

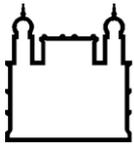
MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Programa de Pós-Graduação Vigilância e Controle de Vetores

TESTE DO ÓLEO ESSENCIAL DE LARANJA (CITRUS SINENSIS)  
ENCAPSULADO EM LEVEDURAS PARA O CONTROLE DA  
POPULAÇÃO DE *Aedes Aegypti* EM BELO HORIZONTE - MG

FABIANE DAS GRAÇAS CALDEIRA BRANT

Rio de Janeiro  
Agosto de 2019



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Programa de Pós-Graduação em Vigilância e Controle de Vetores**

Fabiane das Graças Caldeira Brant

Teste do óleo essencial de laranja (*Citrus sinensis*) encapsulado em leveduras para o controle da população de *Aedes aegypti* em Belo Horizonte - MG

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Vigilância e Controle de Vetores.

**Orientador (es): Prof. Dr. Fernando Ariel Genta**  
**Prof. Dra. Mariana Rocha David**

**RIO DE JANEIRO**

Agosto de 2019

BRANT, FABIANE DAS GRAÇAS CALDEIRA.

TESTE DO ÓLEO ESSENCIAL DE LARANJA (*CITRUS SINENSIS*)  
ENCAPSULADO EM LEVEDURAS PARA O CONTROLE DA POPULAÇÃO DE  
*AEDES AEGYPTI* EM BELO HORIZONTE - MG / FABIANE DAS GRAÇAS  
CALDEIRA BRANT. - Rio de Janeiro, 2019.

79 f.; il.

Dissertação (Mestrado Profissional) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-  
Graduação em Vigilância e Controle de Vetores, 2019.

Orientador: Fernando Ariel Genta.

Co-orientadora: Mariana Rocha David.

Bibliografia: Inclui Bibliografias.

1. *Aedes aegypti*. 2. *Citrus sinensis*. 3. óleo essencial. 4. larvicida. 5.  
inseticida. I. Título.



Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz  
Instituto Oswaldo Cruz

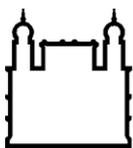
Ata da defesa de dissertação de mestrado profissional em Vigilância e Controle de Vetores de **Fabiane das Graças Caldeira Brant**, sob orientação do Dr. Fernando Ariel Genta e coorientada pela Dr<sup>a</sup>. Mariana Rocha David. Ao décimo sexto dia do mês de agosto de dois mil e dezenove, realizou-se às quatorze horas, na Sala 14B - Pavilhão Hélio & Peggy Pereira, o exame da dissertação de mestrado profissional intitulada: **“Teste do óleo essencial de laranja (*Citrus sinensis*) encapsulado em levedura para o controle da população de *Aedes aegypti* de Belo Horizonte - MG”**, no programa de Pós-graduação em Vigilância e Controle de Vetores do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências - área de concentração: Epidemiologia e controle de vetores, na linha de pesquisa: Controle. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr. José Bento Pereira Lima - IOC/FIOCRUZ (Presidente), Dr<sup>a</sup>. Evelize Folly das Chagas - UFF/RJ, Dr<sup>a</sup>. Margareth de Lara Capurro-Guimarães - USP/SP e como suplentes: Dr. Cícero Brasileiro de Mello Neto – UFF/RJ e Dr<sup>a</sup>. Denise Valle – IOC/FIOCRUZ. Após arguir a candidata e considerando que a mesma demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização da apresentação dos dados, a banca examinadora pronunciou-se pela APROVAÇÃO da defesa da dissertação de mestrado profissional. De acordo com o regulamento do Curso de Pós-Graduação em Vigilância e Controle de Vetores do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de Doutora em Ciências está condicionada à emissão de documento comprobatório de conclusão do curso. Uma vez encerrado o exame, o coordenador do Programa, Dr. Fernando Ariel Genta, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora. Rio de Janeiro, 16 de agosto de 2019.

Dr. José Bento Pereira Lima (Presidente da Banca):

Dr<sup>a</sup>. Evelize Folly das Chagas (Membro da Banca):

Dr<sup>a</sup>. Margareth de Lara Capurro-Guimarães (Membro da Banca):

Dr. Fernando Ariel Genta (Coordenador do Programa):



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Programa de Pós-Graduação em Vigilância e Controle de Vetores**

***AUTORA: Fabiane das Graças Caldeira Brant***

**Teste do óleo essencial de laranja (*Citrus sinensis*) encapsulado em leveduras para o controle da população de *Aedes aegypti* em Belo Horizonte  
- MG**

**ORIENTADOR (ES): Prof. Dr. Fernando Ariel Genta**

**Prof. Dra. Mariana Rocha David**

**Aprovada em: 16/08/2019**

### **EXAMINADORES:**

**Prof. Dr. José Bento Pereira Lima- Presidente** (FIOCRUZ/Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro)

**Prof. Dra. Margareth Capurro** (Universidade de São Paulo)

**Prof. Dra. Evelize Folly das Chagas** (Universidade Federal Fluminense)

**Prof. Dra. Denise Valle** (FIOCRUZ/Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro)

**Prof. Dr. Cícero Brasileiro de Melo Neto** (Universidade Federal Fluminense)

Rio de Janeiro, 21 de agosto de 2019.

Aos meus queridos pais, Afonso e Cristina,  
pelo carinho e apoio incondicional.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus orientadores, Fernando e Mariana, pelo aprendizado, paciência e palavras de incentivo, obrigada por confiarem em mim.

Aos amigos, Bruno e Camila pela dedicação e empenho, sou muito grata pela participação de vocês nesse projeto. Camila sempre tão organizada e sorridente, nossas conversas me trouxeram, por muitas vezes, leveza e suavidade. Bruno, minha eterna gratidão pelos ensinamentos e paciência, tenho por você grande admiração.

Aos meus professores do Mestrado em Vigilância e Controle de Vetores, agradeço por cada aula ministrada, cada conhecimento passado. Aos meus amigos do Mestrado, como foi interessante conhecer pessoas de várias partes do país, cada um com sua história e sotaque, foram momentos mais que especiais partilhados nesses dois anos. Juntos somos melhores! Em especial, agradeço à “Galera do Alojamento”, Rose, Thayna, Aline, Mara e Igo, pelas noites de estudo, risadas e carinho, espero que nossa parceria e amizade sejam duradouras.

Obrigada aos meus amigos da Gerência de Zoonoses – Regional Nordeste por entenderem meus momentos de ausência e também pelos conselhos nos meus momentos mais difíceis e estressantes. Tenho certeza que não foi fácil para muitos de vocês. Um agradecimento especial à minha gerente Rodneia Duarte pelo incentivo e por apoiar minha dedicação ao mestrado mesmo nos momentos mais atribulados em nossa rotina de trabalho. A toda equipe da Zoo2, todos sempre me ajudaram um pouquinho, mesmo sem perceber, Sabrina, Antônia e Margareth, a participação de vocês foi essencial no desenvolvimento dos ensaios em BH. À equipe Zoonoses Nível Central, por me ajudar prontamente quando precisei e por apoiar a realização do projeto.

À minha família, pais, irmãos e cunhadas pelas orações, pelo incentivo e principalmente pelo amor e carinho, vocês são meus pilares. Minha força e desejo de me tornar uma pessoa melhor vem de vocês.

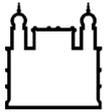
Ao Raphael, meu amor, pelo apoio incondicional, por me incentivar e vibrar por cada conquista realizada, mas também por “puxar minha orelha” e me dar força e garra quando estas me faltaram.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001. Agradeço ao Instituto Oswaldo Cruz e a Prefeitura de Belo Horizonte pelo suporte técnico para a realização do nosso trabalho. À Comissão

de Pós-Graduação de Vigilância e Controle de Vetores pela dedicação e comprometimento que resultaram na excelência do curso.

Agradeço ao Centers for Disease Control and Prevention pelo suporte financeiro e também aos colaboradores da University of New Mexico Health Sciences Center, Center for Global Health, Albuquerque, NM, USA; ao Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Insetos, Instituto Oswaldo Cruz (IOC-Fiocruz), Rio de Janeiro, BR e ao Laboratório de Mosquitos Transmissores de Hematozoários, Instituto Oswaldo Cruz (IOC-Fiocruz), Rio de Janeiro, BR.

Finalmente, agradeço a todos os amigos, que por um gesto, sorriso ou palavra reafirmaram minha vontade de superar esse desafio e conquistar algo que um dia pensei não ser capaz. Não existem limites para quem se permite sonhar.



Ministério da Saúde

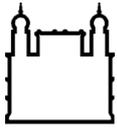
FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Teste do óleo essencial de laranja (*Citrus sinensis*) encapsulado em leveduras para o controle da população de *Aedes aegypti* em Belo Horizonte – MG

### RESUMO

Arbovírus como dengue (DENV), Zika (ZIKV) e chikungunya (CHIKV) são hoje uma importante e constante ameaça à saúde humana em regiões tropicais e subtropicais do mundo. As epidemias causadas por esses vírus estão intimamente relacionadas à disseminação do seu vetor primário, o *Aedes aegypti*. Na ausência de terapia específica e vacinas amplamente disponíveis para a população contra DENV, ZIKV e CHIKV, a redução da ocorrência das arboviroses causadas por estes vírus deve ocorrer especialmente através do controle do vetor. Para tal, inseticidas químicos neurotóxicos foram utilizados nas últimas décadas de forma contínua e indiscriminada, culminando na seleção de populações de *A. aegypti* resistentes a estes compostos. Sendo assim, o desenvolvimento de novos produtos com ação inseticida, sobretudo que associem facilidade de aplicação, eficiência e baixo impacto ambiental, é atualmente de grande interesse. Nesse contexto, esse estudo pretende testar a estabilidade, a atividade larvicida e a influência no comportamento de oviposição do óleo essencial da laranja encapsulado em célula de levedura (OELE) considerando populações de *A. aegypti* como alvo. A atividade larvicida do OELE foi avaliada sob condições ambiente de temperatura, umidade e luz. Foram realizados bioensaios do tipo dose-resposta para a determinação das concentrações letais e a mortalidade foi monitorada após 24 horas. Já a estabilidade do OELE foi avaliada semanalmente durante 21 dias em reservatórios plásticos dispostos em ambiente parcialmente exposto a luz solar. Os ensaios para investigar o impacto do larvicida OELE na escolha do local de oviposição por fêmeas individualizadas foram realizados no laboratório, em gaiolas teladas. O larvicida OELE foi considerado altamente ativo ( $CL_{50} < 50$  mg/L) contra *A. aegypti* das duas populações testadas, porém, a população de Belo Horizonte apresentou valores superiores para  $CL_{50}$  (49,66 mg/L),  $CL_{90}$  (130,02 mg/L) e  $CL_{95}$  (180,36mg/L) quando comparada à linhagem Rockefeller ( $CL_{50}=20,04$  / $CL_{90}=57.3$  e  $CL_{95}= 81,92$  mg/L). O período de estabilidade do OELE no ambiente com índices de mortalidade próximos a 100% não ultrapassou os 14 dias para 160 e 280mg/L. O OELE nas armadilhas influenciou a escolha do local de oviposição das fêmeas repelindo ou inibindo a postura de ovos. Estas observações suportam a hipótese de que o OELE pode vir a ser uma alternativa viável no controle de populações de *A. aegypti*, porém a instabilidade e a degradação do biolarvicida demandam mais avaliações, assim como a influência de fatores ambientais.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Test of the Orange Essential Oil (*Citrus sinensis*) encapsulated in yeast for the control of the populations of *Aedes aegypti* in Belo Horizonte – MG

### ABSTRACT

Arboviruses such as dengue, Zika and chikungunya are nowadays an important and constant threat to human health in tropical and subtropical regions on earth. The epidemics caused by these viruses are intimately related to the dissemination of its primary vector, the *Aedes aegypti*. In the absence of specific therapy and vaccines widely available to the population against DENV, ZIKV and CHIKV, the reduction of arboviroses occurrence caused by these viruses shall occur especially through the vector control. For this purpose, neurotoxic chemicals insecticides were used continuously and indiscriminately in the last decades, culminating in the selection of *A. aegypti* populations resistant to these compounds. In this case, the development of new products with insecticidal action, especially that associate ease of application, efficiency and low environmental impact, is currently of great interest. In this context, this study intends to test the stability, the larvicidal activity, and the influence on the behavior of the essential oil oviposition of the orange oil encapsulated in yeast cells (OO) considering *A. aegypti* populations as a target. The larvicidal activity of the OO was evaluated under environmental conditions of temperature, humidity and light. Bioassays of dose-response type were performed to determine the lethal concentrations, and mortality was monitored after 24 hours. The stability of the OO was evaluated weekly during 21 days in plastic containers arranged in an environment partially exposed to sunlight. The tests to investigate the impact of the OO larvicide in the choice of oviposition site by individualized females were performed in the laboratory, in cages with net. The OO larvicide was considered highly active ( $LC_{50} < 50$  mg/L) against *A. aegypti* of both tested populations, however the population of Belo Horizonte presented higher values for  $LC_{50}$  (49,66 mg/L),  $LC_{90}$  (130,02 mg/L) and  $LC_{95}$  (180,36 mg/L), when compared to the Rockefeller lineage ( $LC_{50}=20,04$  /  $LC_{90}=57,3$  and  $LC_{95}=81,92$  mg/L). The stability period of the OO in the environment with mortality rates close to 100% did not exceed 14 days for 160 and 280 mg/L. The OO in the traps influenced the choice of oviposition site of the female repelling or inhibiting the egg laying. These observations support the hypothesis that the OO may be a feasible alternative in the control of *A. aegypti* populations, but the instability and degradation of the biolarvicide demand more evaluations, as well as the influence of environmental factors.

## ÍNDICE

<b>RESUMO .....</b>	<b>vii</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>viii</b>
<b>1.INTRODUÇÃO.....</b>	<b>01</b>
1.1. <i>Aedes aegypti</i> .....	01
1.2. Arbovírus transmitidos pelo <i>A. aegypti</i> .....	04
1.3. Controle do <i>A. aegypti</i> .....	05
1.4. Resistência a inseticidas .....	06
1.5. Óleos Essenciais .....	08
1.5.1. Óleos Essenciais e sua aplicação no controle de insetos .....	09
1.5.2. Óleo Essencial de frutas cítricas .....	11
1.5.3. Microencapsulamento de OE em células de levedura .....	12
1.5.4. Óleo Essencial de Laranja Encapsulado em Levedura (OELE) .....	13
1.6. Arboviroses em Belo Horizonte .....	14
<b>2. JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>16</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>18</b>
3.1. Objetivo Geral .....	18
3.2. Objetivos Específicos .....	18
<b>4. METODOLOGIA .....</b>	<b>19</b>
4.1. Área de Estudo .....	19
4.2. Mosquitos <i>A. aegypti</i> utilizados nos ensaios .....	20
4.3. Bioensaios para determinação da atividade larvicida do OELE .....	21

4.4. Estabilidade do OELE em condições de semicampo .....	22
4.5. Influência do OELE no comportamento de oviposição .....	25
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>28</b>
5.1. Bioensaios para determinação da atividade larvívica do OELE .....	28
5.2. Estabilidade do OELE em condições de semicampo .....	30
5.2.1. Aspecto visual do OELE exposto ao ambiente .....	30
5.2.2. Estabilidade do OELE em semicampo .....	33
5.3. Influência do OELE no comportamento de oviposição .....	34
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>44</b>
<b>7. CONCLUSÕES .....</b>	<b>54</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>55</b>
<b>9. ANEXOS .....</b>	<b>62</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 .....	17
Figura 2 .....	23
Figura 3 .....	23
Figura 4 .....	25
Figura 5 .....	27
Figura 6 .....	28
Figura 7 .....	30
Figura 8 .....	30
Figura 9 .....	31
Figura 10 .....	31
Figura 11 .....	33
Figura 12 .....	35
Figura 13 .....	35
Figura 14 .....	36
Figura 15 .....	38
Figura 16 .....	39
Figura 17 .....	40
Figura 18 .....	41
Figura 19 .....	41

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.....	28
Tabela 2 .....	33
Tabela 3 .....	34
Tabela 4 .....	37
Tabela 5 .....	61

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AchE	Acetilcolinesterase
Bti	<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar. <i>israelensis</i>
CHIKV	Chikungunya
CL	Concentração Letal
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
DENV	Dengue
EST	Esterase
GST	Glutathiona S-transferase
IAO	Índice de Atividade de Oviposição
IGR	Regulador de crescimento de insetos
OE	Óleo Essencial
OELE	Óleo Essencial de Laranja encapsulado
OMS	Organização Mundial de Saúde
OP	Organofosforado
OFM	Oxidase de Função Mista
PNCD	Programa Nacional de Controle da Dengue
PY	Piretróide
RR	Razão de Resistência
ZIKV	Zika vírus

# 1 - INTRODUÇÃO

## 1.1 – *Aedes aegypti*

O mosquito *Aedes aegypti* L., 1762 é o principal vetor de arbovírus, como dengue (DENV), Zika (ZIKV) e chikungunya (CHIKV), nas regiões tropicais e subtropicais de todo o mundo, principalmente entre latitudes 35° N e 35° S (1,2). Foi descrito na África, mais precisamente na região etiópica e sua dispersão acompanhou o aumento do tráfego marítimo do homem entre os séculos XVII e XIX (3,4). Esse inseto possui algumas características que contribuíram para que ele se tornasse uma espécie invasora de sucesso, como por exemplo a resistência de seus ovos à dessecação, podendo se manter viáveis por até 450 dias, o que facilita seu transporte mesmo na ausência de água (4,5). Certamente a sua associação com o homem e o fato de ter como criadouros preferenciais recipientes artificiais, sejam estes abandonados a céu aberto ou aqueles usados para armazenamento de água, permitiram sua dispersão ao redor do mundo e a colonização de ambientes bem distantes de sua terra originalmente nativa (4,5).

Atualmente, *A. aegypti* apresenta distribuição global nos trópicos, onde coloniza Américas, Ásia e Oceania. Nas Américas pode ser encontrado desde o Uruguai até o sul dos Estados Unidos da América (2–4), onde é frequentemente o principal responsável por surtos de arboviroses em países como Venezuela, Cuba, Paraguai e Brasil. No Brasil, sua introdução foi relacionada primeiramente com a atividade portuária, a bordo de barcos vindos da África, e ao tráfego negreiro no período colonial (6). Nessa época, este mosquito promoveu grandes transtornos à população humana pelo seu envolvimento na transmissão do vírus da febre amarela no espaço urbano (2).

Embora existam subespécies de *A. aegypti* associadas a regiões de matas na África, no Brasil seu habitat está sempre associado à presença do homem, restringindo-se ao peridomicílio e domicílio humanos (4,7). Essa presença em ambiente domiciliar é marcante, visto que ambos os sexos são

encontrados em proporções semelhantes dentro das casas ou próximos a estas. É nesse ambiente que eles obtêm alimento e copulam e as fêmeas encontram recipientes de água propícios para a postura (4). O ciclo de vida deste mosquito consiste de quatro estágios: ovo, larva, pupa e adulto. Larvas e pupas são aquáticas, enquanto que os adultos são terrestres. Atualmente, *A. aegypti* está presente em todos os Estados brasileiros e no Distrito Federal (8).

A seleção do local de postura de ovos é um evento decisivo para fêmeas grávidas de mosquitos, pois suas formas imaturas não são capazes de se deslocar caso as condições de sua sobrevivência se tornem desfavoráveis (9,10). Portanto, uma adequada seleção do sítio de postura pode garantir o desenvolvimento e a sobrevivência de sua prole. A cada ciclo gonotrófico, as fêmeas produzem cerca de 120 ovos e os depositam nas paredes internas de recipientes, acima do nível da água, preferencialmente em águas com baixo índice de poluição (12,13).

Fatores como intensidade luminosa, ausência de luz e mudança de temperatura podem contribuir na escolha da direção do vôo e no comportamento de uma fêmea durante a postura. Fêmeas de *A. aegypti* exibem um comportamento chamado de "oviposição em salto", uma conduta que consiste na tendência de distribuir os ovos em vários locais (9). A oviposição em salto pode resultar em uma maior dispersão do vetor no ambiente e maximizar a sobrevivência da prole, que não estará concentrada em um único criadouro (9).

Para garantir o sucesso da oviposição, as fêmeas seguem pistas visuais e olfativas, assim como sinais físico-químicos para avaliar a qualidade da água antes mesmo de tomar a decisão de depositar seus ovos. Para garantir o desenvolvimento de sua prole, as fêmeas buscam por locais com menor exposição possível para parasitas, predadores e com acesso garantido ao alimento (10,62,63).

Evidências de estudos anteriores indicam que fêmeas grávidas de *A. aegypti* preferem depositar seus ovos em paisagens residenciais, em recipientes de cor escura (10), tais como pneus, latas, vidros, pratos de vasos e xaxins, caixas d'água e vasos de cemitério (4,13,14). Chua et al, 2004 (10) realizaram

um estudo sobre o comportamento de oviposição de fêmeas de *A. aegypti* e observaram que tipo, forma e número de aberturas nos recipientes afetaram a escolha no momento da postura; isso pode estar relacionado à acessibilidade e ao efeito protetor conferido por cada forma de recipiente.

Agentes químicos voláteis liberados por vegetação em decomposição ou por bactérias contidas na água podem atuar como atrativos (10). O aumento de material orgânico no local de postura pode contrariar a oviposição em salto e aumentar o número de ovos em um único recipiente (15). Ponnusamy et al, 2008 (15) realizaram testes comportamentais de fêmeas grávidas de *A. aegypti* e os resultados indicaram que estímulos associados aos microorganismos presentes em infusões de plantas fermentadas direcionam fêmeas grávidas para depositar até 90% dos seus ovos em um único recipiente. Aumentar o número de ovos colocados em um único recipiente contribui com a sensibilidade das armadilhas de oviposição usadas para detectar e monitorar a atividade de *A. aegypti* em regiões endêmicas para doenças transmitidas por ele (15).

Durante o desenvolvimento, *A. aegypti* apresenta quatro estágios larvais que se alimentam de detritos presentes na água (saprófitos). A fase larval dura em média de cinco dias, mas esse período pode se estender devido a condições ambientais desfavoráveis. A pupa não se alimenta e essa fase de desenvolvimento tem duração de dois a três dias, é também nesse estágio que ocorrem as modificações necessárias para o surgimento do adulto (4).

Uma das maneiras mais eficazes de controle do *A. aegypti* consiste na eliminação de possíveis criadouros larvares, prática comum nos programas de controle de arbovírus. Portanto, a compreensão sobre o comportamento de oviposição de fêmeas de *A. aegypti* pode ser importante para o desenvolvimento de estratégias de controle mais eficazes (9,16).

## 1.2– Arbovírus transmitidos pelo *A. aegypti*

Estima-se que existem mais de 500 espécies de arbovírus (vírus transmitidos por artrópodes – “*arthropod borne vírus*”) distribuídas pelo mundo, das quais pelo menos 150 causam doenças no homem (17). Um dos arbovírus de maior importância pelo mundo é o DENV, cujo mosquito *A. aegypti* é o principal vetor (18). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 50 milhões de pessoas por ano são infectadas por um dos quatro sorotipos de DENV (DENV-1 a DENV-4) em todo o mundo (8,18). O Brasil é o país mais afetado por esse patógeno no continente americano com circulação dos quatro sorotipos existentes, sendo assim considerado hiperendêmico. A primeira grande epidemia registrada por dengue no Brasil data de 1981, sendo reportado no Estado de Roraima (8), embora haja evidências da circulação do DENV no país desde o final do século XIX (19).

Recentemente, outros dois arbovírus transmitidos pelo *A. aegypti* emergiram em áreas urbanas no país: CHIKV e ZIKV. O primeiro teve sua entrada registrada nas Américas em dezembro de 2013 através da região caribenha e a presença de casos importados no Brasil foi confirmada cerca de seis meses depois (20,21). Já no ano seguinte foram registrados os primeiros casos com transmissão autóctone na Bahia e no Amapá (20,22,23). Já o ZIKV teve sua entrada registrada no Brasil pela Região Nordeste em 2014 (24,25). Inicialmente pesquisadores suspeitaram da associação desse arbovírus com o aumento de casos de microcefalia e outras alterações no desenvolvimento neurológico de recém-nascidos de mães infectadas durante o primeiro trimestre da gravidez. Após a confirmação dessa suspeita, foi estabelecido um anúncio de Emergência de Saúde Pública de Interesse Internacional pela OMS em 2016 (21,26). Os sintomas das doenças causadas pelos três vírus supramencionados incluem febre, dores de cabeça e no corpo (principalmente nas articulações), náusea e conjuntivite, o que comumente dificulta o diagnóstico diferencial (13).

### 1.3– Controle do *A. aegypti*

Visto que não há vacinas amplamente disponíveis para a população contra DENV, CHIKV e ZIKV, a principal maneira de reduzir a transmissão ainda é através do controle do mosquito vetor. O país iniciou o combate ao *A. aegypti* de forma institucionalizada nas primeiras décadas do século XX. Mesmo tendo sido considerado oficialmente erradicado por duas vezes, nos anos de 1958 e 1973, *A. aegypti* voltou a ser identificado no Brasil em 1976. A “recolonização” no Brasil é atribuída a falhas no sistema de vigilância e controle vetorial de países vizinhos (2). A permanência desse mosquito até os dias atuais no meio antropizado foi facilitada pelo crescimento urbano desordenado das grandes metrópoles, condições precárias de saneamento básico/abastecimento de água e ausência de políticas efetivas de manejo de resíduos sólidos, que resultam na abundância de recipientes artificiais para oviposição. Além disso, o clima quente e úmido favorece o desenvolvimento acelerado das formas imaturas até o mosquito adulto (4,5).

O Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD), implantado no Brasil no ano de 2002, tem como objetivo principal a redução da infestação domiciliar por *A. aegypti* para menos de 1% em todos os municípios. Dessa forma, o PNCD preconiza a elaboração de programas permanentes de combate ao vetor e a avaliação periódica da efetividade dos larvicidas e adulticidas adotados nas ações onde o controle químico é necessário (27).

Embora os inseticidas químicos sejam um dos meios de controle de vetores mais adotado, existem outras abordagens para redução de densidade de *A. aegypti* no ambiente, como é o caso do controle mecânico, controle biológico e inseticidas alternativos (2). O controle mecânico consiste na adoção de práticas capazes de impedir a procriação de *Aedes* tais como remoção, destruição, proteção ou destinação adequada de possíveis criadouros(3,28). Já o controle biológico pode fazer uso de larvas de peixes predadoras e formulações bacterianas entomopatogênicas, como o *Bacillus thuringiensis var. israeliensis* (Bti). Como inseticidas alternativos, existem os reguladores do crescimento de insetos (IGRs) (1,2).

Os inseticidas amplamente utilizados nos programas de controle de vetores possuem ação neurotóxica e pertencem basicamente a quatro principais classes: organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides, sendo esse último e organofosforados os mais adotados pelo mundo (1,29). O Ministério da Saúde substituiu os organofosforados pelo Bti para o controle dos estágios imaturos do *A. aegypti* em algumas localidades e também houve a substituição por piretróides nas ações de controle de adultos (1). Porém, a redução da susceptibilidade do vetor aos piretróides também foi detectada em algumas localidades entre 2001 e 2003 (30). Desde 2009, os IGRs passou a ser utilizado em todo o país dentro de uma estratégia de rotação de inseticidas a cada 3-4 anos (1).

#### 1.4 - Resistência a inseticidas

A OMS define resistência como a competência de uma população de mosquitos em resistir a dosagens de inseticidas que seriam letais para a maioria dos indivíduos da espécie (2,31). Vale salientar que o inseticida não produz mutações genéticas capazes de tornar um indivíduo resistente, entretanto seu uso contínuo elimina os insetos suscetíveis e seleciona aqueles que possuem caracteres que os tornam mais resistentes, contribuindo ao longo do tempo para a seleção de populações de campo resistentes (2,32).

A resistência pode surgir por vários mecanismos, por exemplo, através da seleção de mutações no gene que codifica a proteína-alvo do inseticida. Organofosforados e carbamatos possuem como molécula alvo a acetilcolinesterase (AChE), enzima responsável pela remoção do neurotransmissor acetilcolina da fenda sináptica, cessando a propagação do impulso nervoso. Organofosforados e carbamatos inibem a ação dessa enzima, dessa forma a acetilcolina permanece na fenda sináptica e o impulso nervoso não cessa, levando o inseto à morte (2,21). Canais de sódio são os principais sítios-alvo de piretróides e de alguns organoclorados (21); contrações involuntárias ocorrem quando o inseticida se liga ao sítio-alvo, causando a morte do inseto. O mecanismo de resistência conhecido como *knockdown resistance* consiste em modificações na estrutura do canal de sódio resultando na

diminuição ou perda de afinidade entre o composto químico e o sítio no qual ele se liga; sendo assim, as concentrações involuntárias seguidas de morte não ocorrem em indivíduos que apresentam essa característica (2,21). Mutações nos canais de sódio já foram registradas em várias espécies de insetos, incluindo *A. aegypti* (17).

Outro tipo de mecanismo, a resistência metabólica, resulta do aumento da capacidade de detoxificação de xenobióticos pelo inseto (1,2). Atualmente, é considerada o principal mecanismo de resistência de mosquitos a inseticidas químicos e tem sido relatada contra todos os inseticidas usados em saúde pública e na agricultura (33,34). Pode ocorrer através da alteração na sequência de aminoácidos das enzimas relacionadas com detoxificação e/ou da superexpressão dessas enzimas (35), resultando em um metabolismo de detoxificação mais eficiente em ambos os casos. Três grandes famílias de enzimas estão associadas ao metabolismo de inseticidas: oxidases de função mista (OFM), glutathione S-transferases (GST) e esterases (EST). A diversidade de enzimas de detoxificação em insetos provavelmente se deve à adaptação ao elevado número de xenobióticos, sejam naturais ou antropogênicos, encontrados em seu habitat (2,33,34).

Ainda não há evidências que confirmem alterações na AChE relacionadas à resistência a temefós em populações de campo de *A. aegypti*; já em relação à resistência metabólica, as enzimas OFM estão fortemente associadas à resistência a inseticidas em várias populações de *A. aegypti* em todo o mundo (1). Bellinato et al, 2016 (1) encontraram apenas discretas alterações nesta classe de enzimas em larvas de populações brasileiras, enquanto que para espécimes adultos foram observadas alterações equivalentes em EST e GST. Em 2007, atividade em EST foi associada à resistência tanto para organofosforados quanto para piretróides no Brasil (30).

O Bti e os IGRs são importantes alternativas em razão do aumento crescente de resistência aos larvicidas neurotóxicos; tem sido proposto que o Bti, por possuir múltiplos mecanismos de toxicidade, pode tornar o desenvolvimento de resistência nas populações de mosquitos mais complexo

(36,37). Atualmente estão disponíveis várias formulações de Bti e em sua grande maioria, essas formulações são apresentadas em formas líquida ou granulada, contendo cristais com atividade larvicida e esporos viáveis que auxiliam no processo de reciclagem da bactéria (38). Porém, a permanência de algumas toxinas do Bti no ambiente pode aumentar a pressão de seleção contribuindo para o surgimento de resistência; outras questões de melhoria em relação ao Bti são a baixa persistência das atuais formulações em campo e o alto custo. Em relação aos IGRs, já existem indícios de resistência em populações de campo. Dessa forma, ambas as estratégias devem ser constantemente monitoradas (2,36).

Considerando o uso de larvicidas, o temefós foi o único empregado em campanhas de controle da dengue no Brasil desde 1967, tendo seu uso intensificado a partir de 1986, quando o DENV-1 se espalhou pelo país (29,35). Como consequência do uso prolongado, populações resistentes a este inseticida se disseminaram pelo país (1,30). Mesmo após a suspensão do uso em 2009, populações brasileiras de *A. aegypti* coletadas em 2012 ainda apresentaram alteração na suscetibilidade a este organofosforado (29). Além disso, não se pode descartar a importância do uso doméstico de piretróides na seleção dos altos índices de resistência a este inseticida nas populações brasileiras de *A. aegypti* (29).

Diante da situação crítica em relação aos altos níveis de resistência de populações naturais de *A. aegypti* frente aos inseticidas neurotóxicos disponíveis no mercado, fica evidente a necessidade do desenvolvimento de novos produtos com ação inseticida (1). Além disso, o controle químico não deve se apoiar em apenas uma ferramenta, mas sim em abordagens combinadas, garantido o sucesso a longo prazo (32).

### 1.5– Óleos Essenciais

Uma alternativa aos inseticidas neurotóxicos clássicos são os inseticidas botânicos. Inúmeros compostos vegetais apresentam atividade inseticida, de inibição do crescimento ou ação repelente contra diversos artrópodes vetores, incluindo *A. aegypti* (39–41). Além disso, dentre os benefícios que tornam

atraente a exploração de produtos à base de plantas como inseticidas para o controle de insetos estão a pouca ou nenhuma toxicidade para mamíferos e as diferentes formas de ação sobre o organismo do inseto, tornando o desenvolvimento de resistência mais complexo (39,42).

Os óleos essenciais (OE) são misturas químicas complexas de metabólitos secundários de plantas que podem conter entre 20 a 60 componentes em diferentes concentrações. Os OEs são normalmente voláteis, lipofílicos, de baixo peso molecular e com propriedades normalmente definidas pelos seus compostos majoritários (40,43). São constituídos principalmente de monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanóides, metabólitos que frequentemente conferem odor agradável e marcante, sabor e textura (43,45,46). Atualmente são amplamente utilizados na indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica (41).

Tais compostos são produzidos pelas plantas como proteção contra a atividade predatória de insetos e no combate a microrganismos patogênicos (40), desempenhando papel como antimicrobianos e antivirais. São conhecidos OEs de cerca de 3.000 espécies vegetais distribuídas em um número limitado de famílias como Myrtaceae, Lauraceae, Rutaceae, Lamiaceae, Asteraceae, Apiaceae, Cupressaceae, Poaceae, Zingiberaceae e Piperaceae (41,44). Diversas partes da planta podem ser utilizadas para a extração dos óleos, sendo flores, folhas, casca, rizoma e frutos as mais usadas (45). A extração ocorre comumente através das técnicas de arraste a vapor, hidrodestilação ou prensagem a frio do pericarpo dos frutos cítricos (47,48), mas também existem outros métodos como enfloração, solventes orgânicos apolares e a extração por CO<sub>2</sub> supercrítico, este último muito usado na indústria (43).

#### 1.5.1– Óleos Essenciais e sua aplicação no controle de insetos

Recentemente, os OEs têm surgido como uma alternativa aos inseticidas químicos pois constituem uma rica fonte de compostos bioativos com potencial ação inseticida. São conhecidos pela sua natureza lipofílica, interferindo no metabolismo basal e em funções fisiológicas, bioquímicas e comportamentais dos insetos (49,50). Diversos estudos já comprovaram a

atividade ovicida e inseticida dos OEs contra várias espécies de insetos (50,51). Por exemplo, Cheng et al., 2003 (39) demonstraram que, dentre 14 OEs analisados, nove demonstraram toxicidade contra larvas de *A. aegypti* ( $CL_{50} < 100$  mg/L). Além disso, o OE de plantas do gênero *Cymbopogoni*, como a citronela e o capim-limão, são ingredientes de repelentes de aplicação tópica devido à sua baixa toxicidade e eficiência comprovada (52).

Dias e Moraes, 2014 (53) compilaram a atividade larvicida de centenas de OEs contra *A. aegypti* e discutiram critérios baseados em concentrações letais para classificar a atividade larvicida destes compostos. Os óleos que apresentarem concentração letal 50% ( $CL_{50}$ ) superior a 100 mg/L devem ser considerados não ativos. Para serem considerados ativos, os óleos devem apresentar  $CL_{50}$  inferior a 100 mg/L e altamente ativos quando os valores de  $CL_{50}$  forem inferior a 50 mg/L (39). Dentro dos 361 OEs citados, mais de 60% foram classificados como ativos segundo este critério. Entre os OEs classificados como altamente ativos, estão espécies de plantas pertencentes às famílias Mirtaceae (13,5%), Lamiaceae (10,5%) e Rutaceae (8,2%). Os OEs mais ativos foram os das espécies *Callitris glaucophylla* ( $CL_{50} = 0,69$  mg/L) e *Juniperus virginiana* L. (cedro-vermelho) ( $CL_{50} = 1$  mg/L) (53).

Ainda é necessário definir os mecanismos de ação dos componentes majoritários dos OEs com maior atividade larvicida. Além disso, é importante estudar a interação e efeitos sinérgicos/antagônicos entre estes e os outros componentes minoritários dos OEs, visto que a bioatividade da mistura, em alguns casos, pode ser superior à atividade isolada dos compostos purificados, sugerindo sinergismo e diversos mecanismos de ação para os componentes dos OEs (39,53,54).

A maioria dos monoterpenos, constituintes notáveis dos OEs, são tóxicos para os insetos e podem penetrar no corpo por meio do sistema respiratório, pela cutícula ou por ingestão. Vários deles, como o eugenol,  $\alpha$ -terpenol e L-carvol, possuem efeitos neurotóxicos, provocando hiperatividade nos insetos, com alongamento de pernas seguido de paralisia e morte (52). Óleos essenciais de plantas como a camomila-romana (*Chamaemelum nobile*), camomila marroquina

(*Ormenis multicaulis*) e a sálvia (*Salvia chionantha*), entre outras, possuem a capacidade de inibir a AChE, porém, a atividade de seus componentes isolados ainda precisam ser melhor compreendidos (55).

Outro possível alvo dos OEs são os receptores de octopamina, molécula multifuncional em invertebrados, presente no sistema nervoso, células neuroendócrinas e hemolinfa, que pode atuar como neurotransmissor, neuro-hormônio e neuromodulador. A octopamina está envolvida na regulação de diferentes atividades do inseto como a excitação; desempenha importante papel na resposta ao estresse e no comportamento social. Os óleos essenciais interagem com os receptores de octopamina, agindo principalmente como agonistas desses receptores (52,55). Também já foram descritos OEs que modificam os receptores de GABA, reduzindo a inibição neuronal, o que leva à hiperexcitação do sistema nervoso central e convulsões, seguidas da morte do inseto (39,51,55).

Uma vez que os inseticidas empregados atualmente em programas de controle de dengue também possuem efeitos neurotóxicos (1), entender o espectro de ação dos OEs no organismo dos insetos-alvo pode ser crucial para o desenvolvimento de inseticidas naturais (55). É de grande relevância também que ensaios com populações de campo, com diferentes níveis de resistência a vários inseticidas químicos, como o temefós e piretróides, sejam realizados, visto que populações provenientes de campo são mais adaptadas a variações ambientais e possuem maior variabilidade genética (56,57); sendo assim, os resultados podem diferir dos ensaios com linhagens suscetíveis, normalmente confinadas ao laboratório.

#### 1.5.2 – Óleo Essencial de frutas cítricas

As frutas cítricas (família Rutaceae) são originárias dos países asiáticos e foram introduzidas no Brasil, provavelmente na Bahia, pelas primeiras expedições colonizadoras. Seu cultivo se expandiu por todo país e ganhou tamanha importância de forma que hoje a citricultura brasileira detém a liderança mundial. O gênero *Citrus* inclui cerca de 17 espécies, sendo as laranjeiras, as

tangerineiras, as limeiras ácidas e os limões verdadeiros os principais tipos de citrinos cultivados no Brasil (58,59).

Estudos anteriores testaram a atividade inseticida do OE de várias espécies cítricas contra larvas de *A. aegypti*. Diversas espécies vegetais frequentemente apresentaram efeito larvicida. No estudo realizado por Hafeez et al, 2011 (57), o OE extraído de uma variação selvagem cítrica foi a variedade mais efetiva, com resultado significativamente diferente (354.23 ppm) se comparado aos demais óleos testados cujos resultados variaram entre 850,79 e 1.406,95 ppm, em ensaios de 24h de exposição (60).

Os limonóides, fitoquímicos triterpenóides, encontrados em abundância principalmente em plantas cítricas, mas que também podem ser encontrados em outras plantas das famílias Rutaceae e Meliaceae, têm atraído a atenção devido a sua atividade reguladora do crescimento de insetos (60–63). Ademais, são efetivos contra estágios imaturos de *Culex quinquefasciatus* (63), além de afetarem negativamente o desenvolvimento dos ovos devido a perturbações nutricionais (60).

### 1.5.3 – Microencapsulamento de OE em células de levedura

Apesar do potencial dos OEs como larvicidas contra insetos vetores de patógenos, como *A. aegypti*, a sua utilização em campo ainda enfrenta algumas dificuldades, como a falta de especificidade de alvo e baixa resistência à radiação UV e pouca persistência em campo. Sendo assim, o microencapsulamento de OEs em células de levedura (*Saccharomyces cerevisiae* Meyenex E.C. Hansen, 1883) surge como uma possível solução para esses problemas (64–67). *S. cerevisiae* é um fungo unicelular, adotado na fabricação de pães e bebidas fermentadas, comumente utilizado como recipiente biocompatível e biodegradável para uma variedade de compostos exógenos (68).

Amplamente aplicada nas indústrias alimentícia, farmacêutica, cosmética e têxtil (64,65,69,70), a técnica de microencapsulamento consiste na incorporação de compostos ativos (partículas sólidas, líquidas ou gases) no

revestimento celular da levedura. O resultado é um produto mais resistente à radiação UV, calor e umidade, com maior prazo de validade e entregue de maneira mais controlada (67,70).

O microencapsulamento em levedura de pão já demonstrou sucesso em estabilizar diversas substâncias fotossensíveis ou oxidáveis e também em potencializar a biodisponibilidade de fármacos lipofílicos. Por exemplo, o encapsulamento do resveratrol, composto polifenólico não-flavonóide presente em vários produtos comestíveis como amendoim, coco e chocolate, em levedura aumentou em duas a três vezes a sua solubilidade em água, retardou a fotodecomposição e promoveu uma maior atividade antioxidante, características importantes para a sua aplicação (70). No caso do microencapsulamento de OEs com atividade larvicida, a levedura pode melhorar a durabilidade do inseticida no ambiente, além de ser eficientemente ingerida e digerida por larvas de mosquitos, aumentando a taxa de ingestão e especificidade do composto para o inseto alvo (65).

#### 1.5.4 – Óleo Essencial de Laranja Encapsulado em Levedura (OELE)

O OELE utilizado nos ensaios foi desenvolvido e produzido na Universidade do Novo México (EUA), instituição colaboradora no projeto (68). O óleo essencial (OE) usado no encapsulamento é um produto comercial de origem californiana, extraído por pressão a frio da laranja doce (*C. sinensis*) (Sigma-Aldrich, Inc, California, USA, código W282510).

O carregamento do OE de *C. sinensis* na levedura foi realizado através de um processo simples usando calor e agitação; os componentes utilizados para a síntese do larvicida são óleo essencial de laranja, levedura fresca e água, na proporção 1:5:16 em peso. Estes componentes foram agitados durante a noite a 40° C. A solução resultante foi centrifugada e o sobrenadante foi descartado baseado em um processo já existente para a remoção do excesso de óleo essencial no exterior das partículas de leveduras, depois congelado e liofilizado. As amostras de larvicida foram reidratadas antes do uso (68).

Em testes preliminares com linhagens de laboratório de *A. aegypti* (Liverpool e Rockefeller), o OELE obteve alta atividade (CL<sub>50</sub><50 mg/L) contra larvas de todos os estádios. Porém, para a integração futura deste no controle de *A. aegypti*, é necessário avaliar a atividade larvicida em populações de campo, visto que são mais adaptadas a variações ambientais, são comumente resistentes aos inseticidas neurotóxicos clássicos e possuem maior variabilidade genética (56,57).

#### 1.6– Arboviroses em Belo Horizonte

Os primeiros registros de casos de dengue em Belo Horizonte datam de 1996 e configuraram a primeira grande epidemia da doença na região norte da cidade. No início de 1997, ocorreu uma nova epidemia e até então o único sorotipo circulante era o DENV-1. Contudo, no final desse mesmo ano e início de 1998, deu-se início a uma nova epidemia com co-circulação dos sorotipos DENV-1 e DENV-2 (71–73). Sucessivas epidemias ocorreram na cidade, causadas por esses dois sorotipos, até que, em 2002, ocorreu o isolamento do DENV-3 (73). A introdução do sorotipo DENV-4 ocorreu em meados de 2012, sendo o principal causador da grande epidemia de 2013 em várias cidades brasileiras, incluindo Belo Horizonte (14). Até julho de 2019, houve registro de 105.934 notificações de dengue em Belo Horizonte com 12 óbitos confirmados (93).

O ZIKV foi identificado em Belo Horizonte pela primeira vez em dezembro de 2015, havendo nesse ano a confirmação de quatro casos. Todos estes casos confirmados pertencem à Regional Pampulha e também nesta regional foram registrados os primeiros casos autóctones do município. No ano seguinte, foram registrados 1531 casos suspeitos de Zika, sendo 582 em gestantes.

Já o primeiro caso confirmado de chikungunya em Belo Horizonte ocorreu em 2014, sendo confirmado como caso importado. Os primeiros casos confirmados como autóctones foram registrados no ano de 2016. Assim, entre os anos de 2014 e 2017, foram notificados 469 casos suspeitos, sendo 33,9% desses confirmados. Até o mês de maio de 2019, foram notificados 279 casos

suspeitos distribuídos nas nove regionais do município e, desses, 45 casos foram confirmados (74).

## 2 - JUSTIFICATIVA

A saúde humana em regiões tropicais e subtropicais do mundo é constantemente ameaçada pela presença de arbovírus como dengue, Zika e chikungunya. Ademais, esses arbovírus geram acentuado impacto socioeconômico devido à debilitação dos pacientes infectados e o elevado grau de absenteísmo às atividades laborais. As epidemias causadas por estes arbovírus estão intimamente relacionadas à disseminação do seu vetor primário, o *A. aegypti*.

Este mosquito é adaptado ao ambiente urbano, onde se alimenta de sangue predominantemente no homem (75) e deposita seus ovos em recipientes artificiais, tais como caixas d'água, pneus, potes plásticos e ralos (4,13). Nesse cenário, fatores como a ocupação desordenada de espaços urbanos e a precariedade das condições sanitárias favorecem a proliferação de *A. aegypti* e, conseqüentemente, a transmissão de arbovírus.

Na ausência de terapia específica e de vacinas amplamente disponíveis para a população contra DENV, ZIKV e CHIKV, a redução da ocorrência das arboviroses causadas por estes vírus deve ocorrer especialmente através do controle do *A. aegypti*, mantendo-o numa densidade insuficiente para provocar epidemias (76). Para tal, inseticidas químicos neurotóxicos foram utilizados de forma contínua e muitas vezes indiscriminada, seja por instituições governamentais e/ou pela própria população, o que culminou na seleção de populações de *A. aegypti* resistentes a estes compostos (77). Sendo assim, o desenvolvimento de novos produtos com ação inseticida, sobretudo que associem facilidade de aplicação, eficiência e baixo impacto ambiental, é objeto de grande interesse atualmente.

Recentemente, demonstrou-se que os OEs, produzidos pelas plantas para proteção contra predação e infecção por microorganismos, são uma rica fonte de compostos bioativos com ação inseticida comprovada contra diversas espécies de insetos, incluindo o *A. aegypti*. Além disso, os OEs são produtos

biodegradáveis e de baixa ou nenhuma toxicidade aos mamíferos; dessa forma, os danos ambientais são menores quando comparados aos inseticidas químicos.

Porém, a utilização dos OEs para o controle de vetores sofre dificuldades como a falta de especificidade de alvo e a baixa resistência dos óleos à radiação UV. Sendo assim, o microencapsulamento destes em células de levedura (*S. cerevisiae*) surge como uma possível solução para estes problemas. Além disso, existe ainda a premente necessidade de avaliar a eficiência dos OEs como agentes larvicidas contra diferentes populações naturais de *A. aegypti*, potencialmente resistentes aos inseticidas neurotóxicos clássicos.

Assim, este estudo pretende avaliar a atividade larvicida do OE de *C. sinensis* encapsulado em células de levedura contra população de *A. aegypti* de Belo Horizonte, cuja resistência aos inseticidas temefós e deltametrina já foi reportada (78) e também a influência desse composto sobre o comportamento de oviposição de fêmeas grávidas. Por fim, este estudo também pretende avaliar a estabilidade do OELE em condições de semi-campo, visto que larvicidas podem sofrer alteração em sua atividade devido à exposição a fatores ambientais como alterações de temperatura e iluminação natural.

### 3 - OBJETIVOS

#### 3.1 - OBJETIVO GERAL

Testar a estabilidade, a atividade larvicida e a influência sobre comportamento de postura de *A. aegypti* do óleo essencial da laranja encapsulado em célula de levedura (OELE).

#### 3.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

I – Estabelecer estrutura para criação de larvas de *A. aegypti* e realização de bioensaios com OELE na Regional Nordeste, ponto de apoio da Zoonoses – ZOO2, da Prefeitura de Belo Horizonte;

II – Avaliar a estabilidade do OELE em laboratório e em condições de semi-campo no município de Belo Horizonte/MG;

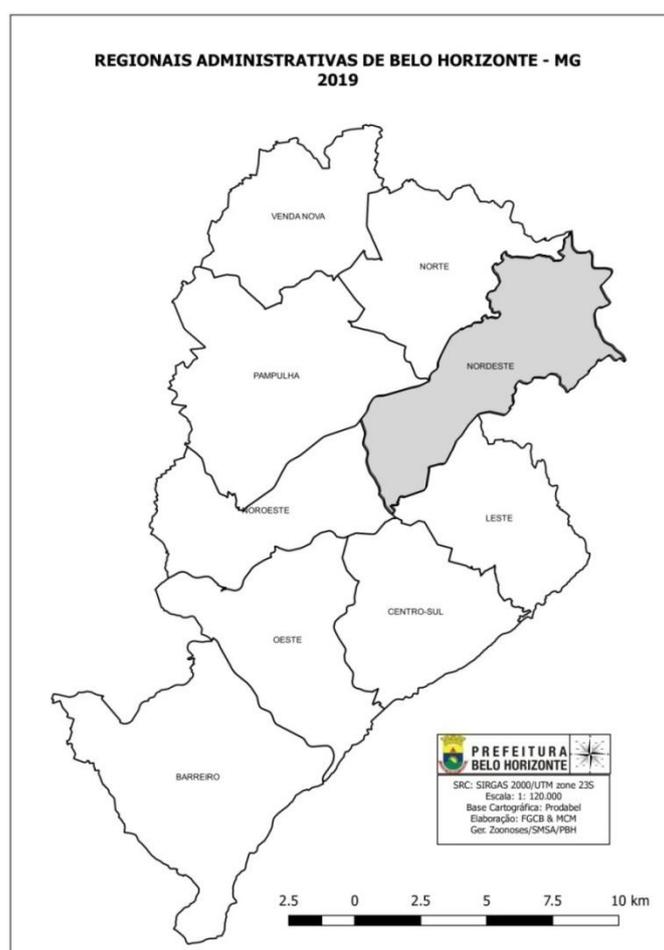
III – Analisar a atividade larvicida do OELE em uma linhagem de *A. aegypti* susceptível a inseticidas (Rockefeller) e em uma população resistente aos inseticidas deltametrina (PY) e temefós (OP) (Belo Horizonte/MG);

IV – Analisar a influência do larvicida sobre o comportamento de oviposição de fêmeas de *A. aegypti*.

## 4 – METODOLOGIA

### 4.1 - Área de estudo:

O estudo foi realizado na sede da Regional Nordeste do município de Belo Horizonte (BH; 19°49'13"S; 43°55'06"W), capital do Estado de Minas Gerais. Essa cidade conta com uma população de aproximadamente 2,5 milhões habitantes em 331,4 Km<sup>2</sup> de área. Em 1983, o município foi subdividido em nove regionais administrativas levando em conta a posição geográfica e a história de ocupação (73). Os nossos estudos foram realizados com *A. aegypti* coletados na Regional Nordeste de BH, terceira regional com maior extensão territorial.



**Figura 1:** Belo Horizonte possui 331,4 Km<sup>2</sup> distribuídos entre nove regionais administrativas. Destaque para a Regional Nordeste, regional escolhida para a realização dos ensaios. Os ovos utilizados nos ensaios com a população de Belo Horizonte pertencem ao programa de monitoramento e vigilância de ovitrampas desta regional.

Belo Horizonte possui temperaturas médias mensais entre 18°C e 27°C e índices pluviométricos superiores a 1.300 mm por ano (73). Este clima, aliado aos desafios de infraestrutura e saneamento básico de grandes metrópoles, contribui para a ocorrência de *A. aegypti* e a manutenção do ciclo de transmissão de arbovírus na cidade. Sendo assim, epidemias de arboviroses de variadas magnitudes ocorrem em Belo Horizonte, independentemente de todos os esforços de controle do vetor (14,73).

Três Agentes de Controle de Endemias receberam treinamento para a colaboração com os testes do larvicida realizados no laboratório ZOO2. A dedicação semanal da equipe colaboradora do projeto foi acordada com a chefia imediata.

#### 4.2 - Mosquitos *A. aegypti* utilizados nos ensaios:

Para realização dos bioensaios de avaliação da atividade do OELE, foi estabelecida no LATHEMA/IOC uma colônia de *A. aegypti* da população de Belo Horizonte a partir de ovos coletados no campo. Os ovos foram coletados quinzenalmente através da instalação de ovitrampas com infusão de capim colônia (*Panicum maximum*) como parte do programa de controle/monitoramento da infestação vetorial no município. Belo Horizonte conta com cerca de 1780 armadilhas instaladas quinzenalmente ao longo do ano. As ovitrampas são espaçadas em pelo menos 200 m de distância, conferindo a cobertura de praticamente 100% de toda área urbanizada da cidade. Após a coleta, as paletas são encaminhadas ao Laboratório de Entomologia do município para análise dos índices de positividade e densidade de ovos.

No âmbito do programa de controle/monitoramento de infestação vetorial do município, a Regional Nordeste possui instalação quinzenal de 202 armadilhas distribuídas em toda extensão territorial. Para o desenvolvimento do presente projeto, foram encaminhadas ao Laboratório de Mosquitos Transmissores de Hematozoários (LATHEMA), Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz, 404 paletas referentes às instalações realizadas nas semanas epidemiológicas

02 (08 a 12 de janeiro de 2018) e 04 (22 a 26 de janeiro de 2018), com cerca de 24.000 ovos.

Os ovos das paletas foram postos para eclodir em bacias plásticas retangulares (33 X 24 X 8 cm) contendo 3L de água desclorada e 01 comprimido de 0,5 g de *S. scerevisae*. As larvas foram separadas em grupos de 500 indivíduos e criadas em bacias similares, recebendo como alimento 0,05g de ração de peixe comercial (Tetramin) por dia. Na fase de pupa, os mosquitos foram transferidos para copos plásticos e colocados em gaiolas teladas (30 x 25 x 25 cm), onde foram mantidos até a emergência dos adultos. Os adultos receberam alimentação açucarada a 10% *ad libitum*. Após a emergência dos adultos, foi realizada a triagem por espécie. Os adultos identificados como *A. aegypti* foram dispostos em gaiolas para cópula, realização da alimentação sanguínea (sangue humano doado pelos pesquisadores responsáveis pelo projeto, e recolhido por profissionais de saúde habilitados, em alimentador artificial) e obtenção de ovos de novas gerações. Os ovos da geração F1 foram armazenados até o momento da realização dos testes de atividade larvicida.

Para os ensaios controle de atividade larvicida, ensaios de estabilidade no semi-campo e influência no comportamento de oviposição, foi utilizada a linhagem Rockefeller de *A. aegypti*, estabelecida originalmente em 1959 no Instituto Rockefeller (Nova York, EUA) (79). Esta linhagem foi incluída em todos os nossos ensaios como linhagem padrão de susceptibilidade a inseticidas (80) e foi cedida pelo Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores (LAFICAVE) do Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz.

#### 4.3 - Bioensaios para determinação da atividade larvicida do OELE:

Para realização dos bioensaios com larvicidas, uma sala disponibilizada pela Prefeitura de Belo Horizonte no ponto de apoio da Gerência de Zoonoses Nordeste (ZOO2) foi estruturada e equipada, sendo localizada na rua Maria Aparecida, número 120 – Bairro São Marcos, em Belo Horizonte. Dez concentrações do OELE, previamente selecionadas para causar a mortalidade de 10 a 95% das larvas de *A. aegypti* da população de Belo Horizonte e da linhagem Rockefeller, foram utilizadas nos ensaios de atividade larvicida

realizados no Laboratório ZOO2. Os bioensaios do tipo dose resposta para a determinação das concentrações letais (CL) do larvicida foram realizados em condições variáveis de luminosidade e temperatura. Aproximadamente 25 larvas em estágio L3 ( $\approx 3$  dias após eclosão) foram dispostas em copos plásticos e expostas a 100 mL de solução de OELE nas diferentes concentrações. As larvas do controle negativo receberam partículas de levedura que não foram tratadas com o óleo essencial, e que foram inativadas por exposição a calor (30 minutos a 60°C). A mortalidade foi registrada após 24 horas. Em cada ensaio foram utilizados quatro copos por concentração de OELE e quatro copos de controle negativo. Os bioensaios foram repetidos pelo menos três vezes para as populações de Belo Horizonte e Rockefeller.

As curvas de dose-resposta e as concentrações letais ( $CL_{50}$ ,  $CL_{90}$  e  $CL_{95}$ ) foram determinadas por uma regressão logística (modelo linear generalizado, modelo “logit”) implementada em R no Rstudio – Version 1.1456 (2009-2018 Rstudio.inc). A razão de resistência (RR) da população de Belo Horizonte foi calculada dividindo as suas concentrações letais pelos valores obtidos para a linhagem susceptível de referência (Rockefeller).

#### 4.4 - Estabilidade do OELE em condições de semicampo:

Esta etapa do projeto também foi realizada no Laboratório ZOO2. A estabilidade do OELE foi testada em ensaios de semicampo utilizando larvas L3 com três dias pós-eclosão de *A. aegypti* da linhagem Rockefeller. A atividade larvicida das partículas de OELE foi avaliada semanalmente em reservatórios plásticos com capacidade de armazenamento de 10L, dispostos em ambiente parcialmente exposto à luz do sol na área externa da ZOO2 (Figura 2 e 3). No início de cada semana, os reservatórios experimentais recebiam 160 mg/L e 280 mg/L; estas concentrações foram calculadas de acordo com os resultados de  $CL_{90}$  de ensaios prévios realizados com o OELE em laboratório para larvas L3 e L4 da linhagem Rockefeller e equivalem a 10 vezes os valores encontrados. Foram utilizados também dois reservatórios controle, sendo um preenchido com água e levedura não carregada com óleo essencial, inativada por calor e o outro com água e ração de peixe comercial (Tetramin, Tetra, Alemanha). A cada

semana, os quatro recipientes (dois controles e dois experimentais) eram dispostos na área externa da ZOO2 e o volume dos recipientes das semanas anteriores era avaliado, sendo completado com água caso observássemos redução no nível.

Os reservatórios foram identificados e ocluídos com telas de nylon a fim de evitar a eventual colonização por mosquitos de campo e outros insetos durante os ensaios (Figuras 2 e 3). No primeiro ensaio, os reservatórios ficaram expostos ao ambiente por até 14 dias e para os demais esse período sofreu uma adição de sete dias, portanto, a partir do segundo ensaio, os recipientes os recipientes ficaram expostos por até 21 dias. Ao final do tempo total de exposição, quatro alíquotas de 100 mL foram coletadas de cada reservatório. Vinte e cinco larvas em estágio L3 (3 dias de eclosão) da linhagem Rockefeller foram adicionadas a cada alíquota, cuja sobrevivência foi monitorada após 24 horas. Os cálculos de desvio padrão foram estabelecidos usando o Graph Pad Prism versão 6.04 (La Jolla California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)) e a mortalidade avaliada após 24 horas de exposição.

A estabilidade do OELE foi analisada entre outubro de 2018 e fevereiro de 2019, sob diferentes condições climáticas. No mês de outubro, a temperatura média foi 23,8°C e a umidade relativa do ar ficou em 67%. Em novembro, a média ficou em 22,1°C e a umidade em 78%. Já em janeiro e fevereiro, a temperatura média foi de 25,8°C e 24,6°C e a umidade de 64% e 78%, respectivamente. A temperatura máxima foi de 36,4°C em fevereiro.



**Figura 2:** Preparo dos ensaios realizados em ambiente exposto parcialmente à luz solar na área dos fundos do laboratório ZOO2. Os recipientes controles e experimentais eram expostos semanalmente e enfileirados. Todos os recipientes recebiam 10L de água filtrada e semanalmente havia o monitoramento e reposição de água para obtenção do nível inicialmente colocado. Imagem do ensaio de outubro de 2018.



**Figura 3:** Os recipientes ficavam protegidos de chuva e foram ocluídos com tela de nylon para evitar a colonização de moscas e mosquitos de campo. Da esquerda para a direita: recipientes experimentais OELE 160 mg/L, OELE 280 mg/L, recipientes controle levedura inativada e comida de peixe. Imagem pertence ao primeiro ensaio (outubro 2018), a partir dos próximos ensaios o recipiente controle com comida de peixe foi descartado. Os recipientes eram enfileirados conforme a semana de exposição, recipientes próximos da porta tinham 14 dias de exposição, a segunda fileira tinham sete dias e a última foi colocada no dia da coleta das amostras para a avaliação da estabilidade. Os próximos ensaios foram realizados por até 21 dias.

#### 4.5 - Influência do OELE no comportamento de oviposição:

Os ensaios para investigar o impacto do larvicida OELE na escolha do local de oviposição por fêmeas do mosquito *A. aegypti* (Rockefeller) foram realizados no laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Insetos (LABFISI), Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz. Os ensaios foram realizados em gaiolas teladas de 75 x 75 cm de base e 1,5 m de altura. Quatro armadilhas de ovos (ovitrampas) com 250 mL de suspensão de OELE ou água foram dispostas nos cantos de cada gaiola numa distribuição diagonal baseada nas duas condições em estudo: 1) duas armadilhas com OELE a 160 mg/L (10 x CL<sub>90</sub> mínima determinada para larvas L3, denominada condição OELE), e 2) duas armadilhas com água filtrada sem OELE (denominada condição ÁGUA) (Figura 4).

Com o intuito de minimizar possíveis interferências de interações sociais no comportamento de oviposição, uma única fêmea de *A. aegypti* foi utilizada por experimento. Cada fêmea foi previamente alimentada com sangue humano. Após três a quatro dias do repasto sanguíneo, as fêmeas foram colocadas na gaiolas, onde foram mantidas por 48 ou 72 horas, períodos estes escolhidos para a realização dos ensaios dependendo do experimento. No final de cada ensaio, as armadilhas foram retiradas das gaiolas para contagem dos ovos depositados nas paletas e na solução/água das armadilhas.

Foram realizados 15 ensaios para cada condição. As posições das armadilhas com OELE e ÁGUA foram alteradas aleatoriamente no início de cada teste para minimizar qualquer efeito da posição na escolha do local de postura de ovos pelas fêmeas. As gaiolas foram mantidas na mesma posição dentro do laboratório. Os resultados foram medidos através da identificação de ensaios positivos (com pelo menos um ovo encontrado em uma das armadilhas), pela comparação da presença e proporção de ovos em armadilhas OELE e ÁGUA, e também pelo substrato de escolha para deposição dos ovos (paleta ou solução/água).

A proporção de paletas, solução/água e armadilhas (paleta + solução/água) positivas e negativas para ovos de *A. aegypti* foi comparada entre as condições OELE e ÁGUA através de testes qui-quadrado, considerando a

duração dos ensaios (48 ou 72h). Já a mediana da quantidade de ovos encontrados nas paletas, solução/água e armadilhas (paleta + solução/água) foi comparada entre OELE e ÁGUA através de testes de Kruskal-Wallis, uma vez que estes dados não apresentam distribuição normal (teste Shapiro-Wilk, p-valor<0,001). O p-valor foi corrigido para testes múltiplos pelo método de Bonferroni. Estas análises foram realizadas em R (versão 3.3.3, R Development Core Team 2017).



**Figura 4:** Disposição das armadilhas dentro das gaiolas, a cada novo ensaio a posição das armadilhas era aleatoriamente alterada a fim de minimizar qualquer efeito da posição na escolha do local de postura de ovos pelas fêmeas. Duas armadilhas continham solução de OELE na concentração 160 mg/L e outras duas continham somente água. As gaiolas eram instaladas dentro do Labfisi-IOC em locais pré-determinados e permaneciam por 48 ou 72 horas. Ao todo foram instaladas 30 gaiolas, 15 para cada tempo de exposição.

Além disso, foi adotado o Índice de Atividade de Oviposição (IAO) (13) para analisar a preferência de oviposição das fêmeas em relação às armadilhas ÁGUA e OELE. Os valores de IAO variaram entre -1 e +1, nos quais índices positivos indicam a presença de substâncias que atraem ou estimulam a oviposição, enquanto que valores negativos sugerem a presença de compostos que repelem ou inibem a postura de ovos (13). O IAO pode ser obtido através da fórmula:

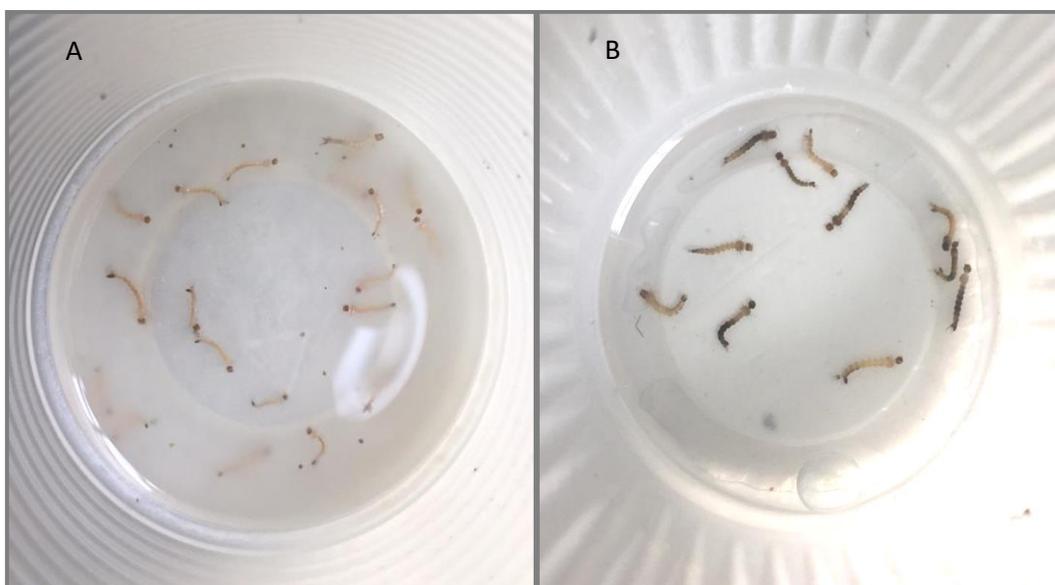
$$IAO = (N_e - N_c)/(N_e + N_c)$$

Onde  $N_e$  corresponde à média do número de ovos nas armadilhas experimentais (OELE neste estudo) e  $N_c$  é a média do número de ovos das armadilhas controle (13).

## 5 – RESULTADOS

### 5.1 - Bioensaios para determinação da atividade larvicida do OELE:

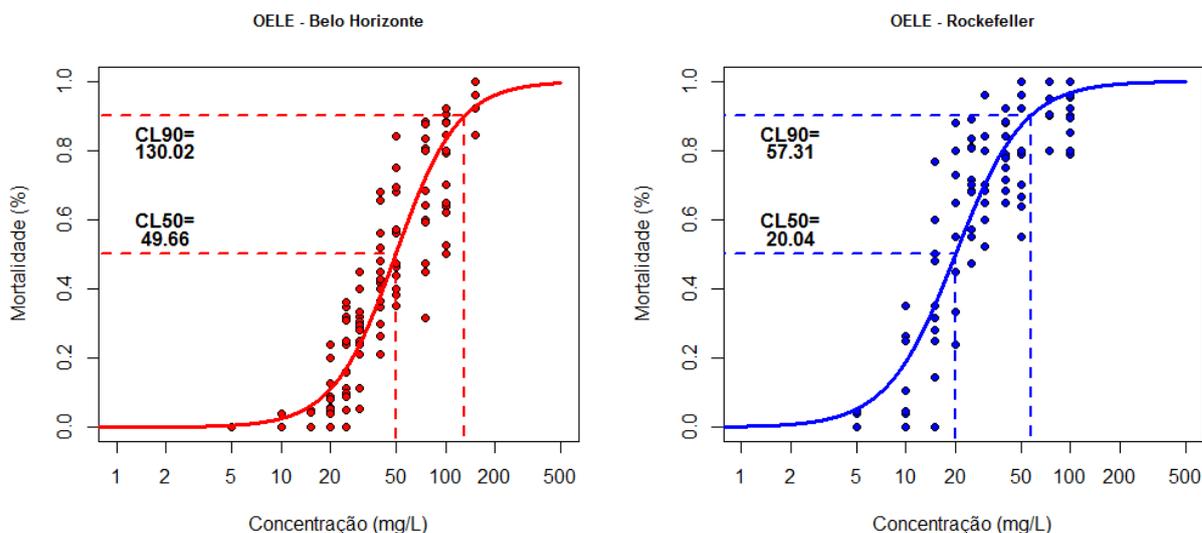
Após a exposição das larvas da população de Belo Horizonte e de Rockefeller a diferentes concentrações do OELE, notou-se que as larvas mortas apresentavam mudança de tonalidade no corpo. Nas concentrações mais baixas (ex. 10 a 40 mg/L), ocorreu o desbotamento do tecido cuticular (Figura 5A). Já nas concentrações mais altas (ex. 80 a 200 mg/L), a cutícula mostrava-se escura em quase todo o corpo da larva (Figura 5B). Além disso, as larvas que permaneciam vivas nas concentrações mais altas frequentemente apresentavam sinais de excitação e hiperatividade.



**Figura 5:** Alterações visuais observadas em relação a tonalidade cuticular de larvas mortas de *A. aegypti*, linhagem Rockefeller sob efeito do OELE após 24 horas de exposição a diferentes concentrações. Na figura A (recipientes com concentrações de 10 a 40 mg/L) houve o desbotamento cuticular e na figura B (recipientes com concentrações de 80 a 200 mg/L), ocorria o escurecimento da cutícula larval. Em larvas sobreviventes não eram observadas alterações na tonalidade cuticular.

As  $CL_{50}$  e  $CL_{90}$  para a população de Belo Horizonte exibiram valores superiores aos da linhagem Rockefeller. A população de campo exibiu  $CL_{50}$  de 49,66 mg/L e de  $CL_{90}$  de 130,02 mg/L, enquanto a linhagem de referência apresentou  $CL_{50}$  de 20,0 mg/L e  $CL_{90}$  de 57,3 mg/L (Figura 6, Tabela 1). Os valores de  $RR_{50-95}$  para a população de Belo Horizonte variaram entre 2,2 e 2,5;

estes resultados indicam maior vigor da população de Belo Horizonte em relação a linhagem de referência, Rockefeller (Tabela 1).



**Figura 6:** Gráficos de dose-resposta para determinação das concentrações letais (CL<sub>50</sub> e 90) para a população de *A. aegypti* de Belo Horizonte e a cepa Rockefeller. A população de Belo Horizonte apresentou resultados de CL<sub>50</sub> e 90 cerca de 2,2 a 2,4x superiores aos apresentados pela linhagem Rockefeller indicando maior vigor da população de campo em relação a linhagem de laboratório.

**Tabela 1:** Concentrações letais (CL<sub>50</sub>, 90 e 95) e respectivas razões de resistências (RR) calculadas a partir dos resultados dos bioensaios para determinação da atividade larvídica do OELE encontrados para as populações de Belo Horizonte e Rockefeller.

População	CL <sub>50</sub>	RR <sub>50</sub>	CL <sub>90</sub>	RR <sub>90</sub>	CL <sub>95</sub>	RR <sub>95</sub>
BH	49,66 (47,62 – 51,78)	2,5	130,01 (119,01 – 142,03)	2,3	180,36 (161,78 – 201,15)	2,2
Rockefeller	20,03 (19,03 – 21,08)		57,30 (52,48 – 62,57)		81,92 (73,16 – 91,73)	

\*Intervalo de confiança 95%.

## 5.2 - Estabilidade do OELE em condições de semicampo:

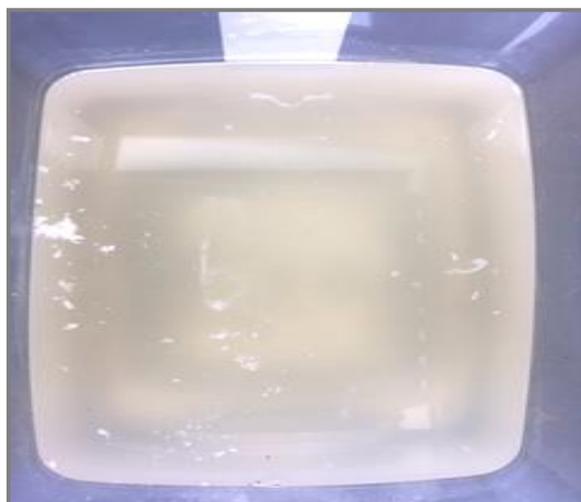
### 5.2.1 - Aspecto visual do OELE exposto ao ambiente:

Foi observada a formação de um material viscoso e de cor branca disperso em vários recipientes tratados com OELE a partir de sete dias de exposição ao ambiente. Esta característica foi mais evidente nos recipientes na concentração de 280 mg/L de OELE do que em recipientes de concentração menor ou em recipientes controle contendo levedura não encapsulada (figuras 7,8 e 9). Além disso, a cor e a tonalidade das soluções foram alteradas ao longo do tempo de exposição ao ambiente, visto que recipientes com 21 dias de exposição apresentavam uma tonalidade mais amarelada e odor característico de material em decomposição. Estas características também foram mais evidentes nos recipientes com a concentração de 280 mg/L de OELE.

Ao avaliar o odor dos recipientes, foi verificado que os controles apresentavam um odor mais intenso de material em decomposição, principalmente aquele com comida de peixe. Por apresentar uma degradação mais rápida que as outras condições, o recipiente com comida de peixe foi retirado após o primeiro ensaio, pois não funcionaria bem como controle. Nos recipientes com o larvicida OELE, o odor de material em decomposição se parecia com o odor do óleo essencial de laranja encapsulado. Além disso, o odor ficava mais evidente nos meses com maiores temperaturas (janeiro e fevereiro). Em relação à tonalidade, esta se alterou ao longo do tempo de exposição, ficando mais escura (Figura 10), porém não houve diferença entre os recipientes OELE e controle com levedura não encapsulada. Estas alterações foram observadas em todos os ensaios realizados, independentemente do período no qual o ensaio ocorreu.



**Figura 7:** Ensaios de análise de estabilidade do OELE em condições simuladas de campo. Resultados visuais demonstraram formação de material viscoso de cor branca em vários recipientes experimentais e controle (levedura não encapsulada), porém, os recipientes com OELE 280mg/L eram os que apresentavam material com maior consistência e em maior presença. Registro do ensaio de outubro de 2018, recipiente OELE 280 mg/L com 14 dias de exposição.



**Figura 8:** Mesma presença de material viscoso de cor branca era observada em recipientes com OELE na concentração de 160 mg/L porém em menor proporção, assim como nos recipientes contendo levedura não encapsulada. Este padrão de desenvolvimento foi observado em todos os bioensaios realizados.



**Figura 9:** Desenvolvimento de material viscoso de cor branca durante o ensaio de janeiro de 2019, recipiente OELE na concentração 280 mg/L com 21 dias de exposição. Nesse recipiente também era observada a alteração de tonalidade do OELE após a exposição em condições simuladas de campo.



**Figura 10:** Outra alteração visual encontrada durante os ensaios de análise da estabilidade do OELE em condições simuladas de campo foi em relação a diferença de tonalidade nos recipientes por tempo de exposição. Imagens do ensaio realizado em outubro de 2018, de baixo para cima, ensaios com <1, 7 e 14 dias de exposição. Da esquerda para direita, levedura, OELE 160mg/L, OELE 280 mg/L e comida de peixe, os recipientes com mais tempo de exposição apresentavam escurecimento das soluções.

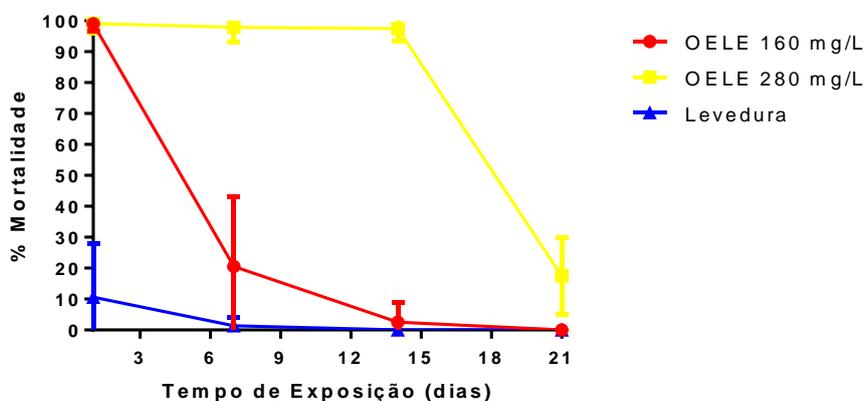
Embora todos os recipientes tenham sido ocluídos com tela, notou-se a colonização destes por pequenas moscas (não identificadas), cujos ovos eclodiram nas soluções. Este fato ocorreu principalmente nos recipientes-controle, nos quais as larvas permaneceram vivas. Já nos recipientes na concentração de 160 mg/L de OELE, havia uma menor quantidade de larvas vivas em relação ao controle e moscas mortas na solução. Nos recipientes com 280 mg/L de OELE, só constavam moscas mortas, em menor quantidade que nas demais condições.

#### 5.2.2 – Estabilidade do OELE em semicampo:

Na concentração de 160 mg/L de OELE, observou-se uma diminuição na mortalidade das larvas de 98% (24h de exposição, dado ensaios de atividade larvicida) para 23%, em média, após sete dias de exposição ao ambiente (Tabela 2). Após 14 e 21 dias, o OELE a 160 mg/L não apresentou mortalidade contra as larvas de *A. aegypti* (Rockefeller). Na concentração de 280 mg/L de OELE, a atividade larvicida permaneceu estável por até duas semanas, com mortalidade >95% nos bioensaios realizados com <1 dia, 7 dias e 14 dias de exposição. Após 21 dias de exposição, a atividade larvicida foi reduzida para 21% das larvas, em média (Tabela 2 e Figura 11). A mortalidade em leveduras não encapsuladas somente foi registrada nos ensaios com <1 dias e 7 dias de exposição, e os resultados foram de 5 e 0,6%, respectivamente.

**Tabela 2:** Análise da estabilidade do OELE em condições simuladas de campo com exposição por até 21 dias ao ambiente. O OELE na concentração 160 mg/L manteve a média de mortalidade próxima a 100% nos recipientes com <1 dia de exposição e o OELE na concentração de 280 mg/L manteve os índices próximos a 100% em ensaios de <1, 7 e 14 dias de exposição. Na tabela estão descritos também os valores de desvio padrão e percentis 25, 50 e 75 de cada solução avaliada. Foram realizadas três réplicas de cada ensaio.

Tempo de Exposição	Produto	Conc. OELE (mg/L)	Amostras	Mortalidade				
				Média	Desv. Padrão	Per 25	Per 50	Per 75
< 1 dia	OELE	160	12	98	3	98	100	100
	OELE	280	12	98	3	96	98	100
	Levedura	-	12	5	6	3	8	
7 dias	OELE	160	12	23	10	19	21	30
	OELE	280	12	97	6	97	100	100
	Levedura	-	12	0,6	1	-	-	1
14 dias	OELE	160	12	-	-	-	-	-
	OELE	280	12	96	4	95	97	98
	Levedura	-	12	-	-	-	-	-
21 dias	OELE	160	12	-	-	-	-	-
	OELE	280	12	21	4	20	21	22
	Levedura	-	12	-	-	-	-	-



**Figura 11:** Estabilidade do OELE em condições de semicampo com os respectivos desvio padrão.

### 5.3 - Influência do OELE no comportamento de oviposição:

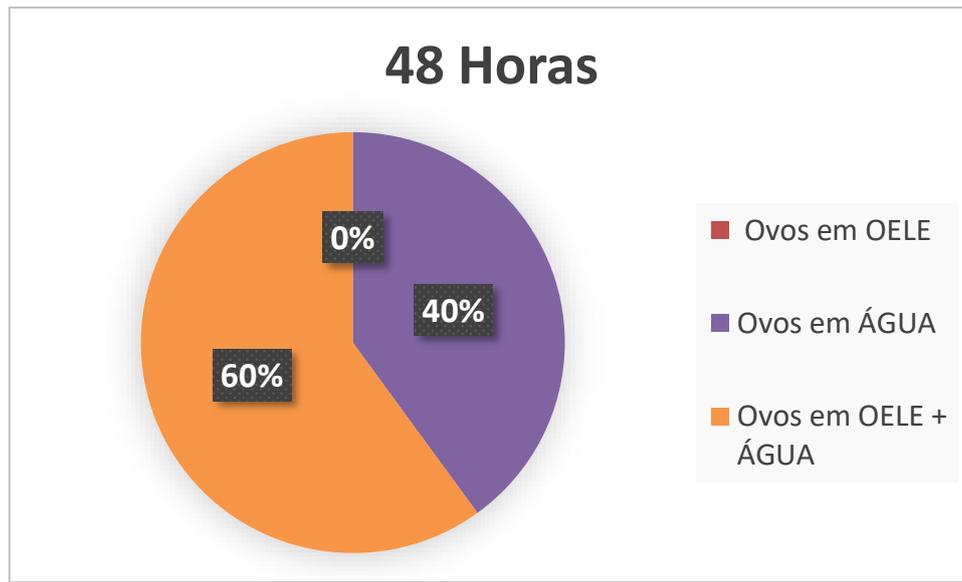
Foram realizados no total 30 ensaios de oviposição, 15 para cada tempo de exposição (48 e 72h) utilizando fêmeas de *A. aegypti* da cepa Rockefeller (tabela 3). Todas as gaiolas dos ensaios de 48 horas foram positivas para ovos (apresentaram pelo menos um ovo em qualquer uma das armadilhas), enquanto duas gaiolas nos ensaios de 72 horas foram negativas (sem postura de ovos).

As gaiolas negativas foram desconsideradas nas análises da influência do OELE no comportamento de oviposição de *A. aegypti*.

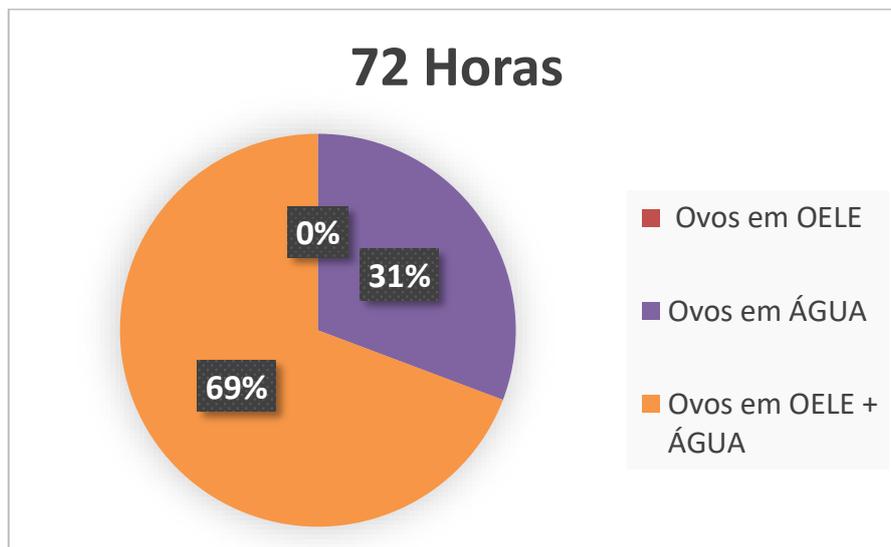
**Tabela 3:** Distribuição de gaiolas e armadilhas por tempo de exposição, ao todo foram instaladas 30 gaiolas. Duas gaiolas nos ensaios de 72 horas não apresentaram postura de ovos em nenhuma condição (OELE e ÁGUA).

Tempo de Exposição	Gaiolas Instaladas	Gaiolas Positivas (%)	Armadilhas Positivas (%)
48h	15	15/15 (100,0)	32/60 (53,3)
72h	15	13/15 (86,7)	35/60 (58,3)
Total	30	28/30 (93,3)	67/120 (55,83)

Considerando ambos os tempos de exposição e condições (ÁGUA ou OELE), mais de 55% das armadilhas estavam positivas para ovos de *A. aegypti*. Destas, 32 (53,3%) foram positivas nos ensaios de 48h e 35 (58,3%) nos ensaios de 72h (Tabela 3). Em relação à escolha da armadilha para postura dos ovos, a maioria das gaiolas apresentou ovos simultaneamente nas condições ÁGUA e OELE. Das 15 gaiolas dos ensaios de 48h, 9 (60%) gaiolas tinham ovos em armadilhas das duas condições, enquanto 6 (40%) gaiolas tiveram ovos exclusivamente em armadilhas ÁGUA. Nos ensaios positivos de 72h, identificamos nove (69%) gaiolas com ovos tanto em armadilhas OELE quanto ÁGUA. As quatro (31%) armadilhas restantes tinham ovos apenas em armadilhas ÁGUA. Nenhum dos ensaios apresentou ovos exclusivamente em armadilhas OELE (Figuras 12 e 13).



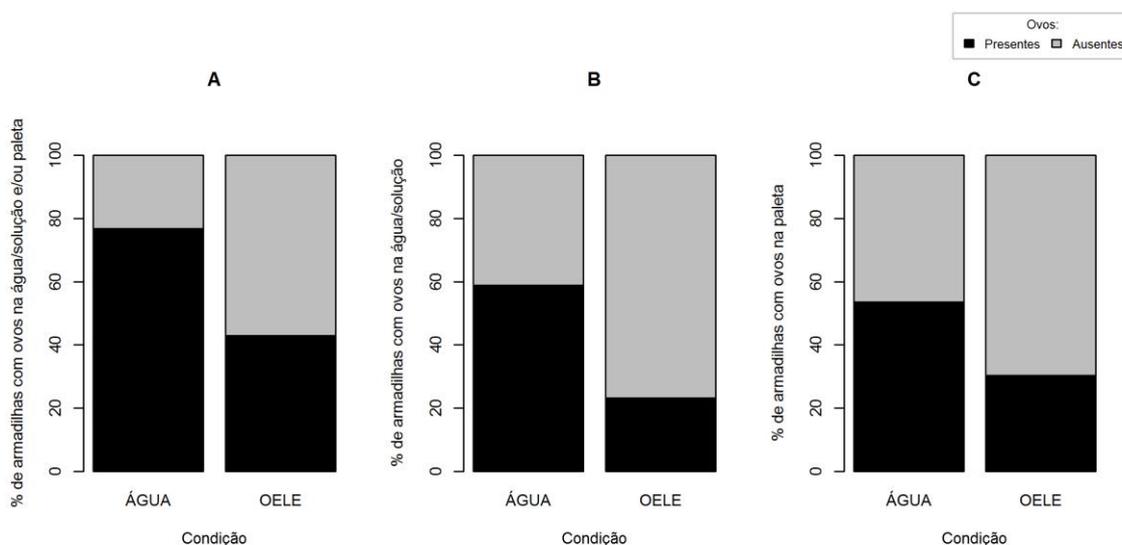
**Figura 12:** Análise de gaiolas com presença de ovos em ensaios de 48 horas de exposição das fêmeas. Não houve gaiola com presença de ovos somente em armadilhas OELE.



**Figura 13:** Análise de gaiolas com presença de ovos em ensaios de 72 horas de exposição das fêmeas. Não houve gaiola com presença de ovos somente em armadilhas OELE. Em duas gaiolas dos ensaios de 72 horas não houve postura de ovos.

Independentemente do tempo de exposição, as armadilhas ÁGUA apresentaram uma maior proporção de positividade do que armadilhas OELE, com 73,8 e 42,8% de presença de ovos, respectivamente ( $X_2 = 12,03$ , g.l. = 1, p-

valor = 0,001, Figura 14A). Considerando apenas os ovos depositados na solução de OELE ou na água da armadilha, a condição ÁGUA também mostrou maior positividade para ovos de *A. aegypti*, com 58,9% de armadilhas positivas para ovos contra 23,2% de OELE ( $X_2 = 13,32$ , g.l. = 1, p-valor < 0,001, Figura 14B). Contudo, o mesmo padrão não se repetiu para os ovos postos nas paletas, com positividade estatisticamente similar para as condições ÁGUA (53,6%) e OELE (30,3%) ( $X_2 = 5,28$ , g.l. = 1, p-valor = 0,06, Figura 14C).



**Figura 14:** Análise qualitativa de armadilhas com presença de ovos. Gráfico A representa a porcentagem de armadilhas com presença de ovos somados os locais de postura de ovos (solução/água e paleta), gráfico B porcentagem de armadilhas com presença de ovos na água/solução e gráfico C porcentagem de armadilhas com presença de ovos na paleta. Tempo de exposição somados (48 ou 72h).

O número de armadilhas ÁGUA positivas para ovos de *A. aegypti* foi de 21 (65,6%) para 48h e 22 (84,6%) para 72h, com uma distribuição relativamente semelhante entre os substratos de oviposição. Nos ensaios de 48h, 16 (53,3%) armadilhas exibiam ovos na paleta e 17 (56,7%) armadilhas com ovos na água, enquanto que, nos ensaios de 72h, 14 (53,8%) armadilhas com ovos na paleta e 16 (61,5%) armadilhas com ovos na água.

Para OELE, foram observadas 11 (36,7%) positivas nos ensaios de 48h e 13 (50%) para 72h. Em ensaios de 48h, nove (15%) armadilhas OELE tinham

ovos na paleta e apenas quatro (13,3%) armadilhas foram positivas para a solução. Por outro lado, o número de armadilhas positivas foi semelhante entre os substratos de oviposição nos ensaios de 72 h, sendo possível encontrar ovos em paletas de oito (30,8%) armadilhas e na solução de OELE em nove armadilhas (34,6%) (Tabela 4).

A proporção de armadilhas com ovos em ambos os substratos (P+S) oscilou entre 16,6% para armadilhas OELE (2 em 12 armadilhas) e 83% para armadilhas ÁGUA (10 em 12 armadilhas) em ensaios de 48h. Para ensaios de 72h, as armadilhas OELE tiveram uma maior proporção de armadilhas com ambos os substratos (P+S) (40%, 4 em 10 armadilhas) quando comparada aos dados de 48h. Já para as armadilhas ÁGUA, 60% delas foram positivas para ambos os substratos (P+S), porém, esse valor foi menor se comparado aos dos ensaios de 48 horas.

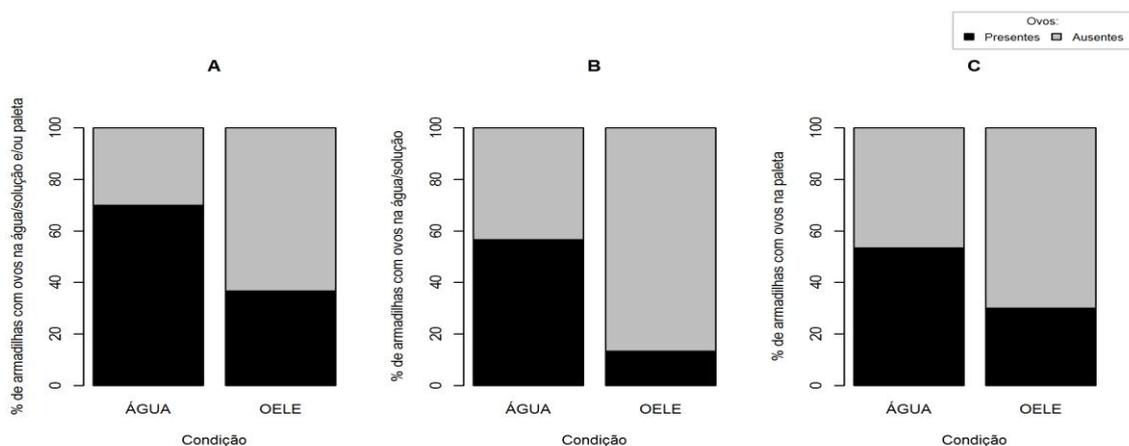
**Tabela 4:** Distribuição de ovos por tipo de substrato e tempo de exposição. P: paleta, S: solução. Os valores apresentados nos grupos P e S incluem as armadilhas registradas como P+S, que correspondem à intersecção entre os dois grupos de dados.

Tempo	Armadilhas	Armadilhas positivas			Substrato	Armadilhas positivas		
		Total (%)	OELE (%)	ÁGUA (%)		Total (%)	OELE (%)	ÁGUA (%)
48H	60	32 (53,3)	11 (34,3)	21 (65,6)	P	25 (78)	9 (36)	16 (64)
					S	21 (65)	4 (19)	17 (81)
					P + S	12 (37,5)	2 (16,6)	10 (83,3)
72H	52	35 (67,3)	13 (37,1)	22 (62,9)	P	22 (62,9)	8 (36,4)	14 (63,6)
					S	25 (71,4)	9 (36)	16 (64)
					P + S	10 (28,6)	4 (40)	6 (60)

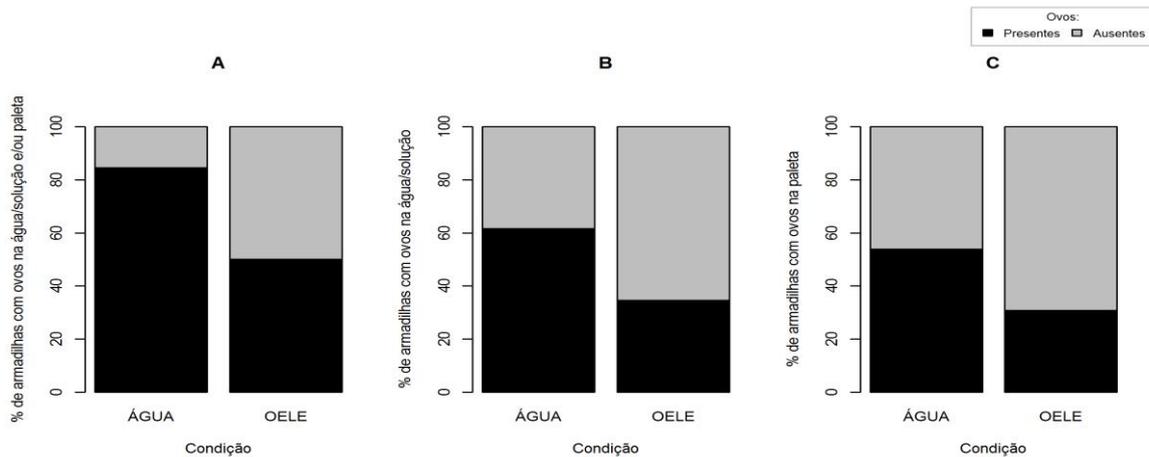
Considerando apenas os ensaios de 48h, não houve diferença estatisticamente significativa entre a positividade das armadilhas ÁGUA e OELE, das quais 70 e 36,7% exibiam ovos, respectivamente ( $X_2 = 5,42$ , g.l. = 1, p-valor = 0,06, Figura 15A). Porém, considerando apenas ovos depositados na solução de OELE ou na água da armadilha, a condição ÁGUA mostrou maior positividade

para ovos de *A. aegypti*, com 56,7% de armadilhas positivas para ovos contra 13,3% de OELE ( $X_2 = 10,55$ , g.l. = 1, p-valor = 0,001, Figura 15B). Contudo, o mesmo não se repetiu para os ovos postos nas paletas, com positividade estatisticamente similar para as condições ÁGUA (53,3%) e OELE (30%) ( $X_2 = 2,43$ , g.l. = 1, p-valor = 0,33, Figura 15C).

Para os ensaios de 72h, também não houve diferença estatisticamente significativa entre a positividade das armadilhas ÁGUA e OELE, das quais 84,6 e 50% exibiam ovos, respectivamente ( $X_2 = 5,59$ , g.l. = 1, p-valor = 0,05, Figura 16A). Considerando apenas ovos depositados na solução de OELE ou na água da armadilha, as condições ÁGUA e OELE demonstraram positividade para ovos de *A. aegypti* estatisticamente similar, com 61,5% e 34,6% de armadilhas positivas para ovos, respectivamente ( $X_2 = 2,77$ , g.l. = 1, p-valor = 0,28, Figura 16B). O mesmo foi registrado para presença de ovos nas paletas, com positividade estatisticamente indiferente para as condições ÁGUA (53,8%) e OELE (30,8%) ( $X_2 = 1,96$ , g.l. = 1, p-valor = 0,48, Figura 16C).



**Figura 15:** Análise qualitativa de armadilhas com presença de ovos. Gráfico A representa a porcentagem de armadilhas com presença de ovos somados os locais de postura de ovos (solução/água e paleta), gráfico B porcentagem de armadilhas com presença de ovos na água/solução e gráfico C porcentagem de armadilhas com presença de ovos na paleta. Resultados dos ensaios de 48 horas de exposição.



**Figura 16:** Análise qualitativa de armadilhas com presença de ovos. Gráfico A representa a porcentagem de armadilhas com presença de ovos somados os locais de postura de ovos (solução/água e paleta), gráfico B porcentagem de armadilhas com presença de ovos na água/solução e gráfico C porcentagem de armadilhas com presença de ovos na paleta. Resultados dos ensaios de 72 horas de exposição

Um total de 1.027 ovos foram contados nos 30 ensaios de oviposição realizados: i) 503 ovos foram contados nos ensaios de 48 horas, e ii) 524 ovos contados nos ensaios de 72 horas. A maioria dos ovos foi encontrada nas armadilhas da condição ÁGUA (83%) e nas paletas das armadilhas (66%).

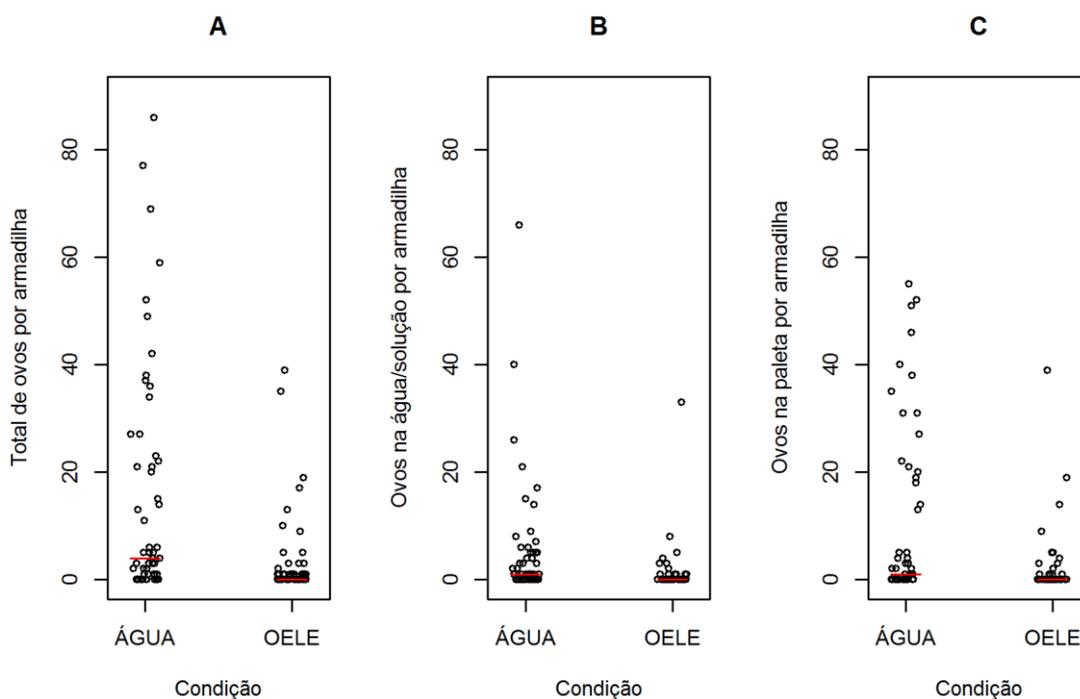
Realizamos análises estatísticas em relação ao número total de ovos depositados nas armadilhas; os cálculos foram realizados levando em consideração os resultados totais e também por tempo de exposição. Avaliamos também se houve alguma variação significativa em relação ao local de deposição dos ovos.

Ao avaliar o quantitativo de ovos depositados juntando os dois tempos de exposição (Fig. 17), observamos que o número de ovos depositados na condição ÁGUA foi superior ao quantitativo depositado na condição OELE ( $KW = 20,28$ , g.l. = 1,  $p\text{-valor} < 0,001$ ) e esse resultado se repete quando avaliamos em separado os ovos encontrados na solução/água ( $KW = 16,22$ , g.l. = 1,  $p\text{-valor} < 0,001$ ) e também para ovos depositados nas paletas ( $KW = 9,73$ , g.l. = 1,  $p\text{-valor} = 0,005$ ).

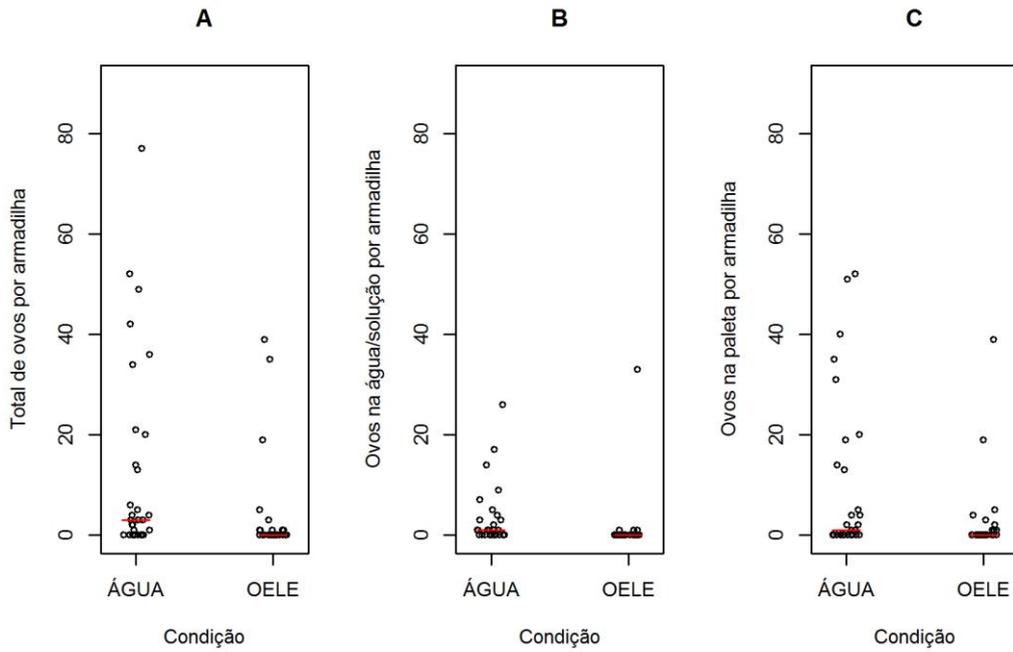
Para os ensaios com 48h de exposição (figura 18), o número de ovos nas armadilhas ÁGUA foi superior e esse resultado foi confirmado pela análise estatística ( $KW=8,80$ , g.l.= 1,  $p\text{-valor}=0,009$ ), o número de ovos encontrados na

solução também foi estatisticamente maior nas armadilhas ÁGUA ( $KW=12,47$ ,  $g.l.=1$ ,  $p\text{-valor}=0,001$ ), porém não houve diferença significativa quando avaliamos o quantitativo de ovos depositados nas paletas ( $KW=4,83$ ,  $g.l.=1$ ,  $p\text{-valor}=0,084$ ).

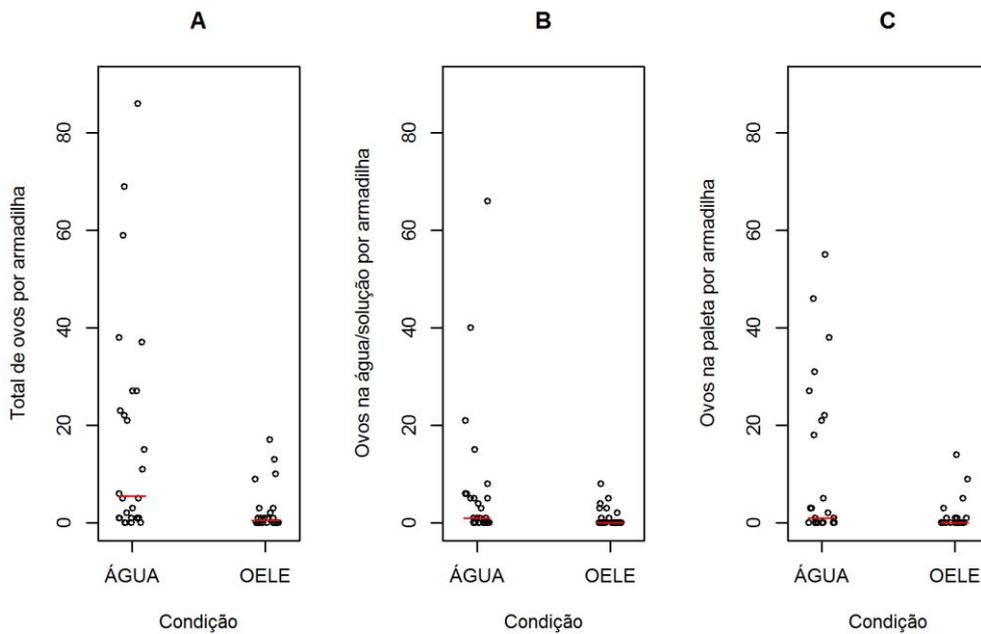
Quando avaliamos os resultados dos ensaios com 72h de exposição (figura 19), houve diferença significativa somente quando avaliamos o total de ovos depositados e esse foi superior na condição ÁGUA ( $KW=11,80$ ,  $g.l.=1$ ,  $p\text{-valor}=0,001$ ). Ao avaliar os resultados por substrato, encontramos resultados similares em ÁGUA e OELE em relação aos ovos encontrados na solução/água ( $KW=5,58$ ,  $g.l.=1$ ,  $p\text{-valor}=0,05$ ) e não observamos diferença significativa também para os ovos depositados diretamente nas paletas ( $KW=4,89$ ,  $g.l.=1$ ,  $p\text{-valor}=0,081$ ).



**Figura 17:** Análise quantitativa de ovos por armadilha. Gráfico A apresenta o número total de ovos nas armadilhas independentemente do substrato de postura (solução/água e/ou paleta). Gráfico B apresenta o número total de ovos na água/solução e não gráfico C apresenta o número de ovos nas paletas. Tempos de ensaio (48 ou 72h) somados. A linha vermelha representa a mediana.



**Figura 18:** Análise quantitativa de ovos por armadilha. Gráfico A apresenta o número total de ovos nas armadilhas independentemente do substrato de postura (solução/água e/ou paleta). Gráfico B apresenta o número total de ovos na água/solução e não gráfico C apresenta o número de ovos nas paletas. Ensaios de 48 horas de exposição. A linha vermelha representa a mediana.



**Figura 19:** Análise quantitativa de ovos por armadilha. Gráfico A apresenta o número total de ovos nas armadilhas independentemente do substrato de postura (solução/água e/ou paleta). Gráfico B apresenta o número total de ovos na água/solução e não gráfico C apresenta o número de ovos nas paletas. Ensaios de 72 horas de exposição. A linha vermelha representa a mediana.

Para os dois tempos de exposição, os índices de IAO calculados produziram resultados negativos, sendo -0,55 para os ensaios de 48h e -0,75 para os ensaios com 72h de exposição. Sendo assim, os resultados obtidos através do IAO indicaram que a presença do OELE nas armadilhas exerceu repelência ou inibiu a postura de ovos pelas fêmeas de *A. aegypti*.

## 6 - DISCUSSÃO

O presente estudo procurou avaliar a atividade larvicida do OELE contra duas populações distintas de *A. aegypti*. Foram testadas uma linhagem de mosquitos referência de susceptibilidade a inseticidas neurotóxicos (Rockefeller) e uma população de *A. aegypti* de campo, coletada no município de Belo Horizonte/MG e resistente aos inseticidas clássicos deltametrina e temefós (78). Além disso, também foram avaliadas a estabilidade do OELE contra larvas (Rockefeller) por até 21 dias em semicampo (ambiente parcialmente exposto à luz solar) e a influência deste no comportamento de oviposição de fêmeas grávidas de *A. aegypti* (Rockefeller) em laboratório. Para isso, estabelecemos estrutura para criação de larvas de *A. aegypti* e bioensaios com OELE no ponto de Apoio da Regional Nordeste.

O larvicida OELE foi considerado altamente ativo ( $CL_{50} < 50$  mg/L) contra *A. aegypti* das duas populações testadas no presente estudo. A população de Belo Horizonte apresentou valores superiores para  $CL_{50}$  (49,66 mg/L),  $CL_{90}$  (130,02 mg/L) e  $CL_{95}$  (180,36 mg/L) quando comparada à linhagem Rockefeller ( $CL_{50} = 20,04$  /  $CL_{90} = 57,3$  e  $CL_{95} = 81,92$  mg/L).

Pesquisadores do Paquistão realizaram um estudo com larvas entre 3° e 4° estádios de mosquitos da linhagem Rockefeller para analisar a atividade larvicida de OEs de 10 plantas, incluindo *C. sinensis* (81). Após a exposição das larvas por 24 horas, o óleo essencial de *C. sinensis* obteve o segundo melhor resultado com a  $CL_{50} = 20,61$  ppm, valor próximo ao encontrado em nosso experimento. Já Faraco et al, 2016 (82), avaliaram a atividade larvicida do OE de *C. sinensis* e *Syzygium aromaticum* (cravo-da-índia) isoladamente e em associação com temefós contra populações de *A. aegypti* resistentes do interior de São Paulo. O OE de *C. sinensis* apresentou valores de  $CL_{95}$  significativamente maiores para populações de campo do que para Rockefeller, diferentemente do resultado de *S. aromaticum* e das combinações desses OEs e temefós, nos quais não houve diferença significativa.

Os autores sugerem que o mecanismo de tolerância ao OE de *S. aromaticum* provavelmente difere dos mecanismos de resistência ao temefós,

pois não houve diferenças significativas entre as populações de campo e Rockefeller (susceptível a temefós). Em contraste, a maior tolerância ao *C. sinensis* apresentada pelas populações de campo avaliadas em relação a Rockefeller pode sugerir a existência de resistência cruzada (82). Partindo desse mesmo princípio, podemos sugerir que os mesmos mecanismos de resistência aos larvicidas clássicos podem estar relacionados à maior tolerância ao OELE mostrada pela população de *A. aegypti* de Belo Horizonte. Como o propósito desse trabalho não foi o de avaliar os mecanismos de ação do OELE e de resistência, essa hipótese precisa ser testada futuramente.

Segundo Dias e Moraes, 2014 (53), o critério baseado em valores de CL<sub>50</sub> é comum para avaliar a atividade de produtos naturais com potencial larvicida, no qual CL<sub>50</sub> inferiores a 50 mg/L caracterizam compostos altamente ativos contra os insetos testados. Porém, tratando-se de produtos naturais, os resultados disponíveis na literatura podem ser variados, mesmo que para compostos extraídos de uma mesma espécie de planta. Bilal et al, 2017 (81) avaliaram o potencial larvicida do OE de frutas cítricas de diferentes cultivos contra larvas L3 e L4 de uma população de campo de *A. aegypti* do Paquistão. As CL<sub>50</sub> variaram entre 213,02 e 457,30 ppm. A variabilidade dos valores CL<sub>50</sub> de *C. sinensis* contra *A. aegypti* observados neste e em outros estudos pode ser consequência do uso de diferentes populações de mosquitos e de plantas e/ou distintas metodologias de cultivo vegetal e extração dos OEs, que podem resultar em variações na composição dos óleos testados (82).

Diferentes habitats e pressões evolutivas também podem influenciar a maneira como um inseto responde à exposição a um composto inseticida. Larvas de mosquito provenientes de populações de campo podem apresentar maior tolerância do que larvas provenientes de populações criadas por muitas gerações em laboratório, visto que são mais adaptadas a variações ambientais e possuem maior variabilidade genética (56,57). Nossos resultados de atividade larvicida confirmaram essa informação visto que a população de Belo Horizonte respondeu diferente às concentrações do larvicida quando comparamos com os resultados da linhagem Rockefeller (Tabela 1).

Adicionalmente, observamos variações nas CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub> em estudos realizados com a mesma linhagem de *A. aegypti* (Rockefeller) e o mesmo larvicida, porém, realizados sob diferentes condições ambientais. Nos ensaios realizados previamente com o OELE em laboratório (LABFISI/IOC), os resultados foram de CL<sub>50</sub> = 5,6 - 10,4; CL<sub>90</sub> = 15,3 -21,0 mg/L (Workman, dados não publicados). Em nossos ensaios realizados em Belo Horizonte, nos quais havia variação de temperatura, as larvas de *A. aegypti* (Rockefeller) demonstraram de 2 – 2,5x mais tolerância ao OELE do que nos ensaios realizados no Labfisi-IOC. Assim, existe a hipótese de alteração do potencial larvicida do OELE sob condições variáveis de temperatura. Em razão disso, mais estudos devem ser realizados para verificar se oscilações de temperatura exercer influência no potencial larvicida do OELE.

Um outro fator que pode induzir diferentes toxicidades de um OE é o estágio no qual a larva do inseto se encontra (83). *Aedes aegypti* é um inseto com ciclo de vida holometabólico e, portanto, possui metamorfose completa, com quatro estádios larvais, um estágio de pupa, fase adulta e embrionária (ovo) (4). As larvas desenvolvem maior capacidade de desintoxicação e sofrem alterações na espessura da cutícula durante o crescimento e mudança de estágio, características que podem comprometer a eficácia do larvicida (53). Para a realização dos ensaios de estabilidade e de atividade larvicida, adotamos a utilização de larvas com três dias de eclosão, porém, observamos que o desenvolvimento da população de Belo Horizonte foi mais acelerado do que da linhagem Rockefeller; as larvas eram visivelmente maiores e mais robustas. Intuitivamente, podemos afirmar que uma melhor adaptação às variações de temperatura e umidade que ocorrem naturalmente sob condições simuladas de campo, podem contribuir no desenvolvimento das larvas e estas já se encontrarem em estágio mais avançado, deixando assim de filtrar elementos de entorno. Constatamos também que ainda é necessário avaliar a atividade larvicida do OELE com diferentes estágios de larvas de *A. aegypti* na linhagem de Belo Horizonte.

Nosso estudo revelou valores de RR<sub>50</sub>, 90 e 95 da população de *A. aegypti* de Belo Horizonte para o OELE de 2,5; 2,3 e 2,2, respectivamente. Já

nos experimentos conduzidos por Faraco et al, 2016 (82), as RR 50, 90 e 95 de populações naturais de *A. aegypti* para o OE de *C. sinensis* variaram de 1,1 a 2,3. Para que uma linhagem de mosquitos seja considerada suscetível a um inseticida, a razão de resistência 95% (RR<sub>95</sub>) deve ser inferior a cinco. Caso o resultado desse cálculo fique entre cinco e dez, essa linhagem é considerada moderadamente resistente. Já valores de RR<sub>95</sub> superiores a dez caracterizam a população como altamente resistente (84). No Brasil, a Rede de monitoramento da resistência de *A. aegypti* sugere a substituição do composto de campo quando a RR<sub>95</sub> deste inseticida seja superior a três (1).

Contudo, esses valores são usados como referência para inseticidas químicos neurotóxicos clássicos, com objetivo de preservar o inseticida antes que a resistência se estabeleça, inviabilizando definitivamente seu uso no campo (1). Levando em conta o mesmo ponto de corte adotado para os inseticidas químicos neurotóxicos, nossos resultados indicam que a população de Belo Horizonte é susceptível ao OELE.

Vale ressaltar que os OEs dos estudos anteriormente citados eram testados diretamente em solução, ao passo que no OELE o óleo essencial de laranja é microencapsulado em células inativas de levedura. Assim, é possível que o processo de encapsulamento do OE de laranja possa ter exercido alguma influência nos valores de CL encontrados e ressaltamos a necessidade de mais pesquisas dentro dessa hipótese.

Ferreira et al, 2015(85), desenvolveram e avaliaram um promissor sistema de gelificação *in situ* do OE de *C. sinensis* que, em contato com a água, passa por uma transição de fase que o torna altamente efetivo contra larvas de *A. aegypti*. As duas formulações avaliadas desse produto demonstraram valores de CL<sub>50</sub> de 5,93 e 6,55 ppm, valores próximos dos encontrados nos experimentos realizados em laboratório com OELE (CL<sub>50</sub> = 5,6 - 10,4 mg/L).

Durante nossos ensaios de atividade larvicida, observamos que as larvas sobreviventes à exposição ao larvicida tinham o movimento corporal alterado, sugerindo algum efeito neurotóxico do OELE. Alguns estudos sugerem que o efeito rápido de larvicidas naturais deve-se ao seu modo de ação

neurotóxico, similar aos organofosforados e carbamatos (41,54,86). Os sintomas da maioria das larvas tratadas com esses compostos naturais são excitação, convulsões, hiperextensão e hiperatividade, seguida por paralisia e morte (41,86).

Considerando os valores de CL<sub>50</sub> encontrados por Ferreira et al, 2015 e os resultados dos experimentos com OELE com populações de *A. aegypti* de laboratório e de campo, hipotetizamos que biolarvicidas contendo óleo essencial de laranja são promissoras alternativas para o controle de *A. aegypti*, com baixo custo, baixa toxicidade e altamente efetivos.

Nos experimentos nos quais avaliamos a estabilidade do OELE sob condições de semi-campo, o larvicida manteve atividade na concentração de 280 mg/L por até 21 dias e na concentração de 160 mg/L por até sete dias. Durante os primeiros 14 dias, com testes após 24h, sete e 14 dias de exposição ambiental, o potencial larvicida do OELE na maior concentração causou mortalidades de 98 a 96%. Porém, após os 21 dias de exposição, a atividade larvicida do OELE caiu para 21%. Apesar, das diferenças nos resultados das duas concentrações testadas, o período de persistência no ambiente com índices de mortalidade próximos a 100% não ultrapassou os 14 dias.

Quanto à persistência da atividade larvicida de compostos já tradicionalmente usados em campo para o controle do *A. aegypti*, observou-se uma redução da mortalidade de populações de campo de *A. aegypti* da Polinésia Francesa e Martinique pelo temefós (Abate ®; 1% granules [GR]) e pelo Bti Vectobac ® water dispersible granule para <80% depois de 140 dias e 200 dias, respectivamente (87). O pyriproxyfen (Sumilarv ®, 0.5% GR) mostrou maior poder residual, com redução de atividade para <80% somente após 260 dias, estes ensaios foram realizados em condições simuladas de campo durante vários períodos do ano (87).

Melo-Santos et al, 2009 (88) reportaram atividade residual do Bti com capacidade de causar a mortalidade de todas as larvas introduzidas nos recipientes por até 6 meses após um único tratamento (88), os autores utilizaram

duas formulações experimentais de Bti, durante os experimentos, a temperatura da água nos recipientes variou entre 26.3°C e 29.8 °C.

Por outro lado, Santos et al, 2014 (38), ao avaliar o percentual de mortalidade de larvas de *A. aegypti* pelo larvicida biológico Vecto Bac WG Bti sorotipo H-14, formulação a base de grânulos dispersíveis em água, em tanques desprotegidos e protegidos de fatores ambientais, observaram alta mortalidade (100%) somente nas primeiras 24 horas de exposição. Nos tanques protegidos, a persistência do larvicida foi de 42 dias (entre 100 e 80%). Vale salientar que este estudo foi realizado em dois períodos: seco (setembro a dezembro) e chuvoso (fevereiro a maio), no Maranhão. Fatores como radiação solar, temperatura e índice pluviométrico provavelmente diminuiriam o poder residual do larvicida. Dessa forma, salientam que durante um experimento é necessário observações quanto aos parâmetros ambientais e sugerem que essa variação de resultados pode estar associada a diferentes métodos empregados na avaliação do larvicida (38).

Comparando nossos resultados de estabilidade do OELE com a estabilidade de outros larvicidas em situações simuladas de campo, podemos concluir que são necessárias análises mais elaboradas sobre os fatores responsáveis pela redução da eficiência do OELE exposto ao ambiente, e mecanismos para minimizar o impacto dos mesmos sobre o produto.

Por fim, apesar de não identificarmos comprometimento na eficiência do OELE nas concentrações avaliadas nos primeiros 14 dias de exposição, a alteração do odor, tonalidade e formação de material viscoso de cor branca por si só poderiam comprometer o uso do produto em grande escala, uma vez que, sendo o *A. aegypti* um vetor essencialmente antropofílico, a aceitação da comunidade e o uso do larvicida em águas para consumo humano são características relevantes dentro de um programa de controle do vetor.

Apesar de o uso da técnica de microencapsulamento em células de levedura ter sido adotado como uma possível solução contra a falta de especificidade de alvo e baixa resistência à radiação UV dos óleos essenciais, observamos as mesmas alterações de odor, tonalidade e a formação do material

viscoso nos recipientes-controle, com leveduras sem encapsulamento de OE. Portanto, essas alterações estão associadas à levedura que transporta o larvicida, não ao óleo essencial. Assim, aparentemente, mais estudos sobre formas de apresentação do OELE precisam ser avaliados.

A seleção do local de oviposição pela fêmea grávida é um importante componente quando se trata da sobrevivência de uma espécie de inseto. Segundo estudos anteriores, fêmeas de *A. aegypti* tendem a depositar os ovos em mais de um local, esse comportamento recebe o nome de “oviposição em salto” e também pode ser atribuído à garantia de sobrevivência da espécie (9). Analisando os resultados dos nossos experimentos sobre o efeito do OELE no comportamento de oviposição, mais de 50% das armadilhas instaladas receberam oviposição, para ambos os tempos de exposição. Apenas duas gaiolas, nos ensaios de 72 horas, não tiveram postura em nenhuma armadilha. Na maioria das gaiolas, cerca de 64% delas, observamos a presença de ovos nos dois tipos de armadilhas e não houve diferença estatisticamente significativa entre elas. Apesar de observarmos em 10 gaiolas (somando os dois tempos de exposição), a presença de ovos somente em armadilhas ÁGUA e que não observamos gaiolas com oviposição somente em armadilhas OELE, o que verdadeiramente nos mostrou diferença entre os dois tipos de armadilhas foi o quantitativo de ovos depositados em ambas. Um total de 1.027 ovos foram contados nos 30 ensaios realizados, sendo cerca de 83% deles (852) encontrados nas armadilhas ÁGUA.

Nossos resultados se assemelham aos encontrados por Faraco et al, 2016 (82), observaram que as fêmeas grávidas de *A. aegypti* depositaram seus ovos tanto em armadilhas contendo água, quanto nas que continham OE de *C. sinensis* ou de *S. aromaticum*. Contudo, o número de ovos depositados nas armadilhas foi significativamente diferente. O número de ovos em armadilhas com OE foi consideravelmente mais baixo do que nas armadilhas com água; somando os resultados para os dois óleos, foram depositados 5.565 ovos em armadilhas com OE e 22.128 em armadilhas somente com água. Analisando a postura de ovos nas armadilhas com OE, a quantidade de ovos em armadilhas

com OE de *C. sinensis* foi superior ao de armadilhas com OE de *S. aromaticum* (5.050 e 515, respectivamente).

Considerando quantidade de ovos observados em armadilhas com diferentes OE's, Ioannou et al, 2012 (89), realizaram um estudo para determinar os efeitos dos OE's da casca de cinco espécies cítricas (*C. sinensis*, *C. unshiu* Marcov., *C. aurantium* L., *C. limon* L., *C. paradisi* Macfad.) no comportamento de oviposição de fêmeas de moscas de frutas do mediterrâneo, *Ceratitidis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). Os autores observaram que os OE's das frutas cítricas produziram efeitos estimulatórios no comportamento de oviposição das fêmeas de *C. capitata*, e o número de ovos depositados pelas fêmeas nas armadilhas com os OEs foi relativamente superior (98,2-218,3) ao número de ovos em armadilhas contendo somente água (37,5), sendo que dentro dos óleos analisados, o OE de *C. sinensis* foi o que recebeu o maior número de ovos (218,3) (89).

Marques et al, 2013 (13) adotaram o Índice de Atividade de Oviposição (IAO), com taxas entre -1 e +1 para avaliar se substâncias exerciam atração ou repelência na oviposição. Nossos ensaios indicaram, através do IAO que o OELE exerceu repelência ou inibiu a oviposição das fêmeas com resultados negativos para ambos os tempos de exposição, -0.55 nos ensaios de 48 horas e -0.75 nos ensaios de 72 horas.

Faraco et al, 2016 (82) encontraram resultados inibitórios para ambos os óleos avaliados segundo o mesmo índice acima. Os resultados encontrados para ensaios com 48 horas de exposição foram -0.2 e -0.93 para *C. sinensis* e *S. aromaticum*, respectivamente. Concentrações diferentes dos OE usados podem justificar valores diferentes dos resultados, embora em ambos os estudos, o OE de *C. sinensis* tenha exercido o mesmo comportamento, repelindo ou inibindo a deposição de ovos. Se voltarmos a avaliar o número de ovos depositados no estudo de Faraco et al, 2016, cerca de 60% dos ovos foram depositados em água quando comparados com armadilhas de *C. sinensis* e em nossos estudos a porcentagem sobe para 83%.

Embora o efeito dos OE's no comportamento de oviposição das duas espécies de insetos citadas tenha sido contrário, produzindo estímulos para fêmeas de *C. capitata* e repelência ou inibição de deposição de ovos para *A. aegypti*, observamos que o OE de *C. sinensis* foi o OE que recebeu o maior número de ovos para ambas as espécies. Intuitivamente, avaliamos que o *C. sinensis* foi o OE mais atrativo ou de menor efeito repelente, inclusive quando comparado a outras espécies cítricas. De acordo com El-Gendy e Shaalan, 2012, fêmeas grávidas podem ser mais sensíveis ao cheiro do OE (90). Grande parte dos bioensaios de oviposição relatados na literatura científica, embora instrutivos sobre diversos aspectos, podem não refletir a sequência natural de todas as etapas do comportamento de oviposição de uma fêmea. Sendo assim, algumas terminologias amplamente adotadas durante esses bioensaios podem gerar confusão no momento da classificação final quando se avalia qualquer alteração gerada pelo contato da fêmea com o objeto de pesquisa. Em geral, substâncias atrativas e repelentes estão associadas a pistas de longo e médio alcance, orientando o movimento das fêmeas, já substâncias estimulantes ou inibidoras atuam como pistas de curto alcance e auxiliam na decisão final (91).

Sob a perspectiva de substâncias que atuem como pistas de longo, médio ou curto alcance, a turbulência de ar pode exercer influência positiva ou negativa na dispersão do odor gerado a partir de uma fonte (92), podendo contribuir ou prejudicar na classificação final de uma substância.

Estímulos olfativos podem entrar em jogo na seleção do local de oviposição, e agentes químicos voláteis podem exercer influência positiva ou negativa, atraindo ou repelindo fêmeas grávidas (10). Nossos ensaios foram realizados em ambiente laboratorial com pouca corrente de ar, ocasionando pouca dispersão do odor gerado a partir das armadilhas OELE, sendo assim, suspeitamos que essa ocorrência possa ter contribuído com nossos resultados.

Óleos essenciais são misturas químicas complexas e voláteis de odor forte e marcante (48,54). Eles constituem uma rica fonte de compostos bioativos com potencial ação inseticida, e podem interferir no comportamento dos insetos (45,46) podendo assim influenciar no comportamento de fêmeas de mosquito

grávidas. Repelência ou inibição do comportamento de oviposição podem ser consideradas influências negativas se avaliarmos sob o ponto de vista de que as fêmeas evitam ovipor em águas tratadas, favorecendo fontes de águas não tratadas (93). Acreditamos que experimentos sobre a influência do OELE no comportamento de oviposição das fêmeas de *A. aegypti* devem ser avaliados em condições simuladas de campo, pois acreditamos que seja necessária a observação da influência de parâmetros ambientais.

Por fim, o desenvolvimento de biolarvicidas que aliem baixo custo, menor impacto ambiental e baixa toxicidade em mamíferos é uma ferramenta de grande importância para as estratégias de controle de arboviroses transmitidas pelo *A. aegypti* e, seguindo esses parâmetros, o óleo essencial de *C. sinensis* pode vir a ser uma alternativa viável.

## 7 - CONCLUSÕES

- ✓ O laboratório estabelecido no ponto de Apoio da Regional Nordeste (Zoo2) – Belo Horizonte para criação de larvas de *A. aegypti* e bioensaios com o Óleo Essencial de Laranja encapsulado em leveduras (OELE) tem atualmente capacidade de ser utilizado em futuros experimentos para avaliação da atividade larvicida de produtos em condições simuladas de campo, podendo ser usado para outros ensaios que utilizem formas imaturas de mosquitos de importância em saúde pública. Sendo assim, consideramos que a criação do laboratório foi de grande importância não só para o desenvolvimento do nosso projeto como para a equipe de Zoonoses do município;
- ✓ O OELE pode ser considerado altamente ativo ( $CL_{50} < 50$  mg/L) para ambas as populações de *A. aegypti* testadas, Belo Horizonte e Rockefeller. Porém, a maior tolerância da população de campo ao OELE sugere uma possível relação com resistência a outros inseticidas para os quais esta população já se encontra resistente;
- ✓ O biolarvicida OELE manteve atividade larvicida em condições simuladas de campo por todo o período de 21 dias na concentração de 280 mg/L ( $10 \times CL_{90}$ ), apresentando taxa de mortalidade próxima a 100% nos primeiros 14 dias;
- ✓ O OELE na concentração de 160 mg/L nas armadilhas influenciou a escolha do local de oviposição das fêmeas de *A. aegypti*, repelindo ou inibindo a postura de ovos, sendo assim, sugerimos, futuramente, a avaliação deste produto como repelente;
- ✓ Concluímos que a volatibilidade e a degradação do biolarvicida demandam mais avaliações, assim como a influência de fatores ambientais. Todavia, mais experimentos que envolvam situações simuladas de campo são de máxima relevância no desenvolvimento do produto final.

## 8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Bellinato DF, Viana-medeiros PF, Araújo SC, Martins AJ, Bento J, Lima P, et al. Resistance Status to the Insecticides Temephos , Deltamethrin , and Diflubenzuron in Brazilian *Aedes aegypti* Populations. *Biomed Res Int*. 2016;2016:12.
2. Valle D, Braga IA. *Aedes aegypti* : inseticidas , mecanismos de ação e resistência \*. *Epidemiol Serv Saúde*. 2007;16(4):279–93.
3. Valle D. *Aedes aegypti* : histórico do controle no Brasil \*. *Epidemiol Serv Saúde*. 1980;16(2):113–8.
4. Consoli, Rotraut; Lourenço de Oliveira R. Principais Mosquitos de Importância Sanitária no Brasil. 1st ed. Fiocruz E, editor. Rio de Janeiro; 1994. 228 p.
5. Rey JR, Lounibos P. Ecología de *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* en América y transmisión enfermedades. *Biomédica*. 2015;35(2.2514).
6. Bracco JE, Capurro ML, Lourenço-de-oliveira R, Sallum MAM. Genetic variability of *Aedes aegypti* in the Americas using a mitochondrial gene : evidence of multiple introductions. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007;102(August):573–80.
7. Gould E, Pettersson J, Higgs S, Charrel R, Lamballerie X De. Emerging arboviruses : Why today ? *One Heal*. 2017;4:1–13.
8. Fares RCG, Souza KPR, Añez G, Rios M. Epidemiological Scenario of Dengue in Brazil. *Biomed Res Int*. 2015;2015.
9. Vieira F, Abreu S De, Morais MM, Ribeiro SP, Eiras ÁE. Influence of breeding site availability on the oviposition behaviour of *Aedes aegypti*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2015;110(5):669–76.
10. Chua KB, Chua I, Chua I, Chua KH, Komanwel P, Lumpur K. Differential Preferences of oviposition by *Aedes* in man-made containers under field conditions. *Southeast Asian J Trop Med Public Heal*. 2004;35(3).
11. Forantini O. Identificação de *aedes (stegomyia) albopictus (skuse)* no brasil. *Rev Saude Publica*. 1986;20(3):244–5.
12. Fontoura NG. Efeito do Novaluron - um inibidor da síntese de quitina – sobre *Aedes aegypti* em laboratório e simulado de campo Nathalia. 2008;
13. Marques GR., Chaves LS., Serpa LL., Arduíno M, Chaves FJ. Água de abastecimento público de consumo humano e oviposição de *Aedes aegypti* Public drinking water supply and egg laying by *Aedes aegypti*. *Revista de Saúde Pública*. 2013;47(3):579–87.
14. Araquan RB. Análise da Incidência de Dengue nos Distritos Regionais de Belo Horizonte – MG , Entre os anos de 2005 a 2013. Universidade Federal de Viçosa; 2014.
15. Ponnusamy L, Xu N, Nojima S, Wesson DM, Schal C, Apperson CS. Identification of bacteria and bacteria-associated chemical cues that

- mediate oviposition site preferences by *Aedes aegypti*. PNAS. 2008;105(27):9262–7.
16. Maciel-de-freitas R, Aguiar R, Bruno R V, Guimarães MC, Lourenço-de-oliveira R, Sorgine MHF, et al. Why do we need alternative tools to control mosquito-borne diseases in Latin America? Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 2012;107(6):828–9.
  17. Cleton N, Koopmans M, Reimerink J, Godeke G, Reusken C. Come fly with me : Review of clinically important arboviruses for global travelers. J Clin Virol. 2012;55:191–203.
  18. Luis J, Martín S, Brathwaite O, Zambrano B, Solórzano JO, Bouckenoghe A, et al. The Epidemiology of Dengue in the Americas Over the Last Three Decades : A Worrysome Reality. Am J Trop Med Hyg. 2010;82(1):128–35.
  19. Valle D, Pimenta DN, da Cunha RV. Dengue: Teoria e Práticas. Fiocruz E, editor. 2015.
  20. Oliveira CS, Vasconcelos PF da C, Azevedo R do S da S. Chikungunya risk for Brazil. Revista de Saúde Pública. 2015;49–58.
  21. Kotsakiozi P, Gloria-soria A, Caccone A, Evans B, Schama R, Martins AJ, et al. Tracking the return of *Aedes aegypti* to Brazil , the major vector of the dengue , chikungunya and Zika viruses. PLoS Negl Trop Dis. 2017;1–20.
  22. Roberto M, Nunes T, Faria NR, Vasconcelos JM De, Golding N, Kraemer MUG, et al. Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. BMC Med. 2015;13(102).
  23. Teixeira MG, Andrade AM., Castro JS., Oliveira FLS., Goes CS., Maia M, et al. East / Central / South African Genotype Chikungunya Virus ., Emerg Infect Dis. 2015;21(5):2013–5.
  24. Zanluca C, Campos V, Melo VA De, Mosimann ALP, dos Santos G, dos Santos C, et al. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2015;110(June):569–72.
  25. Campos GS, Bandeira AC, Sardi SI. Zika Virus Outbreak , Bahia, Brazil. Emerg Infect Dis. 2015;21(10):1885–6.
  26. Calvet G, Aguiar RS, Melo ASO, Sampaio SA, Filippis I De, Fabri A, et al. Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil : a case study. Lancet. 2016;16:653–60.
  27. Saúde M da. pncd\_2002.pdf. 2002.
  28. Saúde M da. Diretrizes Nacionais para a Prevenção e Controle de Epidemias de Dengue. 2009.
  29. Garcia GDA, David MR, Martins ADJ, Maciel-de-freitas R, Gerlinde J, Linss B, et al. The impact of insecticide applications on the dynamics of resistance : The case of four *Aedes aegypti* populations from different Brazilian regions. Plos Neglected Tropical Diseases. 2018;1–20.
  30. Montella IR, Martins AJ, Viana-medeiros PF, Lima JBP, Braga IA, Valle D. Insecticide Resistance Mechanisms of Brazilian *Aedes aegypti* Populations from 2001 to 2004. Am J Trop Med Hyg. 2007;77(3):467–77.

31. Organization WH. Global Plan for Insecticide Management In Malaria Vectors. 2012.
32. Georghiou GP. Principles of insecticide resistance management. *Erudit*. 2015;75:51–9.
33. Moyes CL, Vontas J, Martins AJ, Ng LC, Koou SY, Dusfour I, et al. Contemporary status of insecticide resistance in the major *Aedes* vectors of arboviruses infecting humans. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(7):1–20.
34. Marcombe S, Poupardin R, Darriet F, Reynaud S, Bonnet J, Strode C, et al. Exploring the molecular basis of insecticide resistance in the dengue vector *Aedes aegypti*: a case study in Martinique Island (French West Indies). *BMC Genomics*. 2009 Jan;10:494.
35. Melo-santos MA V, Varjal-melo JJM, Araújo AP, Gomes TCS, Paiva MHS, Regis LN. Resistance to the organophosphate temephos : Mechanisms , evolution and reversion in an *Aedes aegypti* laboratory strain from Brazil. *Acta Trop*. 2010;113:180–9.
36. Ritchie SA, Rapley LP, Benjamin S. *Bacillus thuringiensis* var . *israelensis* ( *Bti* ) Provides Residual Control of *Aedes aegypti* in Small Containers. *Am J Trop Med Hyg*. 2010;82(6):1053–9.
37. Valle D, Braga IA. *Aedes aegypti* : vigilância , monitoramento da resistência e alternativas de controle no Brasil \*. *Epidemiol Serv Saúde*. 2007;16(4):295–302.
38. Santos A, Lobo K, Soares J, Tadei WP, Pinheiro VCS. Influência dos fatores abióticos na efetividade de para larvas de *Aedes aegypti* ( *Linnaeus* , 1762 ) Influence of abiotic factors on the effectiveness of *Bacillus*. *Revista Cubana de Medicina Tropical*. 2014;66(2):174–90.
39. Cheng S, Chang H, Chang S, Tsai K-H, Chen W-J. Bioactivity of selected plant essential oils against the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* larvae. *Bioresour Technol*. 2003;89:99–102.
40. Soonwera, Mayura ; Phasomkusolsil S. Effect of *Cymbopogon citratus* (lemongrass) and *Syzygium aromaticum* (clove) oils on the morphology and mortality of *Aedes aegypti* and *Anopheles dirus* larvae. *Parasitol Res*. 2016;115(4):1691–1703.
41. Enan E. Insecticidal activity of essential oils : octopaminergic sites of action. *Comp Biochem Physiol Part C*. 2001;(130):325–37.
42. Cheng SS, Liu JY, Huang CG, Hsui YR, Chen WJ, Chang ST. Insecticidal activities of leaf essential oils from *Cinnamomum osmophloeum* against three mosquito species. *Bioresour Technol*. 2009;100(1):457–64.
43. Morais LAS. Influência dos Fatores Abióticos na Composição Química dos Óleos Essenciais. *Horticultura Brasileira*. 2009;27:4050–63.
44. Ohamed MIEM, Bdelgaleil SAMA. Chemical composition and insecticidal potential of essential oils from Egyptian plants against *Sitophilus oryzae* ( L . ) ( *Coleoptera* : *Curculionidae* ) and *Tribolium castaneum* ( *Herbst* ) ( *Coleoptera* : *Tenebrionidae* ). *Appl Entomol Zool*. 2008;43(4):599–607.
45. Bizzo HR, Hovell AMC, Rezende CM. Óleos Essenciais no Brasil: Aspectos Gerais, Desenvolvimento e Perspectivas. *Química Nova*. 2009;32(3):588–

94.

46. Franzios G, Mirotsoú M, HatziaPostolou E, Kral J, Scouras ZG, Mavragani-tsipidou P. Insecticidal and Genotoxic Activities of Mint Essential Oils. *J Agric Food Chem.* 1997;45(96):2690–4.
47. Kasim NN, Ismail NASS, Masdar ND, Hamid FA, Nawawi WI. Extraction and Potential of Cinnamon Essential Oil towards Repellency and Insecticidal Activity. *Int J Sci Res Publ [Internet].* 2014;4(7):2250–3153. Available from: [www.ijsrp.org](http://www.ijsrp.org)
48. Bakkali F, Idaomar M, Averbeck S, Averbeck D. Biological effects of essential oils – A review. *Food Chem Toxicol.* 2008;46:446–75.
49. Nishimura H. Aroma constituents in plants and their repellent activities against mosquitoes. *Aroma Res.* 2001;2.
50. Prajapati V, Tripathi AK, Aggarwal KK, Khanuja SPS. Insecticidal , repellent and oviposition-deterrent activity of selected essential oils against *Anopheles stephensi* , *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. *Bioresour Technol.* 2005;96:1749–57.
51. Tsao R, Lee S, Rice PJ, Jensen C, Coats JR. Monoterpenoids and Their Synthetic Derivatives as Leads for New Insect-Control Agents. In: *Synthesis and Chemistry of Agrochemicals IV.* 1995. p. Chapter 28.
52. Gnankiné O, Bassolé IHN. Essential Oils as an Alternative to Pyrethroids ' Resistance against *Anopheles* Species Complex Giles. *Molecules.* 2017;22(1321).
53. Dias, Clarice Noletto; Moraes DFC. Essential oils and their compounds as *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) larvicides: review. *Parasitol Res.* 2014;113.
54. Andrade-ochoa S, Sánchez-torres LE, Nevárez-moorillón G, Camacho AD, Noguera-Torres B. Aceites esenciales y sus componentes como una alternativa en el control de mosquitos vectores de enfermedades. *Biomédica.* 2017;37(2):224–43.
55. Jankowska M, Rogalska J, Wyszowska J, Stankiewicz M. Molecular Targets for Components of Essential Oils in the Insect Nervous System — A Review. *Molecules.* 2018;23(34):1–20.
56. George S VS. Comparative efficacy of *Annona squamosa* Linn. and *Pongamia glabra* Vent. to *Azadirachta indica* A. juss against mosquitoes. *J Vector Borne Dis.* 2005;42(4):159–63.
57. Sun L, Dong H, Guo C, Qian J, Sun J, Ma L ZC. Larvicidal activity of extracts of *Ginkgo biloba* exocarp for three different strains of *Culex pipiens pallens*. *J Med Entomol.* 2006;43(2):258–61.
58. Chutia M, Bhuyan PD, Pathak MG, Sarma TC, Boruah P. Antifungal activity and chemical composition of *Citrus reticulata* Blanco essential oil against phytopathogens from North East India. *Food Sci Technol.* 2009;42:777–80.
59. Lopes JM., Déo TF., Andrade BJ., Giroto M, Felipe ALS, Junior CE., et al. Importância Econômica do Citros no Brasil. *Revista Científica Eletrônica de Agronomia.* 2011;0–2.

60. Hafeez F, Akram W, Shaalan EA-S. Mosquito larvicidal activity of citrus limonoids against *Aedes albopictus*. *Parasitology Research*. 2011;221–9.
61. M. Viuda-Martos, Y. Ruiz-Navajas, J. Fernández-Lopez \* JP ´rez-A ´lvarez. Antifungal activity of lemon ( *Citrus lemon* L .), mandarin ( *Citrus reticulata* L .), grapefruit ( *Citrus paradisi* L .) and orange ( *Citrus sinensis* L .) essential oils. *Food Control*. 2008;19:1130–8.
62. Tao N, Jia L, Zhou H. Anti-fungal activity of *Citrus reticulata* Blanco essential oil against *Penicillium italicum* and *Penicillium digitatum*. *Food Chem*. 2014;153:265–71.
63. Jayaprakasha GK, Singh RP, Pereira J, Sakariah KK. Limonoids From *Citrus Reticulata* and Their Moulting Inhibiting Activity in Mosquito *Culex Quinquenotatus* larvae. *Phytochemistry*. 1997;44(5):843–6.
64. Bishop JRP, Lambs J. Microencapsulation in yeast cells. *J Microencapsul*. 1998;15(6):761–73.
65. Ciamponi F, Duckham C, Tirelli N. Yeast cells as microcapsules . Analytical tools and process variables in the encapsulation of hydrophobes in *S . cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2012;(95):1445–56.
66. PANNELL N. Encapsulating materials in microbial cells—by passive diffusion in absence of solvent or plasmolyser. EI, Konteles; EP242135-A2, 1994.
67. Paramera EI, Konteles SJ, Karathanos VT. Stability and release properties of curcumin encapsulated in *Saccharomyces cerevisiae* ,  $\beta$ -cyclodextrin and modified starch. *Food Chem*. 2011;125:913–22.
68. Workman MJ, Gomes B, Weng J-L, Ista LK, Jesus CP, Matthews SK, et al. Yeast-encapsulated Essential Oils as an Environmentally Friendly Larvicide.
69. Nelson G. Application of microencapsulation in textiles. *International J Pharm*. 2002;242(1):55–62.
70. Shi G, Rao L, Yu H. Stabilization and encapsulation of photosensitive resveratrol within yeast cell. *International J Pharm*. 2008;349:83–93.
71. Eduardo J, Pessanha M, Caiiffa WT, Cecilio AB, Melo FC De, Araujo SC, et al. Communication / Comunicação Cocirculation of two dengue virus serotypes in individual and pooled samples of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* larvae Cocirculação de dois sorotipos do vírus dengue em amostras individuais e pools de larvas de *Aedes aegypti*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2011;44(1):103–5.
72. Roberto P, Corrêa L, França E, Fernandes T. Infestação pelo *Aedes aegypti* e ocorrência da dengue em Belo Horizonte , Minas Gerais. *Revista de Saúde Pública*. 2005;39(1):33–40.
73. Proietti FA, Caiiffa WT, Almeida MC de M, Assunção RM. Dinâmica intra-urbana das epidemias de dengue em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1996-2002. *Caderno de Saúde Pública*. 2008;24(10):2385–95.
74. Boletim de Vigilância em Saúde [Internet]. 2018. p. <https://prefeitura.pbh.gov.br/saude/informacoes/vi>. Available from: <https://prefeitura.pbh.gov.br/saude/informacoes/vigilancia/vigilancia->

75. Harrington LC, Edman JD, Scott TW. Why do female *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) feed preferentially and frequently on human blood? *J Med Entomol.* 2001 May;38(3):411–22.
76. Focks DA. A Review of Entomological Sampling Methods and Indicators for Dengue Vectors. Geneva: World Health Organization; 2003. Document WHO/TDR/IDE/Den/03.1.
77. Valle D, Bellinato DF, Viana-Medeiros PF, Lima JBP, Martins Junior A de J. Resistance to temephos and deltamethrin in *Aedes aegypti* from Brazil between 1985 and 2017. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2019 Apr;114.
78. Chediak M, Pimenta FG, Coelho GE, Braga IA, Lima JBP, Cavalcante K, et al. Spatial and temporal country-wide survey of temephos resistance in Brazilian populations of *Aedes aegypti*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2016;111(May):311–21.
79. Kuno G. Early History of Laboratory Breeding of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Focusing on the Origins and Use of Selected Strains. *J Med Entomol.* 2010 Nov;47(6):957–71.
80. W. K. HARTBERG<sup>2</sup> AND G. B. CRAIG J. Reproductive isolation in *Stegomyia* Mosquitoes. *Evolution (N Y).* 1970;24(December):692–703.
81. Bilal H, Akram W, Hassan SA, Din S. Citrus Seed Oils Efficacy against Larvae of *Aedes aegypti*. *J Arthropod-Borne Dis.* 2017;11(3):427–32.
82. Faraco A, Araujo DO, Ribeiro-paes JT, Deus JT De, Cavalcanti SC, Nunes R de S, et al. Larvicidal activity of *Syzygium aromaticum* ( L . ) Merr and *Citrus sinensis* ( L . ) Osbeck essential oils and their antagonistic effects with temephos in resistant populations of *Aedes aegypti*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2016;111(July):443–9.
83. Thanigaivel A, Chandrasekaran R, Chandrasekaran K, Nisha S, Sathish-Narayanan S, Kirubakaran SA, et al. Larvicidal efficacy of *Adhatoda vasica* (L.) Nees against the bancroftian filariasis vector *Culex quinquefasciatus* Say and dengue vector *Aedes aegypti* L. in in vitro condition. *Parasitol Res.* 2012;110(5):1993–1999.
84. Mazzarri MB, Georghiou GP. Characterization of Resistance to organophosphate, Carbamate, and Pyrethroid Insecticides in Field Populations of *Aedes Aegypti* from Venezuela. *J Am Mosq Control Assoc.* 1995;11(3):315–22.
85. Ferreira SG, Conceição VS, Gouveia NS, Santos GS, Santos RLC, Lira AAM, et al. Journal of Colloid and Interface Science An environmentally safe larvicide against *Aedes aegypti* based on in situ gelling nanostructured surfactant systems containing an essential oil. *J Colloid Interface Sci.* 2015;456:190–6.
86. Isman MB. Botanical insecticides, deterrents and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annu Rev Entomol.* 2006;45–66.
87. Marcombe S, Darriet F, Agnew P, Etienne M, Yébakima A, Corbel V. Field Efficacy of New Larvicide Products for Control of Multi-Resistant *Aedes aegypti* Populations in Martinique ( French West Indies ). *Am J Trop Med*

- Hyg. 2011;84(1):118–26.
88. Alice M, Melo-santos V De, Paula A, Araújo D, Maria E, Rios M, et al. Long lasting persistence of *Bacillus thuringiensis* serovar . israelensis larvicidal activity in *Aedes aegypti* ( Diptera : Culicidae ) breeding places is associated to bacteria recycling. *Biol Control*. 2009;49:186–91.
  89. Ioannou C, Papadoulos N, Kouloussis N, Tananaki C, Katsoyannos B. Essential oils of citrus fruit stimulate oviposition in the Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata* ( Diptera : Tephritidae ). *Physiol Entomol*. 2012;37:330–9.
  90. El-Gendy, N.A; Shaalan E. Oviposition Deterrent activity of.pdf. *J Entomol* [Internet]. 2012;9(ISSN 1812-5670):435–41. Available from: [www.academicjournal.com](http://www.academicjournal.com)
  91. Day JF. Mosquito Oviposition Behavior and Vector Control. *Insects*. 2016;7(65).
  92. Roque RA, Eiras ÁE. Calibration and Evaluation of Field Cage for Oviposition Study with *Aedes* ( *Stegomyia* ) *aegypti* Female ( L . ) ( Diptera : Culicidae ). *Public Health*. 2008;37(4):478–85.
  93. Machado BFM. Óleos Essenciais: Aspectos Gerais e Usos em Terapias Naturais. *Cad Acadêmicos*. 2011;3(2):105–27.

## 9 - ANEXO

**Tabela 5:** Resultados do ensaio de estabilidade por dias de exposição.

Subs.	Vol. (L)	Stock (mL)	OELE (mg/L)	Data	Dias	R1		R2		R3		R4		Total			M (%)
						V	M	V	M	V	M	V	M	V	M	Exp	
OELE	10	32	160	19/out		0	26	0	26	2	23	1	24	3	99	102	0,971
				22/nov		0	18	0	17	0	20	0	17	0	72	72	1,000
				24/jan	<1	0	24	0	23	0	24	0	24	0	95	95	1,000
				28/fev		4	21							4	21	25	0,840
OELE	10	56	280	19/out		0	24	0	24	0	26	0	25	0	99	99	1,000
				22/nov		0	17	2	17	0	19	0	21	2	74	76	0,974
				24/jan	<1	0	24	0	26	0	25	0	24	0	99	99	1,000
				28/fev		3	22							3	22	25	0,880
Levedura	10	56	NA	19/out		10	14	21	3	21	4	27	0	79	21	100	0,210
				22/nov		21	0	20	0	18	3	14	5	73	8	81	0,099
				24/jan	<1	25	0	25	0	25	0	25	0	100	0	100	-
				28/fev		25	0							25	0	25	-
CP	10	3 g		19/out	<1	25	0	26	0	25	0	24	0	100	0	100	-
OELE	10	32	160	12/out		10	15	9	16	15	8	8	17	42	56	98	0,571
				15/nov	7	10	10	4	17	10	9	13	6	37	42	79	0,532
				17/jan		25	0	25	0	25	0	24	0	99	0	99	-
OELE	10	56	280	12/out		0	26	0	23	0	25	1	23	1	97	98	0,990
				15/nov	7	0	16	0	19	0	22	1	17	1	74	75	0,987

					17/jan	0	24	0	25	0	25	4	21	4	95	99	0,960	
					12/out	25	0	25	0	23	0	23	0	96	0	96	-	
Levedura	10	56			15/nov	7	20	0	25	0	19	0	20	0	84	0	84	-
					17/jan	25	0	25	0	24	1	23	0	97	1	98	0,010	
CP	10	3 g			12/out	7	21	1	23	2	24	0	25	0	93	3	96	0,031
					05/out	11	14	16	8	10	16	19	5	56	43	99	0,434	
OELE	10	32	160		08/nov	14	23	0	21	0	20	0	21	0	85	0	85	-
					10/jan	26	0	25	0	25	0	26	0	102	0	102	-	
					05/out	0	26	0	23	0	25	0	25	0	99	99	1,000	
OELE	10	56	280		08/nov	14	1	20	0	20	0	20	2	18	3	78	81	0,963
					10/jan	3	23	1	25	0	20	0	24	4	92	96	0,958	
					05/out	24	0	24	1	28	0	24	0	100	1	101	0,010	
Levedura	10	56			08/nov	14	20	0	19	0	18	0	18	0	75	0	75	-
					10/jan	24	0	24	0	25	0	24	0	97	0	97	-	
CP	10	3 g			05/out	14	25	0	24	0	24	0	25	0	98	0	98	-
					01/nov	19	0	20	0	23	0	21	0	83	0	83	-	
OELE	10	32	160		03/jan	21	23	0	23	0	26	0	24	0	96	0	96	-
					07/fev	23	0	24	0	25	0	26	0	98	0	98	-	
					01/nov	16	3	15	4	19	3	18	3	68	13	81	0,160	
OELE	10	56	280		03/jan	21	25	0	21	3	23	2	26	0	95	5	100	0,050

			07/fev	13	11	15	10	15	10	17	9	60	40	100	0,400	
			01/nov	20	0	20	0	19	0	22	0	81	0	81	-	
Levedura	10	56	03/jan	21	25	0	26	0	26	0	26	0	103	0	103	-
			07/fev	25	0	25	0	25	0	26	0	101	0	101	-	