciais são um método alternativo que tem sido amplamente estudado (BENELLI *et al.*, 2012; CHENG *et al.*, 2003; HALDAR; HALDAR; CHANDRA, 2013). Produtos botânicos, bem como seus metabólitos isolados, têm apresentado efeitos tóxicos contra mosquitos, com atividade tóxica nos estágios de ovos, larvas, pupas repelente à oviposição e aos mosquitos adultos (AMER; MEHLHORN, 2006a, b; BENELLI, 2015).

Os mosquitos da espécie *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) são vetores de doenças como a febre amarela, febre Chikungunya, dengue e já teve comprovada a sua capacidade de transportar Zika vírus (LAZEAR; DIAMOND, 2016). A dengue é uma doença emergente, considerada o arbovírus mais importantes no mundo (OMS, 2015). Segundo a Organização Mundial da Saúde, estima-se que 50 a 400 milhões de pessoas são infectadas anualmente nas zonas tropicais e subtropicais do mundo (OMS, 2015). O Zika vírus foi detectado no Brasil no início de 2015 e se espalhou por várias regiões do país, sendo a região nordeste a mais afetada. Este cenário é ainda mais grave com a ligação entre o ZIKA vírus e a formação cerebral, levando a quadros de microcefalia (LAZEAR; DIAMOND, 2016). A febre Chikungunya, anteriormente restrita aos países da África e da Ásia, vem sendo diagnosticada nos países ocidentais por causa do fluxo maciço de turistas (ALBUQUERQUE *et al.*, 2012). Atualmente, quase a totalidade do território brasileiro é classificado como uma área de risco moderado a alto para essa doença (ALBUQUERQUE *et al.*, 2012).

O mosquito *A. aegypti* apresenta um ciclo de vida em que adultos e larvas apresentam diferentes histórias de vida, tendo em vista que os desenvolvimentos dos estágios imaturos ocorrem em ambientes aquáticos, enquanto os adultos ocupam o ambiente terrestre (MUTURI *et al.*, 2011). Assim, o sucesso reprodutivo da espécie

depende: (1) da obtenção de sangue pela fêmea, sem a qual os ovos não são formados; (2) da presença de criadouros com água, adequados para o sucesso do desenvolvimento larval; e (3) de uma temperatura que permita à espécie exibir as atividades necessárias para se propagar. Para o adulto, o grau de atividade e duração da vida depende de condições de temperatura, umidade, abrigo e alimento. Diante desse cenário, o controle do vetor é um dos pilares na redução da carga vetorial dessas doenças (MUTURI *et al.*, 2011).

Tentativas de controle populacional do mosquito *A. aegypti* tem sido constantes, sendo que uma das principais ferramentas no controle de mosquitos é a aplicação de inseticidas sintéticos como organoclorados, organofosforados e compostos piretróides (EBADOLLAHI, 2013). Embora inicialmente efetivo, a grande maioria desses compostos químicos selecionam genes que conferem resistência ao mosquito (DINESH *et al.*, 2015; LEES *et al.*, 2014). Em *A. aegypti* já foi comprovada resistência múltipla a organofosforados (temephos e malation) e piretróide (GOINDIN *et al.*, 2017).

Alguns métodos alternativos de controle de vetores têm surgido e tem sido testado com relativo sucesso, como a técnica do macho estéril (THOMÉ; YANG; ESTEVA, 2010), os mosquitos geneticamente modificados (CARVALHO *et al.*, 2015; FUCHS; NOLAN; CRISANTI, 2012) e os mosquitos que carregam bactérias que ocorrem naturalmente em insetos, como a *Wolbachia pipiens* que competem com os vírus eliminando assim a possibilidade de transmissão (DUTRA *et al.*, 2016). Além dos extratos e óleos vegetais que apresentam compostos importantes em interações planta-inseto, esses, podem ser uma alternativa ou uma complementação aos tratamentos com inseticidas sintéticos (DUBEY, 2011).

Os óleos essenciais são produtos do metabolismo das plantas e comumente referidos como metabólitos secundários de plantas (FAHN, 2000; PAVELA, 2015). São voláteis e servem como mecanismo de defesa das plantas para suportar a pressão da seleção contínua de predadores herbívoros e outros fatores ambientais (GOVINDARAJAN *et al.*, 2015). Os óleos são misturas complexas que podem conter cerca de 20 a 60 componentes, dos quais dois ou três apresentam concentrações relativamente altas (20-70%) e determinam as propriedades biológicas dos óleos essenciais (PAVELA, 2015). Como os inseticidas derivados de plantas compreendem misturas de diversos compostos químicos, eles atuam em conjunto tanto nos processos comportamentais quanto fisiológicos, possibilitando poucas chances de que as pragas desenvolvam resistência a essas substâncias (GHOSH; CHOWDHURY; CHANDRA,

2012; ISMAN, MURRAY B, 2000). Extratos de plantas podem afetar o comportamento de pragas, incluindo repelir a praga ou inibir a atividade de alimentação, bem como fisiologia, incluindo a ecdise, inibição respiratória, redução do crescimento e fecundidade e ruptura da cutícula (ATTIA *et al.*, 2013; BENELLI *et al.*, 2012; KOUL, 2008; KOUL; WALIA; DHALIWAL, 2008; PAVELA, 2011).

O eucalipto é uma importante fonte de óleos essenciais que podem ser amplamente aplicados na indústria farmacêutica, produtos de limpeza e perfumes (HYLDGAARD; MYGIND; MEYER, 2012). O *Eucalyptus* é um gênero da família Myrtaceae nativa da Austrália, Nova Zelândia e Tasmânia (GRATTAPAGLIA *et al.*, 2012), bastante conhecido por sua importância econômica (RENCORET; GUTIÉRREZ; DEL RÍO, 2007). A composição química dos óleos essenciais das espécies já estudadas apresenta como principais substâncias o Hidroxiacetaldeído, Eugenol, 4-Vinilsiringol, Levoglucosano, 4-Vinilguaiacol, 2-Hidroxi-3-metil-2-ciclopenten-1-ona, α -pineno, α -phellandrene, Cineole, p-cymene, Limoneno Eucamalol, Citronellal, dentre outros (BATISH *et al.*, 2008; CHENG *et al.*, 2009). As diferentes espécies podem apresentar diferentes composições químicas do óleo essencial e, assim, ter diferentes atividades biológicas (BATISH *et al.*, 2008). O potencial de algumas espécies de eucalipto contra o mosquito *A. aegypti* já tem sido reportado na literatura (CHENG *et al.*, 2009; LUCIA *et al.*, 2012; SRITABUTRA *et al.*, 2011).

Percebendo a necessidade de desenvolver novos larvicidas contra mosquitos que prejudiquem menos o ambiente e a saúde humana, estudamos a bioatividade de óleos essenciais de eucalipto para o controle de larvas de *A. aegypti*. Acreditamos que os óleos essenciais de eucalipto tenham efeitos letais sobre larvas de *A. aegypti*, contudo esperamos que existam diferenças no potencial larvicida das diferentes espécies e híbridos de *Eucalyptus* testados, devido à diferença na composição química de cada planta.

O objetivo desse trabalho foi avaliar se os efeitos da atividade biológica dos óleos essenciais de eucalipto afetam na mortalidade das larvas do mosquito *A. aegypti*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

A coleta de amostras de *Eucalyptus* foi realizada em uma área experimental da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI)

localizado no município de Guatambu, Santa Catarina (27 ° 07 '55 "S e 52 ° 44' 04" W), Sul do Brasil. Foram coletadas folhas de árvores adultas das espécies *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage, *Eucalyptus dunnii* Maiden, *Eucalyptus saligna* Smith e *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden e dos híbridos Urograndis (*Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden x *Eucalyptus urophylla* ST Blake), Grancam (*Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden x *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh) e Urocam (*Eucalyptus urophylla* ST Blake x *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh).

A extração dos óleos essenciais foi realizada por meio do processo de hidrodestilação das folhas verdes, em aparelho de Clevenger utilizando quatro repetições de 200g de folhas em balão de 3 L contendo 1,5 L de água ultrapura registrando-se o volume de óleo extraído a cada 30 minutos, pelo tempo necessário até atingir o equilíbrio do volume de óleo.

As amostras de óleo essencial foram analisadas por cromatografia na fase gasosa acoplada a espectrofotometria de massa (CG-MS), em cromatógrafo 7890B Agilent e espectrofotometro de massa 5977A MSD Agilent, com biblioteca NIST08 (NIST/EPA/NIH 2008). Para tal as amostras foram diluídas em álcool etílico à concentração de 10mg/ml, sendo injetado na coluna o volume de 1 µL na razão de Split 100:1. Foi utilizada coluna HP5 (30 m x 250 µ x 0.25 µ) com gás de arraste: hélio, fluxo de 1,0 ml/min, temperatura do injetor de 250 °C, temperatura inicial da análise de 40 °C por 3min, rampa de aquecimento de 10 °C/min, temperatura final de 240 °C por 5 min, temperatura auxiliar do injetor de 280 °C, amostras,. A identificação de componentes individuais foi feito por comparação dos espectros de massa usando a biblioteca de espectros de massas do equipamento NIST 5.01 (Agilent P / N G1033A). A quantidade dos compostos foi obtida pela integração do pico área dos espectrogramas em relação a área espectral total do cromatograma.

2.2 Criação dos mosquitos

As larvas de mosquitos *A. aegypti* utilizadas nos experimentos foram oriundas de uma colônia existente no Laboratório de Entomologia Ecológica (LABENT-Eco), situado no campus da Universidade Comunitária da Região de Chapecó (UNOCHAPECÓ). Os *A. aegypti* foram mantidos a uma temperatura de 27 °C ± 3, fotoperíodo claro escuro 12:12 h. Ovos provenientes da colônia foram eclodidos em recipientes plásticos 20 x 30 cm

contendo 1 L de água e 0,15 g de ração para peixes TetraFin®, em uma densidade de 500 larvas/L.

2.3 Testes de toxicidade sobre larvas de *A. aegypti*

Os óleos essenciais foram diluídos em água com acetona pura (0,40%); LUCIA *et al.*, 2007) nas concentrações de 100, 50, 25, 10 e 0 ppm, completando 200 µL de solução. A diluição foi misturada a água ultrapura, totalizando 50 ml de solução.

O teste de toxicidade foi realizado em microcosmos constituídos de copos plásticos descartáveis com capacidade total de 80 ml, contendo 50 ml das diluições. Utilizamos 20 larvas entre terceiro e quarto instares por unidade experimental, separadas com o auxílio da pipeta de Pasteur. Como controle utilizou-se água ultrapura e acetona (200 µL) totalizando 50ml de solução. Os *A. aegypti* foram mantidos a uma temperatura de 27 °C ± 3, fotoperíodo claro escuro 12:12 h.

2.4 Desenho experimental

O delineamento seguiu o esquema fatorial 7 x 5 (óleos essenciais x concentrações) totalizando 35 tratamentos com três repetições por tratamento. As observações e contagem do número de larvas mortas foram realizadas nos intervalos de 1h, 2h, 4h, e 24h, sendo consideradas mortas aquelas larvas que não apresentaram movimentos ou não respondiam aos estímulos com a pipeta de Pasteur. Durante o experimento, nenhum alimento, com exceção do alimento oferecido no início do experimento, foi adicionado aos microcosmos experimentais. Os *A. aegypti* foram mantidos a uma temperatura de 27 °C ± 3, fotoperíodo claro escuro 12:12 h. Os bioensaios foram embasados no protocolo da Organização Mundial de Saúde (WHO, 2005).

Através do teste de toxicidade foi calculada a curva de mortalidade de larvas de *A. aegypti* causada pelo aumento gradual na concentração dos óleos essenciais. Esta metodologia é uma adaptação dos métodos descritos por (GOVINDARAJAN *et al.*, 2016).

2.5 Análise estatística

Para avaliar as diferenças nas proporções das mortalidades de *A. aegypti* utilizou-se o modelo linear generalizado (GLM), analisado por meio da distribuição quase-binomial (link = logit, teste = qui-quadrado). Os dados de proporção de mortalidade de larvas de mosquitos (variável resposta) foram analisados utilizando as espécies de *Eucalyptus* (sete variedades), concentrações (0, 10, 25, 50 e 100 ppm) e a interação entre esses dois fatores (CRAWLEY, 2013) como variáveis explicativas. A análise de contraste foi usada para discriminar entre espécies de eucalipto e diluição dos compostos (CRAWLEY, 2013). Nesta análise de contraste (ortogonal), as espécies de eucalipto e as diluições dos compostos químicos (concentrações) foram ordenadas (do maior para o menor) e testados aos pares (com os valores mais próximos) e sequencialmente, agrupando aos valores não significativos e posteriormente testando com o próximo grupo em uma simplificação do modelo por etapas (CRAWLEY, 2013). Para análise de correlação, a normalidade dos dados foi avaliada com o teste de Kolmogorov-Smirnov, a homogeneidade da variância foi avaliada com o teste de Levene e os dados foram transformados em log quando necessário (ZAR, 2010). Todas as análises foram realizadas utilizando o programa estatístico R (R Development Core Team, 2011).

Para ordenar as espécies de *Eucalyptus* em diferentes diluições dos compostos (0, 10, 25, 50 e 100 ppm) nos diferentes compostos químicos (α -pineno, Globulol, Ledol, D-limonene, α -Gurjunene, 1,8-cineol (Eucalyptol), 1H-cycloprop_{e}_azuleno, decahidro-1,1,7-trimetil-4-metileno, α -terpinoacetato, Terpeneol, β pineno, o-Cymene, 2,5-Furandione, 3-dodecyl, Camphol, O-cymol e γ -terpineno) foi realizada uma análise de componentes principais (PCA) utilizando matriz de correlação de autovalores e autovetores. A significância dos eixos foi medida de acordo com o Broken-Stick (Legendre & Legendre 1998). Também comparou-se a estrutura de compostos químicos entre as variedades de *Eucalyptus* em diferentes diluições dos compostos usando uma Análise de Variância Multivariada Permutacional (PerMANOVA) com a matriz de distância Euclidiana e um teste de permutação (10 000) com pseudo-F e discriminando meses através da comparação de pares corrigida pelo método de Bonferroni (usando a função Adonis do pacote vegan em R; Oksanen et al. 2008). Para determinar quais compostos químicos foram mais característicos para as espécies de *Eucalyptus* em relação às diluições, foi realizada uma análise de espécie indicadora. Concentração e frequência de cada composto químico durante o estudo para

produzir valores indicadores (IV) para cada espécie em cada grupo (DUFRENE; LEGENDRE, 1997), que são testados para significância estatística usando uma técnica de Monte Carlo com 1000 permutações.

Uma árvore de regressão multivariada (MRT) foi realizada para determinar a influência dos parâmetros químicos na mortalidade dos Diptera (nível de significância de 0,05). Essa análise seleciona a variável explicativa que melhor particiona os dados em dois grupos homogêneos em relação aos valores da variável de resposta. Cada subgrupo é então particionado novamente, usando a variável explicativa que melhor reduz o erro dentro dos dois subgrupos de dados. A variável explicativa usada nesta segunda partição pode ser aquela usada na primeira divisão. Esse processo de particionamento é conhecido como crescimento da árvore e continua até que o número de observações em cada subgrupo seja considerado pequeno. Essas partições de dados minimizam a soma das distâncias de quadrados (SSD) entre todos os pares de sites nos nós e maximizam o SSD entre todos os pares de sites em diferentes nós (DE'ATH, 2002). Este método estatístico é útil para explorar, descrever e prever relações entre variáveis por agrupamento (DE'ATH, 2002), simplificando a análise de dados complexos que frequentemente incluem desequilíbrio, valores omissos, relações não lineares entre variáveis e interações de alta ordem, e esses agrupamentos permitem que os padrões sejam previstos usando apenas os dados variáveis disponíveis (DE'ATH, 2002). Neste método, os parâmetros químicos da árvore são caracterizados por uma estimativa do número médio de mortalidade de indivíduos, erro quadrático médio (MSE), número de observações na validação cruzada (N) e parâmetro de complexidade (CP). Os MRT foram realizados utilizando o pacote `mypart` (função `mypart()`) e todas as análises foram realizadas com o programa R (R Development Core Team).

3 RESULTADOS

3.1 Análise química dos óleos essenciais de eucalipto

Os rendimentos de óleos essenciais foliares a partir da hidrodestilação das variedades de *Eucalyptus* foram de, *E. dunnii* 0,95 %, Grancam 0,78 %, Urograndis 0,62 % , 0,33 % para *E. benthamii*, Urocam 0,3 % , *E. grandis* 0,21 % e *E. saligna* 0,2 %.

Foram identificados 54 compostos químicos em todos os óleos essenciais, dentre os principais, foram encontrados as classes de terpenos, como o α -pineno, camphol e y-

terpineno, alguns monoterpenos como o 1,8-cineol, D-limonene, (-)- β Pineno, o-Cymene, terpineol e sesquiterpenos como o globulol e ledol. Os principais compostos químicos identificados com a porcentagem relativa da área total no cromatograma dos óleos essenciais de sete espécies de *Eucalyptus* analisados por cromatografia gasosa acoplada a espectrofotometria de massa (GC-MS) estão apresentados na Tabela 1. Todos os óleos analisados apresentaram α -pineno e D-limonene. Dois óleos, tiveram o α -pineno como composto principal (*E. benthamii* 56,89 % e *E. grandis* 17,04 %), já os óleos de Grancam e *E. saligna*, apresentaram esse composto em quantidades de 24,49 % e 25,06 %, respectivamente. Os óleos das demais espécies tiveram como composto principal o 1,8-cineole (Eucalyptol), nas seguintes proporções: *E. dunii* 25,5 %, Urocam 70,33 %, Urograndis 26,4 %, Grancam 35,19 % e *E. saligna* 29,58 % (Tabela 1).

Tabela 1 - Principais compostos químicos identificados com a porcentagem relativa da área total no cromatograma dos óleos essenciais de sete espécies de *Eucalyptus* analisados por cromatografia gasosa acoplada a espectrofotometria de massa (GC-MS).

Comp.	<i>E. benthamii</i>	<i>E. dunnii</i>	<i>E. Grancam</i>	<i>E. grandis</i>	<i>E. saligna</i>	<i>E. Urocam</i>	<i>E. Urograndis</i>
1	56.89	8.57	24.49	17.04	25.06	5.03	10.24
2	10.36	6.13	-	-	3.62	-	3.64
3	2.96	0.54	-	-	-	-	-
4	2.38	3.33	12.12	2.16	4.66	7.95	2.91
5	-	-	1.07	-	-	-	15.43
6	-	25.52	35.19	6.9	29.58	70.33	26.4
7	-	24.62	-	-	-	-	-
8	-	7.7	-	-	-	-	-
9	-	6.72	-	-	-	9.99	7.48
10	-	3.24	7.42	8.61	9.98	4.53	4.84
11	-	0.63	3.67	-	-	-	-
12	-	-	-	15.61	3.78	-	-
13	-	-	-	4.93	-	-	-
14	-	-	2.6	-	5.61	-	1.64

15	-	-	1.07	-	-	-	15.43
16	-	-	-	-	-	-	6.63

1- α -pineno; 2 - Globulol; 3 - Ledol; 4 - D-limonene; 5 - α -Gurjunene; 6 -1,8-cineol (*Eucalyptol*); 7 - 3-1,4,6,9-Nonadecatetraeno; 8 -1H-cycloprop_{e} azuleno. decahidro_-1,1,7-trimetil-4-metileno; 9 - α -terpino acetato; 10 - Terpeneol; 11 -(-)- β pineno; 12 - o-Cymene; 13 - 2,5-Furandione._3-dodecyl; 14 - Camphol; 15 - O-_cymol; 16 - y-terpineno.

Fonte: Elaborado pela autora (2019).

A análise de espécie indicadora mostrou que o o.Cymene, ledol e α -pineno foram indicadores para *E. dunnii* em 100 ppm. Por outro lado, 2,5.furandione._3.dodecyl, 1Hcycloprop.azulene.decohydro, terpeneol, y.terpineno e α -gurjunene foram indicadores para *E. benthamii* em 100 ppm. Além disso, α terpino acetato e camphol foram indicadores para Grancam em 100 ppm. Globulol foi indicador para *E. grandis* em 100 ppm (Tabela 2). Apenas limoneno, 1,8-cineol e o-cymol não foram indicadores de espécies de eucalipto.

Tabela 2 - Valor de p. Índice de indicação e grupo correspondente a indicação da análise de compostos indicadores (%) nos óleos essenciais em 100 ppm.

Compostos químicos	Valor p	Valor indicador	Grupo de frequência
o.Cymene	0.001	0.81	<i>E. dunnii</i>
Ledol	0.001	0.85	<i>E. dunnii</i>
α -pineno	0.002	0.85	<i>E. dunnii</i>
2,5.Furandione._3.dodecyl	0.001	1	<i>E. benthamii</i>
1Hcycloprop.azulene.decohydro	0.002	1	<i>E. benthamii</i>
Terpeneol	0.002	1	<i>E. benthamii</i>
y.terpineno	0.001	1	<i>E. benthamii</i>
α Gurjunene	0.001	1	<i>E. benthamii</i>
α terpino acetato	0.04	0.41	Grancam
Camphol	0.009	0.57	Grancam
Globulol	0.035	0.44	<i>E. grandis</i>
α -pineno	0.048	0.39	Urograndis

Fonte: Elaborado pela autora (2019).

3.2 Atividade Larvicida

Os resultados demonstram que existe um efeito larvicida dos óleos essenciais de *Eucalyptus* testados sobre as larvas de *A. aegypti*. A mortalidade larval variou entre as espécies vegetais, com maior mortalidade em 100 ppm e 24 horas para *E. benthamii* (100

$\pm 0 \%$) e Urograndis ($100 \pm 0 \%$), seguidos por *E. grandis* ($98,33 \pm 2,89 \%$). Análises de contraste; $p < 0,001$; (Tabela 3). *E. dunni* ($10,00 \pm 5,00 \%$), Grancam ($13,33 \pm 7,64 \%$), *E. saligna* ($11,67 \pm 7,64 \%$) e Urocam ($21,67 \pm 5,77 \%$); (Tabela 3). Análises de contraste; $p < 0,001$; apresentam a menor mortalidade, e foram os mesmos entre si. A mortalidade também se alterou entre as diferentes concentrações de compostos químicos, com a maior mortalidade na concentração de 100 ppm e seguida por 50 ppm para *E. benthamii*, *E. grandis* e Urograndis (Tabela 4 A).

Tabela 3 - Mortalidade Larval de mosquito *Aedes aegypti* (%) e Desvio Padrão (%) no tempo de 24 horas nas diferentes concentrações.

	10 ppm	25 ppm	50 ppm	100 ppm
<i>E. benthamii</i>	0.00 \pm 0.00	6.67 \pm 11.55	91.67 \pm 14.43	100 \pm 0.00
Urograndis	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	96.67 \pm 5.77	100 \pm 0.00
<i>E. grandis</i>	0.00 \pm 0.00	1.67 \pm 2.89	78.33 \pm 5.77	98.33 \pm 2.89
Urocam	1.67 \pm 2.89	0.00 \pm 0.00	3.33 \pm 5.77	21.67 \pm 5.77
<i>E. saligna</i>	1.67 \pm 2.89	1.67 \pm 2.89	6.67 \pm 5.77	11.67 \pm 7.64
Grancam	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	13.33 \pm 7.64
<i>E. dunni</i>	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	10.00 \pm 5.00

Fonte: Elaborado pela autora (2019).

As concentrações de 25 e 10 ppm dos extratos obtidos das plantas *E. dunni*, Grancam, *E. saligna* e Urocam apresentaram as menores taxa de mortalidade larval, não apresentando diferença significativa entre si (Tabela 3). Os tratamentos de controle (acetona e água ultrapura) não tiveram efeito sobre a mortalidade larvas. Constatou-se ação larvicida a partir da concentração de 10 ppm em Urocam ($1,67 \pm 2,89 \%$) e *E. saligna* ($1,67 \pm 2,89 \%$).

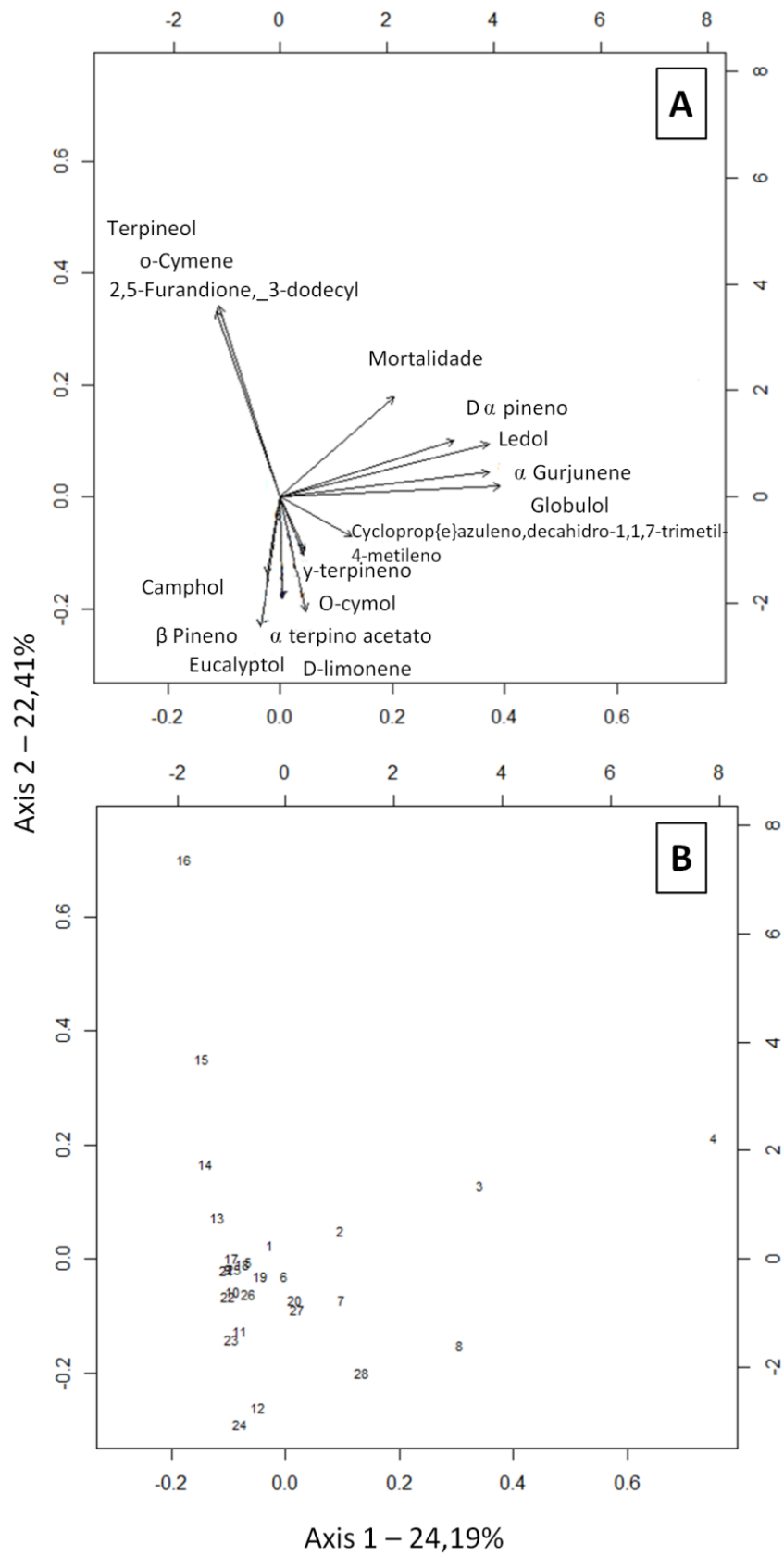
3.2.1 Relação da mortalidade larval com os compostos químicos dos óleos essenciais

A mortalidade de *A. aegypti* apresenta correlação positiva com alguns compostos químicos, como o terpineno, O-cymol, O-cymene, terpineol, 2,5-Furandiona, 3-dodecil, α -pineno, globulol e ledol (Figura 2, correlações de Person, $p < 0,05$). Os demais compostos químicos não apresentam correlação significativa com a mortalidade da larva do mosquito *A. aegypti*. Na Análise de Componentes Principais (PCA) dois primeiros

eixos juntos explicaram 46,6 % da variação dos compostos químicos. O primeiro eixo (24,19 % de variância) não diferiu quando comparado ao modelo Broken-Stick, diferentemente do segundo eixo (22,41 % de variância) que apresentou diferença (Figura 2) o que nos permite considerar apenas o segundo eixo da análise PCA para interpretação dos dados (Figura 2). Portanto, positivamente para o segundo eixo, e correlacionados com maiores valores de mortalidade, encontramos 2,5-Furandiona, 3-dodecil, o-cymene, terpineol, α -pineno, α -gurjuneno, globulol e ledol. Os demais compostos químicos foram negativos para o segundo eixo (Figura 2). A PerMANOVA revelou que compostos químicos diferiram entre as espécies de *Eucalyptus* e em diferentes diluições dos compostos (Tabela 4 B).

Figura 2 - Análise de Componentes Principais (PCA). A - Correlação dos compostos químicos com a mortalidade larval de *Aedes aegypti*. B - *Eucalyptus benthamii* (1 a 5). *Eucalyptus dunnii* (6 a 10).

Grancam (11 a 15). Eucalyptus grandis (16 a 20). Eucalyptus saligna



Fonte: Elaborado pela autora (2019).

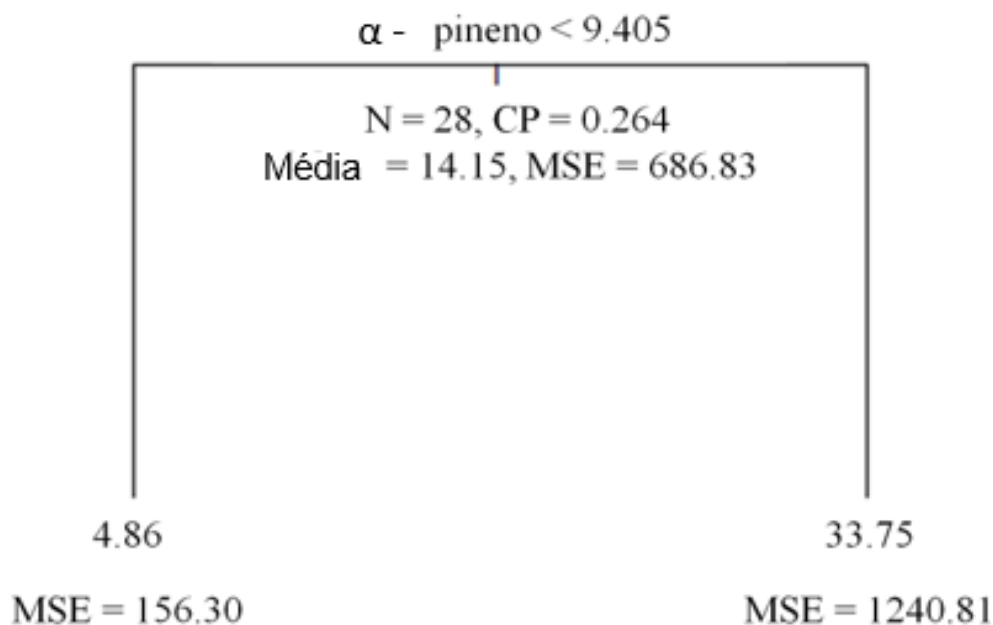
Tabela 4 - Valores de graus de liberdade (GL). Modelo F. significância (p) e análise de contraste (AC) no Modelo Linear Generalizado (GLM - A) entre espécie de planta. Concentração química e interação Planta:Concentração sobre a proporção de mortalidade larval.

	DF	Deviance %	F.Mod	delPr (> Chi)	Análise de Contraste (p < 0.05)
A. GLM Model:quasibinomial. link:logit					
Espécie	7	31.19		< 0.001	Outros < <i>E. grandis</i> = Urograndis < <i>E. benthamii</i>
Concentração química	3	10.24		< 0.001	Outros < 50ppm < 100ppm
Espécie:Concentração	18	9.51		0.073	
Resíduos	331	49.06			
B. PerMANOVA					
		Soma dos Sqs %		R2 Pr(>F)	Todos ≠
Espécie	6	53.44	8.2382	0.001	Todos ≠
Concentração química	3	27.10	8.354	0.001	

Fonte: Elaborado pela autora (2019).

O modelo de árvore de regressão indicou que a variabilidade na mortalidade de *A. aegypti* pode ser atribuída a α -pineno (Figura 3). O modelo prevê que a mortalidade pode ser tão alta quanto 33 % se α -pineno for maior que 9,405 ppm e tão baixa quanto 5 % se α -pineno for menor do que 9,405 ppm (previsão MSE = 686,83; cp = 0,26).

Figura 3 - Árvore de regressão. Indicação da relação de mortalidade de *Aedes aegypti* aos compostos químicos.



Fonte: Elaborado pela autora (2019).

4 DISCUSSÃO

Os dois principais compostos químicos identificados nos óleos essenciais de *Eucalyptus* foram o 1,8-cineole e α -pineno, esse resultado está de acordo outro estudo que obteve o 1,8-cineole e α -pineno como componentes principais de óleos essenciais dos *Eucalyptus*, *E. dunnii* (1,8-cineole 53,5 % e α -pineno 21,4 %), *E. saligna* (1,8-cineole em 45,2 % e α -pineno em 12,8 %) e *E. benthamii* (α -pineno 54 % e 1,8-cineole 9,9 %) (LUCIA *et al.*, 2008; MOSSI *et al.*, 2011). Em nosso estudo, esses compostos para as espécies acima citadas são de 1,8-cineole 25,5 % e α -pineno 8,57 % para *E. dunnii*, para o *E. saligna* de 1,8-cineole 25,06 % e α -pineno 29,58 %, e o *E. benthamii* com α -pineno 56,89 % e 1,8-cineole 25,52 %. O híbrido Urocam apresentou a porcentagem mais elevada de 1,8-cineole 70,33 % e o *E. benthamii* a maior concentração de α -pineno 56,89

% (Tabela 1). LUCIA *et al.* (2012a) em bioensaios larvicidas de alguns óleos essenciais de *Eucalyptus* contra *A. aegypti*, mostrou que o óleo essencial de *E. benthamii* var. *benthamii* exibiu um maior teor de α -pineno (73,15 %), enquanto o óleo essencial de *E. benthamii* var. *dorrigoensis* revelou 1,8-cineole (74,73 %) como o principal componente.

Todos os óleos essenciais testados apresentaram atividade larvicida na concentração 100 ppm, porém alguns produziram uma maior mortalidade larval (Tabela 3). Dados obtidos, e analisados via PerMANOVA, apontaram que todas as plantas são diferentes com relação a composição química de seus óleos essenciais (Tabela 3) e que esta diferença entre as espécies afeta a mortalidade larval. Embora os *Eucalyptus* sejam da mesma região, as diferenças na composição química podem estar relacionadas às condições do solo e do clima, estação, idade, estresse hídrico, local de coleta, nutrição e outros fatores abióticos (ISMAN, MURRAY; MACHIAL, 2006). As diferenças qualitativas e quantitativas reforçam a necessidade de estabelecer o perfil químico dos óleos essenciais antes de um ensaio biológico (LUCIA *et al.*, 2012).

A atividade pesticida dos óleos essenciais de eucalipto deve-se à componentes como citronela, citronelol, acetato de citronelilo, p-cimeno, eucamalol, limoneno, linalol, α -pineno, g-terpineno, α -terpineol, aloocimeno e aromadendeno (BATISH *et al.*, 2006; CIMANGA *et al.*, 2002; DUKE, 2016; LIU *et al.*, 2008; SU *et al.*, 2006; WATANABE *et al.*, 1993). Dentre os componentes citados, foram identificados em nosso estudo o limoneno, α -pineno e α -terpineol. O modelo de árvore de regressão indicou que a variabilidade na mortalidade de *A. aegypti* pode ser atribuída a presença do α -pineno em concentrações maiores que 9,4 ppm (Figura 3). O α -pineno é um importante componente de diferentes óleos essenciais utilizados na produção de inseticidas (Galeffi and Bettolo, 1988), apresenta atividade antimicrobiana frente a microrganismos patogênicos (LEITE *et al.*, 2007). Em bioensaios com larvas de *A. aegypti*, *Anopheles subpictus*, *Aedes albopictus* e *Culex tritaeniorhynchus* o α - pineno mostrou uma toxicidade maior quando isolado, comparado aos óleos essenciais de *E. grandis* e *Plectranthus* (GOVINDARAJAN *et al.*, 2016; LUCIA *et al.*, 2007). Assim é possível afirmar que o α -pineno é um dos princípios ativos responsável pela ação larvicida dos óleos essenciais analisados, contudo, sem deixar de levar em consideração o efeito sinérgico dos outros compostos químicos presentes nos óleos em menores concentrações. A sinergia ocorre quando uma mistura de dois compostos tem uma bioatividade maior que a soma dos componentes individuais (DAVIDSON; PARISH, 1989).

Lucia (2008) em experimentos relatou que os óleos das espécies *E. dunnii* e *E. saligna* tiveram baixas concentrações de 1,8-cineol e altas concentrações de p-cimeno, exibindo um alto efeito larvicida (LUCIA *et al.*, 2008). Esse resultado aponta que um aumento no conteúdo de 1,8-cineole reduz o efeito larvicida dos óleos essenciais em *A. aegypti*. Por outro lado, quanto mais p-cimeno presente no óleo de eucalipto, maior é a atividade larvicida do óleo denotada pela relação significativa ($p < 0,01$) entre mortalidade larval e a concentração de 1,8-cineole. Em nossos resultados, três dos óleos essenciais que tiveram menor valor de 1,8-cineole foram responsáveis pela maior mortalidade larval, sendo esses os óleos provenientes de *E. grandis* (6,9 %), *Urograndis* (26,4 %) e *E. benthamii* (0 %) (Tabela 1). Esse resultado é reforçado pela análise PCA que aponta o 1,8 cineol como um dos compostos que atua de forma contrária a mortalidade (Figura 1). Esta pode ser a explicação para mortalidade mais elevada apresentada pelos óleos de *E. grandis*, *Urograndis* e *E. benthamii*.

Na análise de PCA (Figura 1) alguns compostos foram correlacionados com os valores elevados de mortalidade, como o 2,5-Furandiona, 3-dodecil, o-cymene, terpineol, α -pineno, α -gurjuneno, globulol e ledol. Alguns desses compostos já apresentam atividade biológica descrita na literatura, como o globulol com atividade antifúngica e bacteriana (TAN *et al.*, 2008), o Ledol com atividade antimicrobiana e anti-inflamatória (KUMAR; KUMARAVEL; LALITHA, 2010), O-cymene com atividade antifúngica (MMBENGWA *et al.*, 2009) e α -pineno com atividades antimicrobiana e inseticida (GOVINDARAJAN *et al.*, 2016; LEITE *et al.*, 2007; LUCIA *et al.*, 2007).

Segundo nossos resultados, óleos essenciais de *Eucalyptus* podem ser considerados um importante larvicida alternativo para o controle de larvas de *A. aegypti*. Sabendo que o plantio de eucalipto ocupa 5,7 milhões de hectares da área de árvores plantadas do país e tem se expandido muito nos últimos anos na região oeste do estado de Santa Catarina (IBÁ, 2017), essa cobertura vegetal proporciona que este recurso seja estudado, pois o eucalipto tem muito potencial na indústria farmacêutica, na medicina e no uso contra mosquitos vetores de doenças.

5 CONCLUSÃO

Os óleos essenciais de *Eucalyptus* apresentaram efeito larvicida sobre as larvas de *A. aegypti*. Os resultados do bioensaio apontaram que as espécies *E. benthamii* e *E. grandis* e o híbrido *Urograndis* tiveram maior atividade larvicida. Nas análises

estatísticas, o α -pineno foi composto químico indicador para a alta mortalidade de larvas de *A. aegypti*. Estes resultados abrem a perspectiva a respeito do potencial das plantas como fonte de componentes químicos com atividade larvicida, e, portanto, uma fonte promissora de agentes para o controle de mosquitos vetores de doenças, podendo ser uma alternativa para a substituição de pesticidas sintéticos por produtos naturais nos programas de controle do mosquito *A. aegypti*. Dessa forma, nossos resultados podem ser úteis para a produção de larvicidas naturais, fazendo-se necessários estudos sobre a viabilidade de uso dos óleos testados no presente estudo.

6 REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, Isabella Gomes Cavalcanti De *et al.* Chikungunya virus infection: report of the first case diagnosed in Rio de Janeiro, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 45, n. 1, p. 128–129, fev. 2012.

AMER, Abdelkrim; MEHLHORN, Heinz. Larvicidal effects of various essential oils against *Aedes*, *Anopheles*, and *Culex* larvae (Diptera, Culicidae). *Parasitology Research*, v. 99, n. 4, p. 466–472, set. 2006a.

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

ATTIA, Sabrine *et al.* A review of the major biological approaches to control the worldwide pest *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) with special reference to natural pesticides. *Journal of Pest Science*, 2013. Disponível em: <<https://dial.uclouvain.be/pr/boreal/object/boreal:132169>>. Acesso em: 24 nov. 2018.

BATISH, Daizy R. *et al.* Chemical composition and phytotoxicity of volatile essential oil from intact and fallen leaves of *Eucalyptus citriodora*. *Zeitschrift Fur Naturforschung. C, Journal of Biosciences*, v. 61, n. 7–8, p. 465–471, ago. 2006.

BATISH, Daizy R. *et al.* *Eucalyptus* essential oil as a natural pesticide. *Forest ecology and management*, 2008. Disponível em: <<http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201301562017>>. Acesso em: 25 nov. 2018.

BENELLI, Giovanni. Research in mosquito control: current challenges for a brighter future. *Parasitology Research*, v. 114, n. 8, p. 2801–2805, 1 ago. 2015.

BENELLI, Giovanni *et al.* Toxicity of some essential oil formulations against the Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera Tephritidae). *Crop Protection*, v. 42, p. 223–229, 1 dez. 2012.

CARVALHO, Danilo O. *et al.* Suppression of a Field Population of *Aedes aegypti* in Brazil by Sustained Release of Transgenic Male Mosquitoes. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 9, n. 7, p. e0003864, 2 jul. 2015.

CHENG, Sen-Sung *et al.* Bioactivity of selected plant essential oils against the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* larvae. *Bioresource Technology*, v. 89, n. 1, p. 99–102, ago. 2003.

CHENG, Sen-Sung *et al.* Chemical compositions and larvicidal activities of leaf essential oils from two eucalyptus species. *Bioresource Technology*, v. 100, n. 1, p. 452–456, 1 jan. 2009.

CIMANGA, K. *et al.* Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 79, n. 2, p. 213–220, fev. 2002.

CRAWLEY, Michael J. *The R book*. Second edition ed. Chichester, West Sussex, United Kingdom: Wiley, 2013.

DAVIDSON, P. M.; PARISH, M. E. Methods for testing the efficacy of food antimicrobials. *Food technology (USA)*, 1989. Disponível em: <<http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US8900155>>. Acesso em: 25 nov. 2018.

DE'ATH, Glenn. Multivariate regression trees: a new technique for modeling species–environment relationships. *Ecology*, v. 83, n. 4, p. 1105–1117, 1 abr. 2002.

DINESH, Devakumar *et al.* Mosquitocidal and antibacterial activity of green-synthesized silver nanoparticles from *Aloe vera* extracts: towards an effective tool against the malaria vector *Anopheles stephensi*? *Parasitology Research*, v. 114, n. 4, p. 1519–1529, abr. 2015.

DUBEY, N. K. *Natural Products in Plant Pest Management*. CABI, 2011.

DUFRENE, Marc; LEGENDRE, Pierre. Species Assemblages and Indicator Species: the Need for a Flexible Asymmetrical Approach. *Ecological Monographs*, v. 67, n. 3, p. 345–366, 1 ago. 1997.

DUKE, James A. *Dr. Duke's Phytochemical and Ethnobotanical Databases*. Ag Data Commons. Disponível em: <<https://data.nal.usda.gov/dataset/dr-dukes-phytochemical-and-ethnobotanical-databases>>. Acesso em: 25 nov. 2018. , 2016

DUTRA, Heverton Leandro Carneiro *et al.* Wolbachia Blocks Currently Circulating Zika Virus Isolates in Brazilian *Aedes aegypti* Mosquitoes. *Cell Host & Microbe*, v. 19, n. 6, p. 771–774, jun. 2016.

EBADOLLAHI, Asgar. Essential Oils Isolated from Myrtaceae Family as Natural Insecticides. *Annual Review & Research in Biology*, v. 3, 4 mar. 2013.

FAHN, A. Structure and function of secretory cells. *Advances in Botanical Research*. Academic Press, 2000. v. 31. p. 37–75. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065229600310060>>. Acesso em: 7 jun. 2019.

FUCHS, Silke; NOLAN, Tony; CRISANTI, Andrea. Mosquito Transgenic Technologies to Reduce Plasmodium Transmission. In: MÉNARD, ROBERT (Org.). *Malaria*. Totowa, NJ: Humana Press, 2012. v. 923. p. 601–622. Disponível em:

<http://link.springer.com/10.1007/978-1-62703-026-7_41>. Acesso em: 30 nov. 2018.

GHOSH, Anupam; CHOWDHURY, Nandita; CHANDRA, Goutam. Plant extracts as potential mosquito larvicides. *The Indian Journal of Medical Research*, v. 135, n. 5, p. 581–598, maio 2012.

GOINDIN, Daniella *et al.* Levels of insecticide resistance to deltamethrin, malathion, and temephos, and associated mechanisms in *Aedes aegypti* mosquitoes from the Guadeloupe and Saint Martin islands (French West Indies). *Infectious Diseases of Poverty*, v. 6, 10 fev. 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5303256/>>. Acesso em: 23 nov. 2018.

GOVINDARAJAN, Marimuthu *et al.* Eugenol, α -pinene and β -caryophyllene from *Plectranthus barbatus* essential oil as eco-friendly larvicides against malaria, dengue and Japanese encephalitis mosquito vectors. *Parasitology Research*, v. 115, p. 807–815, 2015.

GOVINDARAJAN, Marimuthu *et al.* Novel synthesis of silver nanoparticles using *Bauhinia variegata*: a recent eco-friendly approach for mosquito control. *Parasitology Research*, v. 115, n. 2, p. 723–733, fev. 2016.

GRATTAPAGLIA, Dario *et al.* Progress in Myrtaceae genetics and genomics: *Eucalyptus* as the pivotal genus. *Tree Genetics & Genomes*, v. 8, n. 3, p. 463–508, 1 jun. 2012.

HALDAR, Koyel Mallick; HALDAR, Basudeb; CHANDRA, Goutam. Fabrication, characterization and mosquito larvicidal bioassay of silver nanoparticles synthesized from aqueous fruit extract of putranjiva, *Drypetes roxburghii* (Wall.). *Parasitology Research*, v. 112, n. 4, p. 1451–1459, 1 abr. 2013.

HYLDGAARD, Morten; MYGIND, Tina; MEYER, Rikke Louise. Essential Oils in Food Preservation: Mode of Action, Synergies, and Interactions with Food Matrix Components. *Frontiers in Microbiology*, v. 3, 2012. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2012.00012/abstract>>. Acesso em: 24 nov. 2018.

ISMAN, Murray B. Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Protection*, v. 19, n. 8–10, p. 603–608, set. 2000.

ISMAN, Murray; MACHIAL, C.M. Pesticides based on plant essential oils: From traditional practice to commercialization. *Naturally Occurring Bioactive Compounds*, v. 3, p. 29–44, 1 jan. 2006.

KOUL, Opendar. Phytochemicals and Insect Control: An Antifeedant Approach. *Critical Reviews in Plant Sciences*, v. 27, n. 1, p. 1–24, 20 maio 2008.

KOUL, Opendar; WALIA, Suresh; DHALIWAL, G.S. Essential Oils as Green Pesticides: Potential and Constraints. v. 4, n. 1, p. 22, 2008.

KUMAR, P. Praveen; KUMARAVEL, S.; LALITHA, C. Screening of antioxidant activity, total phenolics and GC-MS study of *Vitex negundo*. *African Journal of Biochemistry Research*, v. 4, n. 7, p. 191–195, 31 jul. 2010.

LAZEAR, Helen M.; DIAMOND, Michael S. Zika Virus: New Clinical Syndromes and Its Emergence in the Western Hemisphere. *Journal of Virology*, v. 90, n. 10, p. 4864–4875, 15 2016.

LEES, Rosemary Susan *et al.* Review: Improving our knowledge of male mosquito biology in relation to genetic control programmes. *Acta Tropica*, v. 132, p. S2–S11, abr. 2014.

LEITE, Aristides Medeiros *et al.* Efeito inibitório de eugenol, beta-pineno e alfa-pineno sobre o crescimento de bactérias Gram-positivas potencialmente causadoras de endocardite infecciosa. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 43, n. 1, p. 121–126, 1 mar. 2007.

LIU, Xiaoxiang *et al.* Allelopathic effects of essential oil from *Eucalyptus grandis* × *E. urophylla* on pathogenic fungi and pest insects. *Frontiers of Forestry in China*, v. 3, n. 2, p. 232–236, 1 jun. 2008.

LUCIA, Alejandro *et al.* Larvicidal effect of *Eucalyptus grandis* essential oil and turpentine and their major components on *Aedes aegypti* larvae. *Journal of the American Mosquito Control Association*, v. 23, n. 3, p. 299–303, set. 2007.

LUCIA, Alejandro *et al.* Validation of models to estimate the fumigant and larvicidal activity of *Eucalyptus* essential oils against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research*, v. 110, n. 5, p. 1675–1686, maio 2012.

LUCIA, Alejandro *et al.* Yield, chemical composition, and bioactivity of essential oils from 12 species of *Eucalyptus* on *Aedes aegypti* larvae. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, v. 129, n. 1, p. 107–114, 1 out. 2008.

MMBENGWA, Victor *et al.* Biological activity and phytoconstituents of essential oil from fresh leaves of *Eriosema englerianum*. *African Journal of Biotechnology*, v. 8, p. 361–364, 4 fev. 2009.

MOSSI, Altemir J. *et al.* Insecticidal and repellency activity of essential oil of *Eucalyptus* sp. against *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera, Curculionidae). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 91, n. 2, p. 273–277, 30 jan. 2011.

MUTURI, Ephantus J. *et al.* Larval environmental stress alters *Aedes aegypti* competence for Sindbis virus. *Tropical medicine & international health: TM & IH*, v. 16, n. 8, p. 955–964, ago. 2011.

PAVELA, Roman. Essential oils for the development of eco-friendly mosquito larvicides: A review. *Industrial Crops and Products*, v. 76, p. 174–187, 15 dez. 2015.

PAVELA, Roman. Insecticidal properties of phenols on *Culex quinquefasciatus* Say and *Musca domestica* L. *Parasitology Research*, v. 109, n. 6, p. 1547–1553, dez. 2011.

RENCORET, Jorge; GUTIÉRREZ, Ana; DEL RÍO, José C. Lipid and lignin composition of woods from different eucalypt species. *Holzforschung*, v. 61, n. 2, 1 jan. 2007. Disponível em: <<https://www.degruyter.com/view/j/hfsg.2007.61.issue-2/hf.2007.030/hf.2007.030.xml>>. Acesso em: 25 nov. 2018.

SRITABUTRA, Duangkamon *et al.* Evaluation of herbal essential oil as repellents against *Aedes aegypti* (L.) and *Anopheles dirus* Peyton & Harrion. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, v. 1, n. 1, Supplement, p. S124–S128, 1 set. 2011.

SU, Yu-Chang *et al.* Antifungal Activities and Chemical Compositions of Essential Oils from Leaves of Four *Eucalypts*. p. 13, 2006.

TAN, Manliang *et al.* Antimicrobial activity of globulol isolated from the fruits of *Eucalyptus globulus* Labill. *Natural Product Research*, v. 22, n. 7, p. 569–575, 10 maio 2008.

THOMÉ, Roberto C. A.; YANG, Hyun Mo; ESTEVA, Lourdes. Optimal control of *Aedes aegypti* mosquitoes by the sterile insect technique and insecticide. *Mathematical Biosciences*, v. 223, n. 1, p. 12–23, 1 jan. 2010.

WATANABE, Keisuke. *et al.* New mosquito repellent from *Eucalyptus camaldulensis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 41, n. 11, p. 2164–2166, 1 nov. 1993.

ZAR, Jerrold H. *Biostatistical Analysis*. Prentice Hall, 2010.

CAPÍTULO II

AVALIAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Eucalyptus benthamii* SOBRE O DESENVOLVIMENTO DO MOSQUITO *Aedes aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE)

Carine Gallon¹; Rafael H. Martello¹; Gilberto Cozzer²; Gabriel de Carvalho³; Jacir Dal Magro¹; Daniel Albeny-Simões¹

¹*Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais, Universidade Comunitária da Região de Chapecó, 3321-8045, Chapecó-SC, Brasil.*

²*Curso de Ciências Biológicas, Universidade Comunitária da Região de Chapecó, 3321-8045, Chapecó-SC, Brasil.*

³*Universidade Comunitária da Região de Chapecó, 3321-8045, Chapecó-SC, Brasil.*

ABSTRACT

The control attempts of *Aedes aegypti* vector occur in its majority with adult mosquitoes, however is known that the experienced conditions of the larval phase can be a key factor to predict the adult quality, affecting even the vector capacity. When a external mortality source, as an natural insecticide, is added to the system, it is assumed intuitively that the population will decrease in size, however, this mortality source can contribute to the effect of supercompensation, in which the mortality rises the equilibrium and population size. This study evaluates who the effects of density promoted by the insecticide activity of *Eucalyptus benthamii* essential oil interfere in larval development and production of adult mosquitoes. *A. aegypti* larvae was exposed to sublethal treatments (LC90 and LC50) with essential oil of *E. benthamii* and a control group with six repetitions. The results show that the number of insects that reach the adulthood and the time of larval development were not affected by the treatments, therefore discarding the supercompensation effect. In LC90 treatment males and females have changed, with bigger sizes and adult longevity

in comparison control groups. It is expected that natural larvicides reduces the number of emerging adults, however the survivors, according to the results obtained, will have advances in body size and adult life time, what indicates that bigger females would have better vectorial competency and fertility.

Key words: *Aedes aegypti*; Supercompensation; Larval density; *Eucalyptus*.

1 INTRODUÇÃO

O *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) (Linnaeus, 1762), é considerado um dos mais importantes vetores de arbovírus que afetam a saúde humana, incluindo febre amarela, febre chikungunya e dengue (ALTO; LORD, 2016). Neste cenário, o controle de mosquitos vetores é uma das melhores linhas de defesa, pois diminui o contato entre mosquitos e humanos interrompendo o ciclo de transmissão de doenças (LEES *et al.*, 2015). O controle de vetores tem sido gerenciado nas últimas décadas principalmente com inseticidas químicos sintéticos (CANDIDO *et al.*, 2013). No entanto, o uso intenso destes compostos químicos apresentam efeitos negativos na saúde humana, no ambiente e selecionam genes que causam resistência de várias espécies de vetores às drogas de origem sintética (GOINDIN *et al.*, 2017).

Um intenso esforço tem sido realizado na busca de ferramentas alternativas que possam ser utilizadas para o controle de vetores. Dentre esses esforços podemos destacar a crescente investigação sobre a eficácia de compostos de origem vegetal contra espécies de mosquitos pertencentes à família Culicidae (BAKKALI *et al.*, 2008; CHELLAPPANDIAN *et al.*, 2018; PAVELA, 2015). Muitos compostos já foram relatados como sendo eficientes contra o mosquito *A. aegypti*, exibindo diversos modos de ação, causando mortalidade em ovos, larvas, pupas e mosquitos adultos, inibindo a oviposição, crescimento, reprodução e repelindo adultos (AMER; MEHLHORN, 2006; BENELLI *et al.*, 2014; CANDIDO *et al.*, 2013; LALTHAZUALI; MATHEW, 2017; LUCIA *et al.*, 2012).

Os óleos essenciais são resultado do metabolismo secundário em plantas, sendo produzidos como um mecanismo de defesa das plantas contra seus inimigos naturais (PAVELA, 2015). Apresentam uma rápida degradação, o que diminui o risco de resíduos no ambiente, podem ser mais específicos contra o organismo alvo e menos agressivos com organismos não alvos (EBADOLLAHI, 2013). Os óleos essenciais, também selecionam genes resistentes mais lentamente em comparação com inseticidas sintéticos

(EBADOLLAHI, 2013), isso se deve as misturas de compostos biossinteticamente diferentes presentes nos extratos vegetais que podem retardar a evolução da resistência (ISMAN, 2000; RATTAN, 2010). O eucalipto pertencente a ordem Myrtales e família Myrtaceae (EBADOLLAHI, 2013), possui uma ampla atividade contra fungos, bactérias, insetos, ácaros e ervas daninhas, sendo assim um produto simples e alternativo ao controle de pragas (MOSSI *et al.*, 2011).

A maioria das investigações sobre as interações entre parasitas e vetores (hospedeiro) se concentraram nas condições experimentadas pelo indivíduo vetor na sua fase adulta (MUTURI *et al.*, 2011). No entanto, sabe-se que as condições experimentadas pelo inseto vetor no seu estágio larval (imaturos) pode ser um fator chave para prever a qualidade do adulto produzido e, portanto, afetar sua capacidade vetorial (MUTURI *et al.*, 2011). A competição dependente da densidade na fase larval pode causar alterações nas características de mosquitos adultos, principalmente o alterações no comportamento alimentar, fertilidade, longevidade e conseqüentemente na sua competência vetorial, que seria a capacidade do inseto de replicar e transmitir determinado patógeno (ALTO; LORD, 2016). Neste contexto, quando uma fonte de mortalidade externa, como por exemplo um inseticida natural, é adicionada ao sistema assumimos intuitivamente que a população diminuirá de tamanho, dada a mortalidade causada pelo estressor (ALTO; LORD, 2016). Contudo, o que ocorre na realidade pode ser diferente do esperado (JULIANO, 2007; YAKOB; ALPHEY; BONSALE, 2008). Contra intuitivamente, o que ocorre é o aparecimento de um fenômeno chamado de “efeito Hydra” (ABRAMS; MATSUDA, 2005), em que a mortalidade causada pela fonte estressora no sistema leva à uma produção de adultos no sistema que é maior (sobrecompensação) ou igual (compensação) a produção que aconteceria se o estressor não tivesse sido introduzido no sistema (ZIPKIN *et al.*, 2009). Em outras palavras, o efeito de estressores no sistema leva à manutenção ou à superprodução de adultos quando comparado a um ambiente onde nenhuma estratégia de controle foi adotada, o que leva a um aumento na aptidão individual dos sobreviventes devido a mudanças na densidade populacional (ABRAMS, 2009).

Dependência da densidade em criadouros de larvas de mosquitos é um evento determinante do tamanho populacional. Logo, qualquer tentativa de usar agentes de controle que causarão mortalidade larval parcial deveria elucidar, a priori, os efeitos compensatórios ou sobrecompensatórios oriundos da mortalidade excessiva ou aditiva

(JULIANO, 2007). Medidas de controle destinadas a reduzir a população larval, mas que não se preocupam em elucidar os efeitos supracitados, podem ter resultados contra intuitivos, principalmente no que tange o número e características dos adultos produzidos (ALTO; LORD, 2016). Para que possamos avaliar as consequências finais das mudanças nas densidades de larvas de mosquitos e como essas mudanças afetam a história de vida dos mosquitos adultos precisamos entender os efeitos dependentes da densidade (ALTO; LORD, 2016). Diante do exposto, nosso estudo avaliou como efeitos da densidade promovidos pela atividade inseticida do óleo essencial de *Eucalyptus benthamii* interfere no desenvolvimento larval e na produção de mosquitos adultos da espécie *A. aegypti*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Mosquitos

As larvas de mosquitos *A. aegypti* utilizadas nos experimentos foram oriundas de uma colônia existente no Laboratório de Entomologia Ecológica (LABENT-Eco), situado no campus da Universidade Comunitária da Região de Chapecó (UNOCHAPECÓ). Os *A. aegypti* foram mantidos a uma temperatura de $27^{\circ}\text{C} \pm 3$, fotoperíodo claro escuro 12:12 h. Ovos provenientes da colônia foram eclodidos em recipientes plásticos 20 x 30 cm contendo 1 L de água e 0,15 g de ração para peixes TetraFin®, em uma densidade de 500 larvas/L.

2.2 Testes de toxicidade sobre larvas de *A. aegypti*

Para os testes de desenvolvimento larval frente ao óleo essencial foi utilizado o óleo da planta *Eucalyptus benthamii*. que em nossos testes anteriores apresentou maior potencial contra larvas de *A. aegypti*. Os microcosmos experimentais foram recipientes de plástico com capacidade de 80mL, o óleo foi diluído com acetona (0,40 %) (LUCIA *et al.*, 2007) nas concentrações: 0, 7,5; 10; 12 e 25 ppm. A diluição foi misturada a água ultrapura, totalizando 50 ml de solução. Foram acondicionadas 20 larvas de primeiro instar por unidade experimental, separadas com o auxílio da pipeta de Pasteur. Como controle utilizou-se 50 ml de água ultrapura misturado a 200 µL de acetona (40 %) . Nenhum alimento adicional foi adicionado durante os experimentos. Os recipientes experimentais foram mantidos sob a mesma temperatura e fotoperíodo citados no tópico 2.1.

As observações e contagem do número de larvas mortas foram realizadas nos intervalos de 1, 2, 4 e 24h, sendo consideradas mortas aquelas larvas que não apresentaram movimentos ou não respondiam aos estímulos com a pipeta de Pasteur. Os bioensaios foram embasados no protocolo da Organização Mundial de Saúde (WHO, 2005). A partir desses resultados foi calculada a curva de mortalidade de larvas de *A. aegypti* e obtida as concentrações letais para 50% (LC 50) e 90% (LC 90), respectivamente. Os testes de efeitos do óleo essencial sobre o desenvolvimento larval e tamanho do mosquito adulto *A. aegypti* foram realizados com os valores encontrados para LC50 e LC90, 8,5 e 18,5ppm, respectivamente. Com isso esperávamos causar um estresse intermediário (LC50) e alto (LC90) na população larval de *A. aegypti* (GOVINDARAJAN *et al.*, 2016).

2.3 Desenho experimental

Nossos microcosmos experimentais foram constituídos de recipientes de vidro, do tipo bécker, com capacidade para 500 mL, onde adicionamos 375 mL de água ultrapura e 0,1 g de ração para peixe TetraFin®. O óleo essencial foi aplicado em cada recipiente nas concentrações de 0 (controle), 8,5 ppm (LC 50) e 18,5 ppm (LC 90), sendo que esses foram diluídos com acetona (0,40 %). Após a diluição, 150 larvas de primeiro ínstar (recém-eclodidas) foram adicionadas aos recipientes experimentais. Os tratamentos foram replicados seis vezes. Os recipientes experimentais foram mantidos tampados com uma tela, a uma temperatura de 25 ± 3 e o fotoperíodo claro escuro 12:12h. Os recipientes experimentais foram examinados diariamente, sendo as larvas mortas contabilizadas e retiradas do microcosmo e as pupas transferidas para frascos para emergência dos adultos.

2.4 Manutenção dos adultos produzidos

Adultos recém-eclodidos foram registrados por data e, em seguida, transferidos para gaiolas cilíndricas (3000 cm³), sendo utilizada uma gaiola para cada microcosmo experimental em cada dia de eclosão. Os adultos não foram alimentados durante o experimento e foram monitorados diariamente, até a data da morte. Os adultos que morreram foram separados em machos e fêmeas e mantidos em eppendorf a uma temperatura de $27 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3$, fotoperíodo claro escuro 12:12 h, para aferir o tamanho dos adultos, suas asas foram medidas, desde a incisão axilar à ponta da asa. Com auxílio de

um microscópio (Digital Microscope User) foram tiradas fotos que foram medidas utilizando o software Meter Size (version 1.1). Usamos todos os mosquitos adultos que emergiram das pupas produzidas no experimento para medir a sobrevivência larval até a idade adulta, tempo necessário para o desenvolvimento dos imaturos, tamanho e longevidade (em dias) dos adultos produzidos em cada um dos tratamentos experimentais (ALTO; LORD, 2016).

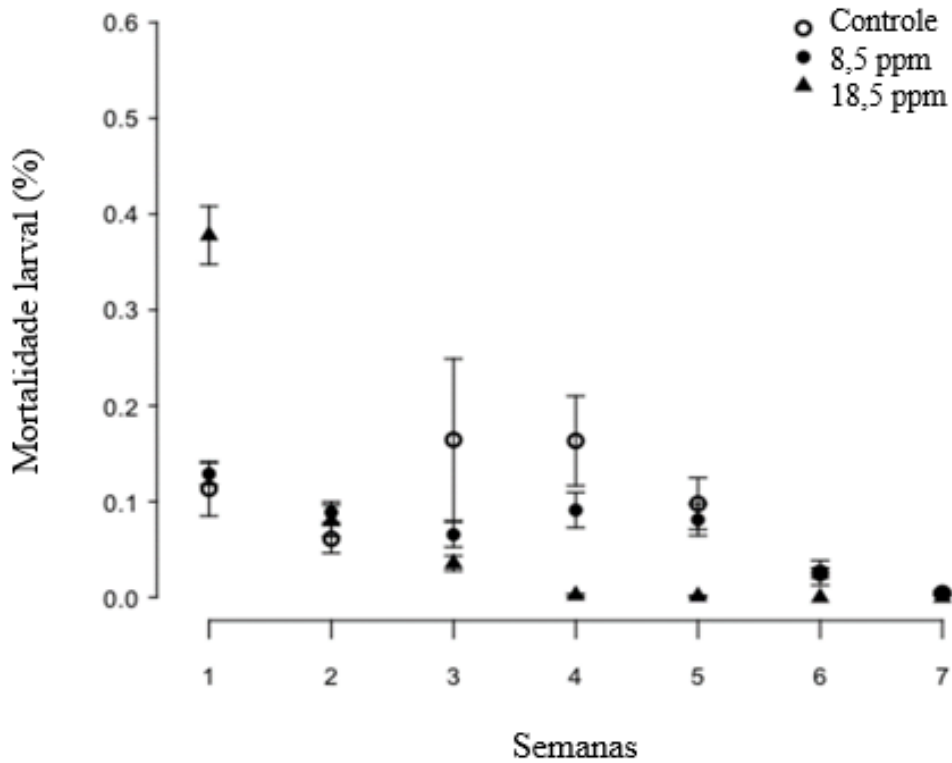
2.5 Análises Estatísticas

Para verificar os efeitos das diferentes concentrações (0, 8,5 e 18,5 ppm) de óleo essencial de eucalipto sobre a proporção de larvas que alcançaram a idade adulta, pupas produzidas, tempo de desenvolvimento em dias e tamanho da asa em machos e fêmeas foram realizadas ANOVAs utilizando-se modelos lineares generalizados. Para avaliar o efeito das diferentes concentrações (0, 8,5 e 18,5 ppm) sobre a longevidade dos adultos realizamos ANOVAS separadas para cada um dos pares de concentrações. Os dados foram checados para normalidade através do teste de Shappiro-Wilk. Dados não normais tiveram suas dispersões corrigidas para a família adequada. Para verificar o efeito do tempo (em semanas) e dos das diferentes concentrações, além da interação semana:tratamento, sobre a mortalidade larval realizamos uma ANOVA de medidas repetidas.

4 RESULTADOS

O teste do efeito do óleo essencial de *E. benthamii* sobre desenvolvimento larval do mosquito *A. aegypti* teve duração máxima de sete semanas. Identificamos um efeito significativo das semanas ($F_{1,6} = 20,49$; $p < 0,001$) e interação semana:tratamento ($F_{2,12} = 9,10$; $p < 0,001$), mas não do tratamento ($F_{1,2} = 1,44$; $p = 0,24$) sobre a mortalidade larval. A mortalidade mais elevada foi promovida pela concentração de 18,5 ppm, aproximadamente 40% na primeira semana, seguida de uma queda abrupta nas semanas subsequentes. Entretanto a concentração de 8,5 ppm apresentou leves oscilações na mortalidade mantendo-se abaixo de 20% até a quinta semana experimental. Já o grupo controle apresentou as mortalidades mais elevadas durante a terceira e quarta semana (Figura 4).

Figura 4 - Proporções de mortalidade média de larvas de *A. aegypti* ao longo de um período de sete semanas de exposição ao óleo essencial *E. benthamii* nas concentrações de 18,5 ppm (triângulo fechado), 8,5 ppm (círculo fechado) e controle (círculo aberto).

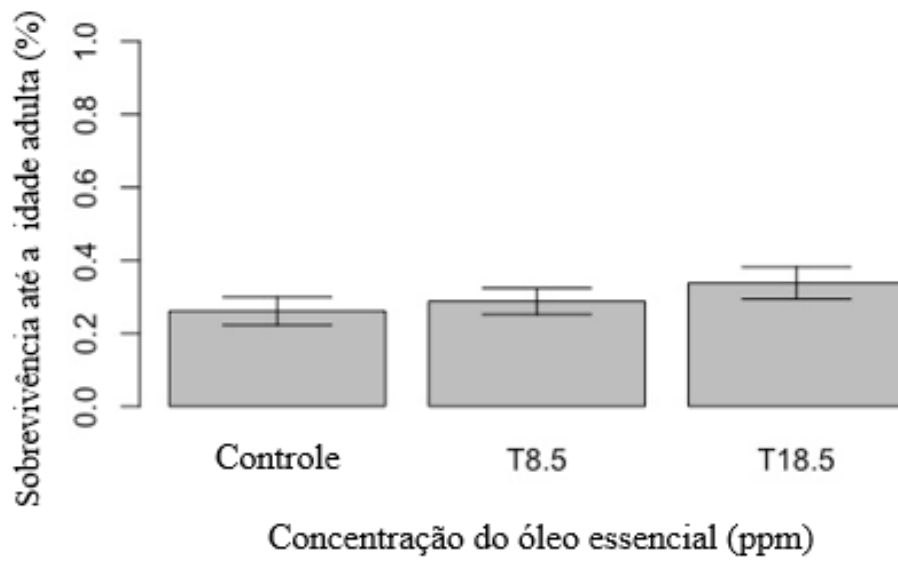


Fonte: Elaborado pela autora (2019).

O número de indivíduos que chegaram a fase adulta ($F_{1,17} = 0,96$, $p = 0,405$; Figura 5) e o tempo de desenvolvimento larval em dias ($F_{1,17} = 2,94$, $p=0,083$) não foram afetadas pelos tratamentos. Já a longevidade do adulto em dias, foi significativamente maior na concentração de 18,5 ppm quando comparada ao controle ($F_{1,11} = 18,18$; $p = 0,0006$; Figura 6). Contudo, a concentração de 8,5 ppm não diferiu significativamente do controle ($F_{1,11} = 1,61$; $p = 0,23$) e nem da concentração de 18,5 ppm ($F_{1,11} = 0,7$; $p = 0,41$; Figura 6).

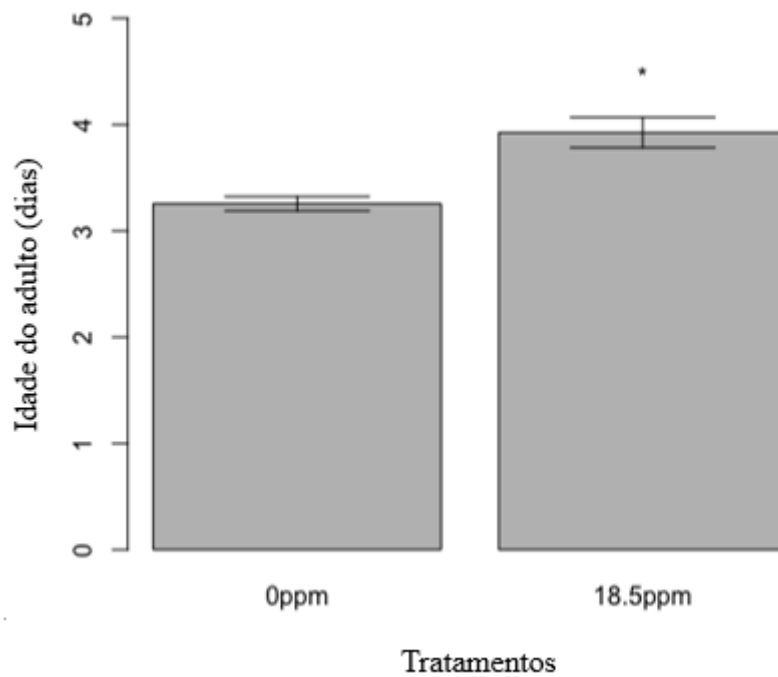
Figura 5 - Proporção média de larvas que sobreviveram até a idade adulta em cada uma das concentrações, 0 (controle); 8,5 ppm (CL50) e 18,5 ppm (CL90) do óleo essencial *E. benthamii*, após

todo o período de desenvolvimento larval.



Fonte: Elaborado pela autora (2019).

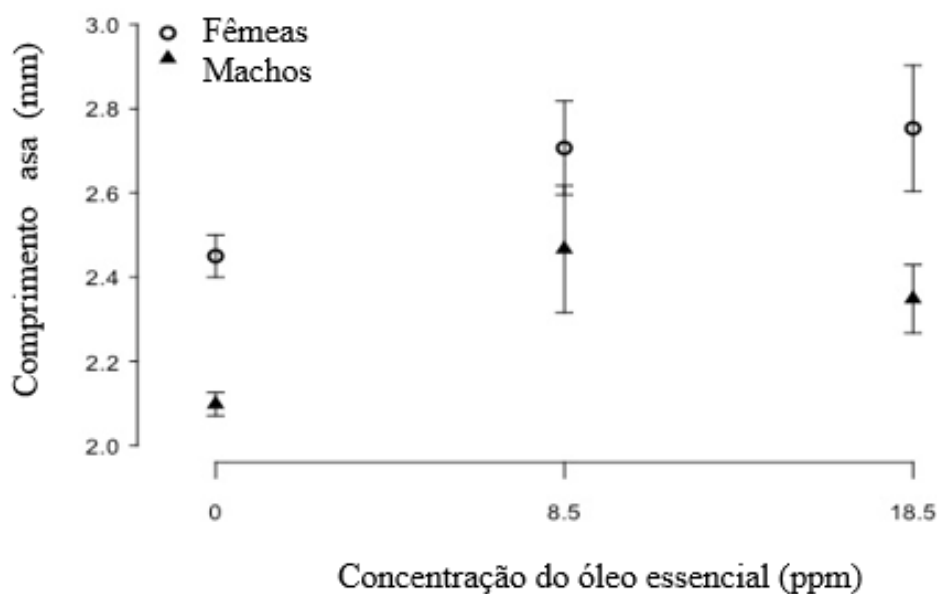
Figura 6 - Comparação entre a longevidade média de adultos (dias) do mosquito *A. aegypti* quando submetidas a uma concentração do óleo essencial *E. benthamii* de 18,5 ppm comparada ao controle (0 ppm).



Fonte: Elaborado pela autora (2019).

Houve um efeito significativo do óleo essencial sobre o tamanho das asas dos adultos ($F_{1,35} = 5.51$, $p = 0.009$), no qual as fêmeas tiveram asas maiores que os machos ($F_{1,35} = 15.4005$, $p < 0.001$), contudo ambos apresentaram tamanho de asa maior na concentração de 18,5ppm (Figura 7).

Figura 7 - Tamanho médio das asas de indivíduos adultos, machos (triângulos fechados) e fêmeas (círculos abertos), do mosquito *A. aegypti* em cada uma das concentrações (0, 8,5 e 18,5 ppm) do óleo essencial *E. benthamii*.



Fonte: Elaborado pela autora (2019).

5 DISCUSSÃO

O uso de óleo essencial de *E. benthamii* em concentrações subletais não afetou de forma significativa a sobrevivência até a idade adulta do mosquito *A. aegypti*, não ocorrendo assim o efeito esperado, efeito Hydra, onde a mortalidade adicionada na fase larval resulta na produção de mais indivíduos no próximo estágio do ciclo de vida, ou a sobrecompensação (ABRAMS, 2009; ABRAMS; MATSUDA, 2005). Embora tenha havido uma produção total no número de adultos similar entre as concentrações, a mortalidade larval foi diferente nos três tratamentos e ao longo das semanas, sendo mais aguda em 18,5 ppm na primeira semana e mais diluída no tratamento 8,5 ppm e no controle. É perceptível que no controle a mortalidade baixa nas duas primeiras semanas manteve a densidade larval alta, gerando uma competição por alimento, dessa forma, a competição ocasionou uma mortalidade elevada nas semanas seguintes (três e quatro),

conforme Figura 4. A mortalidade dependente da densidade pode ocorrer principalmente devido à competição intraespecífica por alimentos (JULIANO, 2007).

Diferente do que ocorreu no tratamento 18,5 ppm, que apesar de não ter tido uma CL90, apresentou uma mortalidade de aproximadamente 40%, o que possivelmente gerou um alívio na competição intraespecífica. Os indivíduos remanescentes tinham comida em abundância, permitindo que estes aloquem energia em crescimento e desenvolvimento (MUTURI *et al.*, 2011), diminuindo também as taxas de mortalidade ao longo das semanas seguintes.

No caso do tratamento 8,5 ppm, a mortalidade ao longo das semanas foi levemente menor. É preciso levar em consideração nesse caso, a presença do óleo essencial, acreditamos que depois de um tempo de exposição o óleo perdeu seu efeito tóxico e passou a servir de alimento para as larvas. Compostos orgânicos são importantes componentes de diversos habitats larvais, formando a base de muitas teias alimentares (MERRITT; DADD; WALKER, 1992). Microrganismos, como as bactérias, tem um papel importante na ciclagem e quebra de grandes moléculas orgânicas (SINSABAUGH; LINKINS, 1990) tornando-as mais facilmente assimiláveis para organismos aquáticos, tais como larvas de mosquitos, principalmente aquelas pertencentes à família Culicidae. Por degradarem mais rapidamente, estes compostos orgânicos com atividade larvicida podem tornar-se a base alimentar de bactérias que possam se desenvolver no interior dos recipientes de testes, e estas por sua vez servindo de alimento para as larvas de *A. aegypti* (MERRITT; DADD; WALKER, 1992). O que nos permite especular que a mortalidade mais baixa em relação ao controle ao longo das semanas tenha uma relação direta com este fato.

Em relação ao tempo de desenvolvimento das larvas submetidas aos diferentes tratamentos, não tivemos resultados significativos, mas apresentou um tempo maior para mosquitos expostos ao tratamento de 18,5 ppm, no qual havia maior disponibilidade de alimento, devido à baixa densidade larval. Nossos resultados diferem dos resultados encontrados por Beserra; Fernandes; Ribeiro, (2009) em que o aumento na disponibilidade de alimento em relação à densidade larval diminuiu a competição e favoreceu o ganho nutricional, com conseqüente redução no tempo de desenvolvimento. Resultados parecidos com Alto; Lord, (2016) que apontam que a mortalidade seletiva devido ao Bti permitiu a sobrevivência de alguns indivíduos com crescimento e desenvolvimento mais rápido. Acreditamos que devido à baixa competição promovida pela redução drástica da densidade larval na primeira semana, a larva teve uma maior

exploração do recurso individual demorando mais a desenvolver, pois a larva explora o recurso com qualidade por mais tempo. A fase larval é também a fase de desenvolvimento, onde o inseto busca alimento (BESERRA; FERNANDES; RIBEIRO, 2009).

O uso do óleo essencial *E. benthamii* apresentou efeito no tamanho das asas dos adultos, o comprimento da asa é conhecido por estar diretamente relacionado ao tamanho corporal em *A. aegypti* (CHRISTOPHERS, 1960), assim podemos confirmar que tivemos fêmeas com tamanho corporal maior que os machos, um resultado já esperado, pois sabe-se que fêmeas apresentam o corpo maior pois consome uma grande refeição de sangue (~2 µl) rica em proteínas, quase duplicando seu peso corporal para garantir a produção de ovos (JOY *et al.*, 2010). Em relação ao controle e aos tratamentos o tamanho da asa foi maior em 18,5 ppm, seguido de 8,5 ppm e menores no controle. Esse resultado é compatível com Alto; Lord (2016), que obtiveram em seus experimentos com Bti (*Bacillus thuringiensis israelenses*), um tamanho maior da asa de mosquitos fêmeas (~2,8 mm) em concentrações mais elevadas de Bti (0,07 ppm) e no controle fêmeas com asas menores (2,5 mm). No estudo de Muturi *et al.* (2011) constatou-se que larvas expostas ao inseticida malation produziram fêmeas maiores.

Fêmeas maiores são hábeis em replicar e transmitir vírus (NASCI, 1986), assim podemos especular que fêmeas oriundas dos recipientes com 18,5 ppm potencialmente teriam melhor competência vetorial. O fato das fêmeas serem maiores indica também que elas têm uma maior fecundidade (BADER; WILLIAMS, 2012). Alto e Lord, (2016) corroboram com essa teoria em seus estudos ao demonstrarem que quanto maior o comprimento de asa maior o número de ovos ovipositados por *A. aegypti* no tratamento com Bti na maior concentração. Fêmeas de larvas bem alimentadas emergem com reservas lipídicas adequadas para desenvolver ovários, sendo a primeira refeição de sangue suficiente para completar a ovogênese (MACDONALD, 1956).

Quanto ao resultado da longevidade, os adultos provenientes da concentração de 18,5 ppm viveram mais quando comparado a longevidade no controle (Figura 3). Resultado diferente do encontrado por Alto; Lord (2016) que utilizando o BTI contra *A. aegypti*, não obtiveram diferenças na sobrevivência do adulto. Seja devido ao aumento da sobrevivência ou a maior capacidade de voo em busca de hospedeiros, as fêmeas maiores vivem tempo suficiente para encontrar mais hospedeiros, comparado a fêmeas menores (GAMA *et al.*, 2005; NASCI, 1986). Assim é possível perceber que fêmeas maiores tem uma maior capacidade vetorial isso pode ser atribuído a presença de mais tecido

disponível para propagação de vírus (ALTO *et al.*, 2005).

Segundo Williams *et al.* (2014), as larvas de mosquito no ambiente natural são constantemente expostas a doses subletais de larvicidas, atribuíveis à recipientes com doses menores do que no momento da aplicação generalizada. A exposição a concentrações subletais na natureza é mais uma evidencia da resistência aos larvicidas em muitas populações de *A. aegypti* (MARCOMBE *et al.*, 2009).

6 CONCLUSÃO

Devido ao papel significativo que os larvicidas desempenham nos programas de controle a *A. aegypti*, há uma grande necessidade de conhecer os efeitos da densidade promovidos pela atividade de inseticidas naturais no desenvolvimento larval e na produção de mosquitos adultos da espécie *A. aegypti*. Aqui mostramos que a baixa concentração do óleo essencial de *E. benthamii* apresenta efeitos letais diretos em *A. aegypti* imaturos e efeitos indiretos no desenvolvimento. Esperamos que os larvicidas naturais possam reduzir o número de adultos emergentes, mas caso existam sobreviventes, segundo nossos resultados, esses terão vantagens no seu tamanho corporal e no tempo de vida do adulto.

7 REFERÊNCIAS

ABRAMS, Peter A. When does greater mortality increase population size? The long history and diverse mechanisms underlying the hydra effect. *Ecology Letters*, v. 12, n. 5, p. 462–474, 2009.

ABRAMS, Peter A; MATSUDA, Hiroyuki. The effect of adaptive change in the prey on the dynamics of an exploited predator population. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, v. 62, n. 4, p. 758–766, 1 abr. 2005.

ALTO, Barry W. *et al.* LARVAL COMPETITION DIFFERENTIALLY AFFECTS ARBOVIRUS INFECTION IN AEADES MOSQUITOES. *Ecology*, v. 86, n. 12, p. 3279–3288, dez. 2005.

ALTO, Barry W.; LORD, Cynthia C. Transstadial Effects of Bti on Traits of *Aedes aegypti* and Infection with Dengue Virus. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 10, n. 2, p. e0004370, 12 fev. 2016.

AMER, Abdelkrim; MEHLHORN, Heinz. Larvicidal effects of various essential oils against *Aedes*, *Anopheles*, and *Culex* larvae (Diptera, Culicidae). *Parasitology Research*, v. 99, n. 4, p. 466–472, set. 2006.

BADER, Christie A.; WILLIAMS, Craig R. Mating, ovariole number and sperm production of the dengue vector mosquito *Aedes aegypti* (L.) in Australia: broad

- thermal optima provide the capacity for survival in a changing climate. *Physiological Entomology*, v. 37, n. 2, p. 136–144, 2012.
- BAKKALI, F. *et al.* Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, v. 46, n. 2, p. 446–475, 1 fev. 2008.
- BENELLI, Giovanni *et al.* Shedding light on bioactivity of botanical by-products: neem cake compounds deter oviposition of the arbovirus vector *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in the field. *Parasitology Research*, v. 113, n. 3, p. 933–940, mar. 2014.
- BESERRA, Eduardo B; FERNANDES, Carlos R M; RIBEIRO, Paulino S. Relação entre densidade larval e ciclo de vida, tamanho e fecundidade de *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) em laboratório. *Neotropical Entomology*, v. 38, n. 6, p. 847–852, dez. 2009.
- CANDIDO, Lafayette Pereira *et al.* Bioactivity of plant extracts on the larval and pupal stages of *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 46, n. 4, p. 420–425, ago. 2013.
- CHELLAPPANDIAN, Muthiah *et al.* Botanical essential oils and uses as mosquitocides and repellents against dengue. *Environment International*, v. 113, p. 214–230, 1 abr. 2018.
- CHRISTOPHERS, Samuel Rickard. *Aedes aegypti: the yellow fever mosquito*. [S.l.]: CUP Archive, 1960.
- EBADOLLAHI, Asgar. Essential Oils Isolated from Myrtaceae Family as Natural Insecticides. *Annual Review & Research in Biology*, v. 3, 4 mar. 2013.
- GAMA, Renata Antonaci *et al.* Efeito da densidade larval no tamanho de adultos de *Aedes aegypti* criados em condições de laboratório. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 38, n. 1, p. 64–66, fev. 2005.
- GOINDIN, Daniella *et al.* Levels of insecticide resistance to deltamethrin, malathion, and temephos, and associated mechanisms in *Aedes aegypti* mosquitoes from the Guadeloupe and Saint Martin islands (French West Indies). *Infectious Diseases of Poverty*, v. 6, 10 fev. 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5303256/>>. Acesso em: 23 nov. 2018.
- GOVINDARAJAN, Marimuthu *et al.* Novel synthesis of silver nanoparticles using *Bauhinia variegata*: a recent eco-friendly approach for mosquito control. *Parasitology Research*, v. 115, n. 2, p. 723–733, fev. 2016.
- ISMAN, Murray B. Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Protection*, v. 19, n. 8–10, p. 603–608, set. 2000.
- JOY, Teresa K. *et al.* The impact of larval and adult dietary restriction on lifespan, reproduction and growth in the mosquito *Aedes aegypti*. *Experimental Gerontology*, v. 45, n. 9, p. 685–690, set. 2010.
- JULIANO, Steven A. Population Dynamics. *Journal of the American Mosquito Control Association*, v. 23, n. 2 Suppl, p. 265–275, 2007.

LALTHAZUALI, Null; MATHEW, Nisha. Mosquito repellent activity of volatile oils from selected aromatic plants. *Parasitology Research*, v. 116, n. 2, p. 821–825, fev. 2017.

LEES, Rosemary Susan *et al.* Back to the future: the sterile insect technique against mosquito disease vectors. *Current Opinion in Insect Science, Social Insects * Vectors and Medical and Veterinary Entomology*. v. 10, p. 156–162, 1 ago. 2015.

LUCIA, Alejandro *et al.* Larvicidal effect of Eucalyptus grandis essential oil and turpentine and their major components on Aedes aegypti larvae. *Journal of the American Mosquito Control Association*, v. 23, n. 3, p. 299–303, set. 2007.

LUCIA, Alejandro *et al.* Validation of models to estimate the fumigant and larvicidal activity of Eucalyptus essential oils against Aedes aegypti (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research*, v. 110, n. 5, p. 1675–1686, maio 2012.

MACDONALD, W. W. Aedes Aegypti in Malaya. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, v. 50, n. 4, p. 399–414, 1 dez. 1956.

MERRITT, R. W.; DADD, R. H.; WALKER, E. D. Feeding behavior, natural food, and nutritional relationships of larval mosquitoes. *Annual Review of Entomology*, v. 37, p. 349–376, 1992.

MOORE, John C *et al.* Detritus, trophic dynamics and biodiversity. p. 17, [S.d.].

MOSSI, Altemir J. *et al.* Insecticidal and repellency activity of essential oil of Eucalyptus sp. against Sitophilus zeamais Motschulsky (Coleoptera, Curculionidae). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 91, n. 2, p. 273–277, 30 jan. 2011.

MUTURI, Ephantus J. *et al.* Larval environmental stress alters Aedes aegypti competence for Sindbis virus. *Tropical medicine & international health: TM & IH*, v. 16, n. 8, p. 955–964, ago. 2011.

NASCI, Roger S. The size of emerging and host-seeking Aedes aegypti and the relation of size to blood-feeding success in the field. *Journal of the American Mosquito Control Association*, v. 2, n. 1, p. 61–62, 1986.

PAVELA, Roman. Essential oils for the development of eco-friendly mosquito larvicides: A review. *Industrial Crops and Products*, v. 76, p. 174–187, 15 dez. 2015.

RATTAN, Rameshwar Singh. Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin. *Crop Protection*, v. 29, n. 9, p. 913–920, 1 set. 2010.

SINSABAUGH, Robert L.; LINKINS, Arthur E. Enzymic and chemical analysis of particulate organic matter from a boreal river. *Freshwater Biology*, v. 23, n. 2, p. 301–309, 1990.

WILLIAMS, Gregory M. *et al.* Area-wide ground applications of Bacillus thuringiensis var. israelensis for the control of Aedes albopictus in residential neighborhoods: from optimization to operation. *PloS One*, v. 9, n. 10, p. e110035, 2014.

YAKOB, Laith; ALPHEY, Luke; BONSALE, Michael B. Aedes aegypti Control: The

Concomitant Role of Competition, Space and Transgenic Technologies. *Journal of Applied Ecology*, v. 45, n. 4, p. 1258–1265, 2008.

ZIPKIN, Elise F. *et al.* When can efforts to control nuisance and invasive species backfire? *Ecological Applications*, v. 19, n. 6, p. 1585–1595, 2009.