COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE OVICIDA DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *CROTON ARGYROPHYLLUS* (EUPHORBIACEAE) SOBRE O *AEDES AEGYPTI* (DIPTERA: CULICIDAE)

CHEMICAL COMPOSITION AND OVICIDA ACTIVITY OF THE ESSENTIAL OIL OF *CROTON ARGYROPHYLLUS* (EUPHORBIACEAE) LEAVES ABOUT *AEDES AEGYPTI* (DIPTERA: CULICIDAE)

COSTA, Renata Katryne Bispo da Silva¹; SILVA, Débora Cardoso^{1*}; GUALBERTO, Simone Andrade¹; DA SILVA, Paulo Sávio Damásio² COSTA, Matheus Andrade Rocha³.

¹Laboratório de Pesquisa de Inseticidas Naturais/Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia/UESB, Praça Primavera, 40, Bairro Primavera, CEP 45700-000, Itapetinga, BA, Brasil. (Fone: +55 77 3261-8468)

²Laboratório de Biossistemática Animal/ Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Estrada Itapetinga, s/n, Itapetinga - BA, 45700-000, Itapetinga, BA, Brasil.

³Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste (CRCN-NE)
Av. Prof. Luís Ferreira, 200, CEP: 51740-540, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, Brasil

*Autor correspondente
E-mail: dcardoso_rj@hotmail.com

Received 17 October 2019; received in revised form 02 July 2020; accepted 12 August 2020

RESUMO

O controle do *Aedes aegypti*, transmissor de várias arboviroses de importância para a saúde pública, tem como estratégias a utilização de inseticidas sintéticos, integrados com o controle ambiental. Seu controle é direcionado principalmente para as fases de larva e adulto. A fase de ovo é difícil de ser controlada, pois possui grande resistência às condições ambientais. Objetivou-se avaliar o potencial ovicida do óleo essencial obtido das folhas de *Croton argyrophyllus*, sobre o *Aedes aegypti*, bem como determinar o teor da umidade, o rendimento e a sua composição química. Os ovos foram expostos à solução aquosa do óleo essencial em Tween 80 a 10%, na concentração de 12 mg mL⁻¹, por um período de 15, 30, 60 e 120 minutos. Posteriormente, os ovos foram lavados e, após 180 horas de observação, foi adicionada ração ao meio. A análise da composição química do óleo essencial foi realizada por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas. Verificou-se que até 180 horas de observação, a maior porcentagem de eclosão larvar ocorreu nos ovos expostos ao óleo essencial por 15 min (30%) e o menor percentual nos ovos expostos por 120 min (<10%). Após 180 horas houve aumento da eclosão em todos os tratamentos. O teor de umidade foi de 58,69%, o rendimento do óleo foi 0,35%, e os principais constituintes químicos encontrados foram o biciclogermacreno e β -cariofileno. Observou-se que o óleo essencial de *Croton argyrophyllus*, na concentração avaliada, afeta a eclosão das larvas do *Aedes aegypti* somente na ausência de alimento no meio.

Palavras-chave: Caatinga, Inseticidas, Parasitologia

ABSTRACT

The control of *Aedes aegypti*, which transmits several arboviruses of importance to public health, has as strategies the use of synthetic insecticides, integrated with environmental control. Its control is mainly directed to the larvae and adult phases. The egg phase is difficult to control, as it has great resistance to environmental conditions. The objective of this work was to evaluate the ovicidal potential of the essential oil obtained from the leaves of *Croton argyrophyllus*, on *Aedes aegypti*, as well as to determine the moisture content, the yield, and its chemical composition. The eggs were exposed to the aqueous solution of the essential oil in 10% Tween 80, in the concentration of 12 mg mL⁻¹, for a period of 15, 30, 60, and 120 minutes. Subsequently, the eggs were washed and, after 180 hours of observation, the feed was added. The analysis of the chemical composition of the essential oil was performed by Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry. It was found that up to 180 hours of observation, the highest percentage of larval hatching occurred in eggs exposed to essential oil for

15 min (30%) and the lowest percentage in eggs exposed for 120 min (<10%). After 180 hours, there was an increase in hatching in all treatments. The moisture content was 58.69%, the oil yield was 0.35%, and the main chemical constituents found were bicyclogermacrene and β -cariophyllene. It was observed that the essential oil of *Croton argyrophyllus*, at the concentration evaluated, affects the hatching of *Aedes aegypti* larvae only in the absence of food.

Keywords: *Caatinga, Insecticides, Parasitology*

1. INTRODUÇÃO

O *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762 (Diptera: Culicidae) é um mosquito transmissor de arboviroses, como os quatro sorotipos do vírus da dengue (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4), o vírus do chikungunya e do zika (VEGA-RUA, 2014). Esses dois últimos causam doenças que apresentam sintomas semelhantes aos da dengue, sendo o vírus Zika associado também à Síndrome de Guillain-Barré na Polinésia Francesa (OEHLER *et al.*, 2014) e microcefalia no Brasil (MARCONDES; XIMENES, 2015). Não há vacina para chikungunya e zika, e ainda não está claro se existe uma vacina eficaz contra a dengue, portanto, o controle do *A. aegypti* continua sendo o principal instrumento para a diminuição da incidência destas doenças (FERREIRA *et al.*, 2017).

Para o controle integrado do *A. aegypti* são utilizadas estratégias que abrangem os controles mecânico, biológico e químico. O controle mecânico consiste em práticas capazes de eliminar criadouros. O biológico envolve vários predadores naturais que apresentam potencialidade para reduzir a população de mosquitos. Métodos de controle biológico estão sendo avaliados, como a modificação genética de populações de insetos selvagens (MCGRAW 2013, SLATKO 2014), a utilização da bactéria *Wolbachia pipientis* Hertig e Wolbach, 1924, e a esterilização de insetos por irradiação (BOYER, 2012). O controle químico é amplamente empregado, e é executado através da utilização dos inseticidas sintéticos, sendo este responsável pelo surgimento de populações resistentes no Brasil (MACORIS *et al.*, 2014) e em outros países, o que requer a busca por novas substâncias que sejam eficazes contra as larvas, adultos e, também, sobre os ovos do *A. aegypti*.

Com relação ao uso de substâncias químicas, os agentes utilizados no controle dos mosquitos são direcionados para a fase larval e adulta, não atuando na fase de ovo. O ovo é considerada a fase mais difícil no que diz

respeito ao controle, pois é a fase mais resistente do ciclo biológico do vetor, podendo apresentar uma sobrevivência de até um ano sem contato com a água, devido a sua capacidade de quiescência e a cutícula de cera que se forma entre doze a treze horas após a oviposição. Nas regiões onde as estações possuem invernos rígidos, esta fase é tida como estratégica para suportar o frio (SILVA; POLETO, 2012). Características como essas, conferem aos ovos do *A. aegypti* uma tolerância às condições físicas e químicas, como os inseticidas (REZENDE *et al.*, 2008). Além disso, permite o transporte a longas distâncias, tornando-se o principal meio de dispersão do mosquito (SILVA *et al.*, 2009).

Dentre as formas de controle químico que podem atuar nas diferentes fases de desenvolvimento do *A. aegypti*, inclusive na fase do ovo, podem-se citar os inseticidas botânicos, principalmente os formulados com óleos essenciais. Os óleos essenciais são produtos do metabolismo secundário das plantas, cujas funções abrangem a defesa contra agentes patogênicos, proteção contra herbívoros e atração de polinizadores (BAKKALI *et al.*, 2008). Estes produtos do metabolismo vegetal são voláteis, lipofílicos, geralmente odoríferos e líquidos (SIMÕES; SPITZER, 2004). Apresentam em sua constituição cerca de 20 a 60 componentes em diferentes concentrações (ANDRÉ *et al.*, 2018), sendo que os componentes majoritários geralmente determinam suas propriedades biológicas (PAVELA, 2015). Cruz *et al.* (2017), ao analisarem o potencial inseticida do óleo essencial obtido das folhas secas de *Croton argyrophyllus* Kunth, constataram o seu efeito tóxico sobre as larvas e adultos fêmeas do *A. aegypti*, sendo essa bioatividade atribuída, provavelmente, aos componentes majoritários do óleo essencial, como o espatulenol, β -cariofileno, α -pineno e o bicyclogermacrene. Contudo, outros estudos têm revelado o efeito larvicida de constituintes químicos presentes em baixas concentrações em extratos e óleos vegetais sobre o *A. aegypti*, seja de forma isolada ou atuando em sinergia com outros constituintes

(GOMES *et al.*, 2016).

Do ponto de vista ambiental, os inseticidas e repelentes botânicos que são constituídos por óleos essenciais se degradam rapidamente no meio ambiente, além de serem capazes de agir nas funções fisiológicas e bioquímicas dos insetos, em virtude da volatilidade e baixa persistência em condições de campo (COITINHO *et al.*, 2011). Por isso, podem ser seguros para o manejo por humanos e, é pouco provável, que ocorra intoxicação por contato com seus resíduos, como ocorre com inseticidas sintéticos. A volatilidade pode afetar também a eficiência de uma formulação que tenha na sua composição óleos essenciais, caso seja necessário um tempo de exposição prolongado para que o efeito tóxico ocorra. A utilização de óleos essenciais na formulação de inseticidas botânicos pode ser viável a nível econômico, ambiental e social, atendendo ao mesmo tempo a uma parcela da sociedade que opta por produtos naturais, que supostamente causem menor impacto sobre o meio ambiente e sobre a saúde dos indivíduos (FIGUEIREDO *et al.*, 2018).

Com relação ao gênero *Croton* Linnaeus estudos têm demonstrado o seu potencial para ser usado em programas de controle integrado do *A. aegypti*. Anjos *et al.* (2018) verificaram o efeito tóxico do óleo essencial da parte aérea de *Croton tetradenius* Baillon sobre larvas do *A. aegypti* e a influência do período de extração sobre o rendimento do óleo e a sua composição química. Carvalho *et al.* (2016) testaram a bioatividade do óleo essencial obtido das folhas de *C. tetradenius* sobre larvas e adultos do *A. aegypti*, demonstrando o seu efeito tóxico, e realizaram testes em mamíferos observando uma baixa toxicidade sobre *Mus musculus* Linnaeus, 1758. Da mesma forma, Cruz *et al.* (2017), ao avaliarem o óleo essencial obtido das folhas de *C. argyrophyllus*, constataram sua toxicidade sobre larvas e adultos fêmeas do *A. aegypti*, tendo apresentado, também, baixa toxicidade sobre *Mus musculus*.

Diante do potencial inseticida de espécies do gênero *Croton* sobre o *A. aegypti*, esse estudo teve por objetivo avaliar a toxicidade do óleo essencial obtido das folhas de *Croton argyrophyllus* sobre os ovos do *A. aegypti*, bem como determinar o teor da umidade, o rendimento e a composição química do óleo essencial.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material botânico

As folhas de *Croton argyrophyllus* foram identificadas e depositadas no Herbário da Universidade Estadual do Sudeste da Bahia (HUESB 4662). A coleta das folhas da espécie foi realizada no mês de maio de 2017, no período matutino, na Floresta Nacional de Contendas do Sincorá. As coordenadas geográficas do local da coleta foram S13°55.25' W041°06.88' (Figura 1).

2.2 Determinação do teor de umidade

A determinação da umidade das folhas foi realizada pelo método gravimétrico, conforme metodologia descrita por Santos *et al.* (2004), com adaptações. Inicialmente, 500 g de folhas frescas de *C. argyrophyllus* foram secas em estufa de circulação de ar a 50 °C durante 24 horas. Posteriormente, em um cadinho de porcelana, pesou-se 5 g do material vegetal previamente triturado e desidratado. Em seguida, este material foi seco em estufa de esterilização e secagem por 5 horas a uma temperatura de 110 °C. Após este período, o cadinho foi retirado da estufa com o auxílio de uma pinça, e colocado em um dessecador por 20 minutos para esfriar. Após a primeira pesagem, o cadinho retornou para a estufa por um período 1 hora. Este procedimento foi repetido até peso constante. O experimento foi conduzido em triplicata.

O teor de umidade foi expresso em porcentagem, através da diferença entre a massa perdida e a massa inicial das folhas frescas, multiplicado por 100.

2.3. Extração e rendimento do óleo essencial

Inicialmente, as folhas frescas foram alocadas em estufa de circulação de ar, pelo período de 12 horas, a uma temperatura de 40 °C.

Posteriormente, o material vegetal seco foi triturado manualmente e o óleo essencial foi extraído por hidrodestilação em aparelho de Clevenger modificado. Para cada extração foram utilizadas 60 gramas de folhas secas e trituradas, colocadas em balão de fundo redondo de 2,0 L com junta esmerilhada e adicionado a esse balão 1 L de água grau reagente (tipo II). O processo de extração foi conduzido em triplicata, à temperatura de 100 °C. O hidrolato foi extraído com éter etílico (C₄H₁₀O). A fração etérica foi seca com sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄) e o solvente removido a baixa pressão, a temperatura de 20°C em concentrador de

amostras (Christ AVC 2-18 CD).

O óleo essencial extraído foi armazenado em frasco âmbar, vedado e armazenado em freezer a temperatura de $-4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, até a realização das análises químicas e dos ensaios biológicos.

O teor do óleo essencial foi determinado dividindo a massa do óleo essencial (g) pela massa foliar seca utilizada (g) e multiplicando esse valor por 100.

2.3. Determinação da composição química do óleo essencial

A composição química do óleo essencial foi determinada em um Cromatógrafo Gasoso acoplado a um Espectrômetro de Massas (Shimadzu CG-EM, GC-17A/ QP2010 Plus), equipado com coluna capilar Factor Four-VF-5ms (30 m x 0,25 mm de diâmetro interno x 0,25 μm de espessura de filme), usando hélio como gás de arraste a uma vazão de 1 mL min^{-1} e pressão de 12 psi. A programação da temperatura do forno foi de $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $260\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($3\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$), depois $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ até $290\text{ }^{\circ}\text{C}$, com temperatura do injetor a $220\text{ }^{\circ}\text{C}$, interface a $310\text{ }^{\circ}\text{C}$ e fonte de íons a $220\text{ }^{\circ}\text{C}$. Injetou-se $1\text{ }\mu\text{L}$ de solução da amostra em diclorometano a uma razão de split 1:30. Os espectros de massas foram obtidos na faixa de varredura de 40-500 u.m.a, com energia de impacto de elétrons de 70 eV. As análises quantitativas foram realizadas utilizando um cromatógrafo de fase gasosa (HP 5890 Series II) equipado com um detector de ionização de chamas (DIC), nas mesmas condições experimentais e temperatura do detector de $280\text{ }^{\circ}\text{C}$. Os espectros de massas foram obtidos em equipamento Modelo:GCMS-QP2010 Plus da Shimadzu Coluna: HP-5 (30X0.25X0.25), nas mesmas condições experimentais descritas anteriormente. Os cromatogramas obtidos para as amostras do óleo essencial e dos padrões de hidrocarbonetos são mostrados nas Figuras 2, 3 e 4. Os espectros de massas são apresentados como anexos.

Os componentes do óleo essencial foram identificados através de seus índices de retenção (IR), calculados para cada constituinte por meio da injeção de uma série de padrões de hidrocarbonetos lineares (C8-C20) (Sigma-Aldrich) nas mesmas condições da amostra, e comparados com o valor tabelado por Adams (2007), assim como através da comparação com o banco de dados da biblioteca Nist08.

2.4. Avaliação da atividade ovicida

Os experimentos foram conduzidos em sala climatizada a uma temperatura média de $27,7\text{ }^{\circ}\text{C}$ e umidade média de 60,13%.

Os ovos do *Aedes aegypti* utilizados foram oriundos da linhagem Rockefeller, fornecidos pelo Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores – LAFICAVE, da Fundação Oswaldo Cruz, do Rio de Janeiro, Brasil.

Para o teste ovicida foi utilizada uma solução do óleo essencial de *C. argyrophyllus* na concentração de $12\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, obtida a partir da solubilização do óleo em uma solução de Tween 80 a 10% em água grau reagente (tipo II). Os ovos do *A. aegypti* (Figura 5) foram expostos à solução do óleo essencial de *C. argyrophyllus* por um período de 15, 30, 60 e 120 minutos. Como controles foram utilizadas a solução de Tween 80 a 10% em água deionizada e somente a água grau reagente. Após o período de exposição, os ovos foram retirados da solução e lavados com 10 mL de água grau reagente, por três vezes. Em seguida, foram selecionados aleatoriamente 30 ovos por repetição, com 5 repetições por tratamento, os quais foram colocados em recipiente de Polipropileno (PP) (3 x 3 cm) contendo 5 mL de água grau reagente (tipo II). O percentual de eclosão das larvas foi observado inicialmente a cada duas horas, por um período de 12 horas e, posteriormente, a cada 12 horas, por um período de 180 horas.

Após o período de 180 horas, com o intuito de avaliar se o óleo essencial havia causado mortalidade ou apenas inibição da eclosão das larvas, foram adicionados 0,01 g de ração para peixe triturada da marca Alcon Basic® nos recipientes de todos os tratamentos. As observações foram realizadas a cada 12 horas, por mais 144 horas. A cada 48 horas foram retirados 3 mL de água de cada recipiente e adicionados 3 mL de água deionizada limpa. Na medida em que ocorria a eclosão, as larvas eram quantificadas e retiradas dos recipientes com auxílio de uma pipeta Pasteur.

2.5. Análise estatística

Para comparar se a porcentagem média de eclosão de larvas do *A. aegypti* (%) diferiu antes e depois da adição de ração para peixes, em função do tempo de observação em minutos, nos diferentes tempos de exposição ao óleo essencial (15, 30, 60 e 120 minutos) e controles (Tween 80 e água grau reagente tipo II) foi feita a ANOVA fatorial. Para comparar as diferenças entre as médias foi realizado o teste de Tukey. A normalidade para todas as variáveis foi

investigada através do teste Lilliefors. Todas as análises foram desenvolvidas de acordo com Sokal and Rohlf (1995). Uma análise descritiva foi desenvolvida para calcular as médias e erro padrão. Neste estudo foi considerado o nível de significância de 5%. O programa utilizado para as análises foi o Do R.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente trabalho o rendimento médio do óleo essencial obtido das folhas de *Croton argyrophyllus*, coletadas em maio de 2017, foi de 0,35% (intervalo de confiança: 0,34-0,36) e o teor de umidade médio 58,69% (intervalo de confiança: 57,08 - 60,30).

Cruz *et al.* (2017), avaliando o rendimento médio do óleo essencial das folhas de *C. argyrophyllus*, as quais também foram coletadas na Floresta Nacional de Contendas do Sincorá/Bahia, no mês de maio de 2014, obtiveram um rendimento médio do óleo maior (0,48%) do que o encontrado nesse estudo. De acordo com os dados obtidos na estação meteorológica de Ituaçu/Bahia (OMM: 83292), do Instituto Nacional de Meteorologia, a precipitação pluviométrica total foi menor para o mês de maio de 2014 (2,8 mm), comparado a maio de 2017 (13,3 mm), o que pode ter interferido na produção dos metabólitos secundários, visto que diversos fatores relacionados ao estresse hídrico como, por exemplo, chuvas intensas e solos encharcados, podem afetar o metabolismo da planta, interferindo no rendimento do óleo essencial.

Outros fatores também podem afetar a atividade biossintética das plantas, e, conseqüentemente, o rendimento do óleo essencial, como o genético e o estágio de desenvolvimento, além das relações ecológicas intra e interespecíficas. Conhecer o rendimento do óleo essencial das espécies é necessário para determinar a viabilidade econômica e ambiental, para então, serem utilizadas como substâncias inseticidas. A variação no rendimento do óleo essencial da planta, assim como o teor de umidade nas folhas, pode ser atribuída a fatores extrínsecos abióticos, como temperatura, umidade relativa do ar, duração total de exposição ao sol, pluviosidade, o regime de ventos e as condições edáficas, assim como a fatores bióticos, através das relações ecológicas intra e interespecíficas (LIMA *et al.*, 2016; ANJOS, *et al.*, 2018).

Em relação à eclosão das larvas, com quatro e oito horas, o percentual de eclosão foi inferior a

10%, em todos os tratamentos e inclusive nos grupos controle. Com 12 horas ocorreu um aumento no percentual de eclosão, sendo que no tratamento no qual os ovos foram expostos ao óleo essencial por 120 minutos o percentual de eclosão manteve-se inferior a 10%, até 180 horas (Figura 6 (A) e (B)). Após a adição da ração (estímulo bioquímico) no meio, ocorreu um aumento na eclosão das larvas em todos os tratamentos, inclusive nos grupos controle (Figura 6 (C)). Com 336 horas de observação, a eclosão das larvas foi superior a 50% nos tratamentos cujos ovos foram expostos ao óleo essencial por 15, 30 e 60 minutos, assim como os controles, o que não ocorreu com o tratamento cujos ovos foram expostos por 120 minutos ao óleo essencial de *C. argyrophyllus* (Figura 6 (C)).

Antes da adição da ração, a porcentagem média acumulada de eclosão das larvas do *A. aegypti* foi significativamente menor para os tempos de exposição ao óleo de 60 e 120 minutos, quando comparado com 15 e 30 minutos de exposição e com os grupos controle (Figura 7). Entretanto, após a adição da ração, a eclosão das larvas não seguiu o mesmo padrão observado antes do fornecimento da ração. Constatou-se que a porcentagem acumulada de eclosão das larvas foi significativamente maior após a adição da ração (média $\pm$ erro padrão; $54 \pm 1,02$), quando comparado ao período anterior à adição ($16,42 \pm 0,72$; $F = 992,67$; $P < 0,001$), em todos os tratamentos.

É provável que o óleo essencial de *C. argyrophyllus* tenha ocasionado a inibição do desenvolvimento larval, em virtude das condições adversas que foram geradas pela exposição dos ovos ao óleo essencial, por diferentes períodos. De Lima *et al.* (2013) testaram o óleo essencial de *Croton zehntneri* Pax et Hoffm, *Croton nepetaefolius* Kuntze, *Croton argyrophyllodes* Muell. Arg e *Croton sonderianus* Muell. Arg sobre ovos do *A. aegypti*, sendo que todos os óleos testados inibiram a eclosão dos ovos, obtendo assim resultados semelhantes ao deste trabalho. Contudo, no presente trabalho, o fornecimento da ração de peixe pode ter estimulado a eclosão das larvas, independente das condições adversas a que foram submetidas. Dessa forma, o óleo essencial obtido das folhas de *C. argyrophyllus*, na concentração e nos períodos de exposição utilizados nesse estudo, não apresentou potencial para ser usado como um produto ovicida em programas de controle do *A. aegypti*, visto que, embora tenha afetado a biologia na

fase de ovo, provavelmente ocasionando um retardo temporário da eclosão, não interferiu de forma significativa na mortalidade larval. No experimento de De Lima *et al.* (2013) não houve o estímulo bioquímico (oferecimento de alimento) após o período de observação.

Calado (2002), em um experimento realizado com ovos do *Aedes albopictus* Skuse, 1894, observou uma menor eclosão na ausência de alimento e um aumento significativo quando a ração para peixe foi adicionada ao meio líquido. Da mesma forma, Dieng *et al.* (2018), ao avaliarem a atuação de fluidos de resíduos doces, como fruto de banana, batata-doce cozida e a embalagem de alimentos doces, como lata de leite condensado, sobre a eclosão das larvas do *A. aegypti*, em condições artificiais, verificaram que o percentual de eclosão foi semelhante ao obtido no ambiente natural.

A atividade ovicida de um produto também pode ser afetada pelo tempo de exposição em razão de sua grande volatilidade, causando um efeito residual curto e sua baixa solubilidade em água (BILIA *et al.*, 2014), pela idade do ovo, pela concentração do produto aplicado (TENNYSON *et al.*, 2011), assim como pela estrutura coriônica do ovo (CAMPBELL *et al.*, 2016) e por fatores bióticos e abióticos como a temperatura, umidade (BESERRA *et al.*, 2006), pluviosidade (FORATTINI, 2003), fotoperíodo (DINIZ *et al.*, 2017) e o oxigênio dissolvido (DO), que está ligado ao crescimento bacteriano (PONNUSAMY, 2011).

Aznar *et al.* (2013) observaram que em climas temperados, chuvas intensas desencadeavam a eclosão das larvas, proporcionando um aumento na densidade larval. Por outro lado, a ausência de bactérias inibia a eclosão durante a estação de inverno e nas estações com chuvas isoladas, eclosão essa que também dependia da disponibilidade de alimento. Em ambientes naturais, as larvas do *A. aegypti* se alimentam também de bactérias, portanto, a sua presença no criadouro é um fator que estimula a eclosão das larvas.

É importante destacar que a ação dos óleos essenciais sobre os insetos não se restringe apenas a mortalidade do indivíduo. Além disso, esses produtos podem provocar alterações comportamentais, como a deterrence alimentar, conforme citado por Colpo *et al.* (2014).

Portanto, não se pode descartar o potencial do óleo essencial de *C. argyrophyllus*, pois embora não tenha atuado como um ovicida nos testes realizados, pode ter afetado outras fases

do desenvolvimento do inseto, como o potencial biótico, refletindo assim, no seu potencial reprodutivo e interferindo no crescimento populacional do *A. aegypti*.

Nesse estudo, a adição da ração ao meio aumentou significativamente o percentual de eclosão das larvas, funcionando, provavelmente, como um estímulo bioquímico, independente das condições adversas do meio, visto que as larvas eclodiram na presença de um fator essencial à sua sobrevivência, o alimento, mesmo tendo entrado em contato com uma substância potencialmente tóxica, como o óleo essencial de *C. argyrophyllus*. É necessário, portanto, estar atento ao fato de que esses fatores, em condições naturais, não são controlados e que um produto pode inicialmente demonstrar um potencial ovicida ao ser avaliado, mas em campo, em contato com diversos fatores ecológicos, a eclosão das larvas pode ocorrer.

Quanto à composição química do óleo essencial obtido das folhas de *C. argyrophyllus*, a análise indicou a presença de 57 substâncias, tendo sido identificados 24 compostos, correspondendo a 42,10% do total. Destas substâncias, 38,37% são sesquiterpenos hidrocarbonados, 15,15% são monoterpenos hidrocarbonados, 2,91% sesquiterpenos oxigenados, 1,32% monoterpenos oxigenados e 0,69% outros constituintes (Tabela 1).

Os constituintes com percentuais superiores a 1% identificados no óleo essencial de *C. argyrophyllus* foram: biciclogermacreno (15,46%), β -cariofileno (14,69%), β -pineno (7,18%), α -humuleno (4,03%), β -elemeno (3,47%), α -felandreno (1,93%), óxido de cariofileno (1,70%), p-cimeno (1,53%), γ -terpineno (1,47%), β -ocimeno (1,41%) e espatulenol (1,21%).

Corroborando com o presente trabalho, Araújo *et al.* (2014), encontraram o biciclogermacreno como o componente principal (27,78%) das folhas de *C. argyrophyllus*, e também, o β -elemeno (8,50%), β -cariofileno (6,27%) e o espatulenol (4,83%). Brito *et al.* (2018), também encontraram o biciclogermacreno como componente majoritário do óleo essencial das folhas de *C. argyrophyllus*, coletadas entre fevereiro e abril de 2016. Contudo, Cruz *et al.* (2017), ao avaliarem o óleo essencial das folhas de *C. argyrophyllus*, coletadas em maio de 2014, encontraram como componente majoritário o espatulenol (22,80%), seguido por β -cariofileno (15,41%), α -pineno (14,07%) e biciclogermacreno (10,43%).

Quanto a atividade biológica, a presença de um constituinte químico, seja majoritário ou não, pode intensificar ou até mesmo inibir a toxicidade de uma planta. Deste modo, ao avaliar o potencial de uma planta para ser usada em programas de controle de vetores e sua relação com os constituintes químicos, é preciso que seja considerado o sinergismo e o antagonismo entre os constituintes.

4. CONCLUSÕES

O óleo essencial de *Croton argyrophyllus* testado na concentração de 12 mg·mL⁻¹ interferiu na eclosão dos ovos do *Aedes aegypti*, provavelmente pela tolerância do ovo em proteger o embrião de substâncias tóxicas nesta fase. No entanto, quando os ovos foram expostos ao alimento (ração de peixe) houve eclosão.

A busca por compostos bioativos que interrompam ou evitem o desenvolvimento embriológico do *A. aegypti*, a exemplo dos inseticidas botânicos, é pertinente e urgente, em virtude da sua importância como transmissor de patógenos.

5. AGRADECIMENTOS:

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais (PPGCA) e aos órgãos de fomento: CAPES, FAPESB, CNPq e a UESB.

6. REFERÊNCIAS:

1. Adams, R. P. (2007). Identification of essential oil components by gas chromatography/ mass spectrometry, 4th ed., Allured Publishing Corporation, Carol Stream, IL USA.
2. André W. P. P.; Ribeiro W. L. C.; Oliveira L. M. B.; Macedo I. T. F.; Rondon F. C. M. and Bevilacqua C. M. L. (2018). Óleos essenciais e seus compostos bioativos no controle de nematoides gastrintestinais de pequenos ruminantes. *Acta Scientiae Veterinariae*, 46: 1522.
3. Anjos, Q. Q. A.; Silva, S. L. C.; Silva, D. C.; Gualberto, S. A.; Santos, F. R.; Carvalho, M. G. and Sousa, D. L. (2018). Composição química do óleo essencial da parte aérea de *Croton tetradenius* (Euphorbiaceae) e a sua bioatividade

sobre *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) em relação em diferentes períodos de coleta. *Periódico Tchê Química.*, 15(30), 364-379.

4. Araujo, S. S.; Santos, M. I. S.; Dias, A. S.; Ferro, J. N. S.; Lima, R. N.; Barreto, E. O.; Alves, P. B.; Santana A.E.G.; Thomazzi S. M.; Antonioli A. R. and Estevam C.S. (2014). Composição química e análise de citotoxicidade do óleo essencial das folhas de *Croton argyrophyllus* Kunth. *Journal of Essential Oil Research*. 26(6), 446-451.
5. Aznar V. R.; Otero M. J.; de Majo M. S.; Fischer S, and Solari H. G. (2013). Modeling the complex hatching and development of *Aedes aegypti* in temperate climates. *Ecological Modelling*. 253, 44-55.
6. Bakkali F.; Averbeck S.; Averbeck D. and Idaomar M.(2008). Biological effects of essential oil–Review. *Food and Chemical Toxicology*. 46(2), 446-475.
7. Beserra, E. B.; Castro Jr. F. P.; Santos, J. W.; Santos, T. S. and Fernandes, C. R. M.(2006). Biologia e exigências térmicas de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera: Culicidae) provenientes de quatro regiões bioclimáticas da Paraíba. *Neotropical Entomology*. 35(6), 853-860.
8. Bilia, A. R.; Guccione C.; Isacchi B.; Righeschi C.; Firenzuoli F. and Bergonzi M. C. (2014). Essential oils loaded in nanosystems: a developing strategy for a successful therapeutic approach. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine: eCAM*. 651593, 29.
9. Boyer, S. (2012). Sterile insect technique: targeted control without insecticide. *Medecine Tropicale: Revuedu Corps de sante colonial*. , 72, 60-62.
10. Brito, S. S. S.; Silva, F.; Malheiro, R.; Baptista, P. and Pereira, J. A. (2018). *Croton argyrophyllus* Kunth and *Croton heliotropiifolius* Kunth: Phytochemical characterization and bioactive properties. *Industrial Crops and Products*. 113, 308-315.
11. Calado, D. C. and Silva, M. A. (2002)

- Avaliação da influência da temperatura sobre o desenvolvimento de *Aedes albopictus*. *Revista de Saúde Pública*. 36(2), 173-179.
12. Campbel, B. E.; Pereira, R. M. and Koehler, P. G. (2016) Complications with controlling insect eggs. *Insecticides Resistance*. InTech. 437p.
  13. Carvalho, K. S.; Silva, S. L. C.; Souza, I. A.; Gualberto S. A.; Cruz, R. C. D.; Santos, F. R. and Carvalho, M. G. (2016) Toxicological evaluation of essential oil from the leaves of *Croton tetradenius* (Euphorbiaceae) on *Aedes aegypti* and *Mus musculus*. *Parasitology Research*. 115 (9), 3441-3448.
  14. Coitinho, R. L. B. C.; de Oliveira J. V.; Junior M. G. C. G. and Câmara C. A. G. (2011). Toxicidade por fumigação, contato e ingestão de óleos essenciais para *Sitophilus zeamais* Motschulsky 1885 (Coleoptera: Curculionidae). *Ciência e Agrotecnologia*. 35(1), 172-178.
  15. Colpo, J. F.; Jahnke, S. M. and Füller, T. N. (2014). Potencial inseticida de óleos de origem vegetal sobre *Grapholita molesta* (Busck) (Lepidoptera: Tortricidae). *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*. 16, (2), 182-188.
  16. Cruz R. C. D.; Silva S. L. C. E.; Souza I. A.; Gualberto S. A.; Carvalho K. S.; Santos F. R. and Carvalho M. G. (2017). Toxicological Evaluation of Essential oil from the leaves of *Croton argyrophyllus* (Euphorbiaceae) on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) and *Mus musculus* (Rodentia:Muridae). *Journal of Medical Entomology*. 54(4):985-993.
  17. De Lima, G. P. G., de Souza, T. M., de Paula Freire, G., Farias, D. F., Cunha, A. P., Ricardo, N. M. P. S. and Morais S. M. Carvalho, A. F. U. (2013). Further insecticidal activities of essential oils from *Lippia sidoides* and *Croton* species against *Aedes aegypti* L. *Parasitology Research*. 112(5), 1953-1958.
  18. Dieng H.; Satho T.; Meli N. K. K. B.; Abang F.; Nolasco-Hipolito C.; Hakim H.; Miake F.; Zuharah W.F.; Kassim N. F.A.; AbMajid A.H.; Morales Vargas R. E.; Morales N.P. and Noweg G. T. (2018). Occurrence of sweet refuse at disposal sites: rainwater retention capacity and potential breeding opportunities for *Aedes aegypti*. *Environmental Science and Pollution Research*. 25(14), 13833-13843.
  19. Diniz, D. F. A.; Albuquerque, C. M. R.; Oliva, L. O.; Melo-Santos, M. A. V. and Ayres, C. F. J. (2017). Diapause and quiescence: dormancy mechanisms that contribute to the geographical expansion of mosquitoes and their evolutionary success. *Parasites and Vectors*. 10(1), 310.
  20. Ferreira D. A. C.; Degener C. M.; Marques-Toledo C. A.; Bendati M. M.; Fetzer L. O.; Teixeira C. P. and Eiras Á. E. (2017). Meteorological variables and mosquito monitoring are good predictors for infestation trends of *Aedes aegypti*, the vector of dengue, chikungunya and zika. *Parasites and Vectors*. 10, 78.
  21. Figueiredo, R. C.; Rocha, W. C. and De Freitas, A. D. G. (2018). Efeito inseticida do óleo essencial e extratos etanólicos das folhas de mastruz (*Chenopodium ambrosioides* L.) sobre o gorgulho do milho (*Sitophilus zeamais* Mots.) *Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde*. 22(2), 80-84.
  22. Forattini O. P. and Brito M. (2003) Reservatórios domiciliares de água e controle do *Aedes aegypti*. *Revista Saúde Pública*. 37, 676-677.
  23. Gomes, P. R. B.; Silva, A. L. S.; Pinheiro, H. A.; Carvalho, L. L., Lima, H. S.; Silva, E. F.; Silva, R. P., Louzeiro, C. H.; Oliveira, M. B. and Filho, V. E. M.(2016). Avaliação da atividade larvicida do óleo essencial do *Zingiber officinale* Roscoe (gengibre) frente ao mosquito *Aedes aegypti*. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*. 18(2, Suppl. 1), 597-604.
  24. Macoris M. L. G.; Andrighetti M. T. M.; Wanderley D. M. V. and Ribolla P. E. M. (2014). Impact of insecticide resistance on the field control of *Aedes aegypti* in the State of São Paulo. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 47(5): 573-578.

25. Marcondes C. B. and Ximenes M. F. F. M. (2015). Zika virus in Brazil and the danger of infestation by *Aedes* (Stegomyia) mosquitoes *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 49(1):4-10
26. McGraw, E. A. and O'Neill, S. L.. (2013). Beyond insecticides: new thinking on an ancient problem. *Nature Reviews-Microbiology*. 11(3), 181.
27. Oehler, E.; Watrin, L.; Larre, P.; Leparc-Goffart, I.; Lastere, S.; Valor, F.; Baudouin, L.; Mallet, H.; Musso, D. and Ghawche, F. (2014). Zika virus infection complicated by Guillain-Barré syndrome – case report, French Polynesia, December 2013. *EuroSurveillance* 19, 7–9.
28. Pavea, R. (2015). Essential oils for the development of eco-friendly mosquito larvicides: A review. *Industrial Crops and Products*. 76, 174-187.
29. Ponnusamy, L.; Böröczky, K.; Wesson, D. M.; Schal, C. and Apperson, C. S. (2011) Bacteria Stimulate Hatching of Yellow Fever Mosquito Eggs. *PLoS One*. 6(9), 24409.
30. Rezende, G. L.; Martins, A. J.; Gentile, C.; Farnesi, I. C.; Pelajo-Machado, M.; Peixoto, A. A., and Valle, D. (2008). Embryonic desiccation resistance in *Aedes aegypti* presumptive role of the chitinized serosal cuticle. *BMC Developmental Biology*. 8(1), 1-14.
31. Santos, A. S.; Alves, S. M.; Figueiredo, F. J. and Rocha Neto, G. (2004). Rendimento e qualidade físico-química de óleo essencial extraído de diferentes composições da biomassa aérea de pimenta longa. *Embrapa*. 1-6.
32. Silva, O. E. and Poletto, C. (2012). Monitoramento de *Aedes albopictus* em pequenas comunidades. *Uningá Review*. 10(1), 25-32.
33. Silva, V. C.; Serra-Freire, N. M.; Silva, J. D. S.; Scherer, P. O.; Rodrigues, I.; Cunha, S.P. and Alencar, J. (2009). Estudo comparativo entre larvitrap e ovitrap para a avaliação da presença de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), em Campo Grande estado do Rio de Janeiro. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 42, 730-731.
34. Simões C.M.O and Spitzer V. (2004). Óleos voláteis In: *Farmacognosia da Planta ao medicamento* 5.ed.Porto Alegre..467-495.
35. Sokal, R. R. and Rohlf F. J. (1995) Biometry, 3ª Edição. W. H. Freeman and Company, NewYork. 887p.
36. Slatko B. E.; Luck A. N.; Dobson S. I. and Foster J. M. (2014). Wolbachia endosymbiont and human disease control. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 195, 88-95.
37. Tennyson, S.; Ravindran, K. J. and Arivoli, S.; (2011). Screening of plant extracts for ovicidal against *Culex quinquefasciatus* say (Diptera: Culicidae). *Elixir Applied Botany*. 40, 5456-5460.
38. Vega-Rúa A.; Zouache K.; Girod R.; Failloux AB, and Lourenço-de-Oliveira R. (2014) High level of vector competence of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from ten American countries as a crucial factor in the spread of Chikungunya virus. *Journal Virology*. 89(14), 6294-306.

Figura 1. Mapa de localização indicando com seta amarela o local de coleta das folhas de *Croton argyrophyllus*, na Floresta Nacional de Contendas do Sincorá, Bahia, Brasil.

Figura 2. Cromatograma obtido com detector de ionização de chamas da amostra do óleo essencial das folhas de *Croton argyrophyllus* coletadas na Floresta Nacional Contendas do Sincorá - BA, Brasil, no mês de maio de 2017.

Figura 5. Ovo do *Aedes aegypti* oriundo da linhagem Rockefeller (Aumento 8 x10).

Figura 6. Taxa acumulada de eclosão de larvas do *Aedes aegypti* em função do tempo de exposição dos ovos à solução aquosa em Tween 80 a 1% do óleo essencial obtido das folhas de *Croton argyrophyllus* (12 mg mL^{-1}) e controles (água deionizada e Tween 80), com tempo de observação de eclosão das larvas reportado nas figuras (A) e (B) de 4 a 180 horas e (C) de 192 a 336 horas

Figura 7. Média acumulada ($\pm$ erro padrão) de eclosão de larvas do *Aedes aegypti* em função do tempo de exposição dos ovos à solução aquosa em Tween 80 a 1% do óleo essencial de *Croton argyrophyllus* (12 mg mL^{-1}) e controles antes e depois da adição de ração. Os quadrados fechados representam o período antes da adição de ração e os abertos representam após a adição da ração de peixe. As diferentes letras representam diferenças significativas baseadas no Pós-teste de Tukey.

Tabela 1. Composição química do óleo essencial obtido das folhas secas de *C. argyrophyllus*

Constituintes	IRL ¹	IKC ²	(%) ³
Monoterpenos hidrocarbonados			
Canfeno	930	954	0,03
β-Felandreno	934	1029	0,59
β-Pineno	943	979	7,18
Mirceno	956	990	0,42
α-Felandreno	980	1002	1,93
p-Cimeno	1010	1024	1,53
α-Pineno	1016	939	0,59
(E)-β-Ocimeno	1031	1050	1,41
γ-Terpineno	1039	1059	1,47
Monoterpenos oxigenados			
Terpineno-4-ol	1174	1177	0,73
Verbenona	1196	1205	0,59
Sesquiterpenos hidrocarbonados			
β-Bourboneno	1392	1288	0,72
β-Elemenol	1399	1390	3,47
β-Cariofileno	1432	1419	14,69
α-Humuleno	1464	1454	4,03
Biciclogermacreno	1509	1500	15,46
Sesquiterpenos oxigenados			
Óxido de cariofileno	1596	1583	1,70
Espatulenol	1603	1578	1,21
Outros constituintes			
Hexanal	804		0,05
(2E)-Hexenal	856	855	0,12
(4Z)-Hexenol	860	877	0,03
n-Hexanol	870	870	0,03
Heptanal	905	902	0,05
α-Acetato de Fenchil	1291	1220	0,19
Acetato de bornila	1345	1288	0,22
Monoterpenos hidrocarbonados			15,15
Monoterpenos oxigenados			1,32
Sesquiterpenos hidrocarbonados			38,37
Sesquiterpenos oxigenados			2,91
Outros constituintes			0,69
Rendimento do óleo essencial			0,35

¹ Índice de retenção encontrado na literatura² Índice de Kovats calculado³ Porcentagem do constituinte encontrado no óleo