

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
NÚCLEO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA
PARASITÁRIA
MESTRADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

**Atividade Repelente e Larvicida de *Xylopi* *laevigata*, *X.*
frutescens (Annonaceae) e *Lippia pedunculosa* (Verbenaceae)
Sobre Mosquitos *Aedes aegypti*
(Diptera –Culicidae).**

ANA MÉRCIA DIAS NASCIMENTO

SÃO CRISTÓVÃO
2014

ANA MÉRCIA DIAS NASCIMENTO	<i>Atividade Repelente e Larvícida de Xylopia laevigata, X. frutescens (Annonaceae) e Lippia pedunculosa (Verbenaceae) Sobre Mosquitos Aedes aegypti (Diptera – Culicidae).</i>		UFS 2014
--	--	--	----------------------------

ANA MÉRCIA DIAS NASCIMENTO

**Atividade Repelente e Larvicida de *Xylopi* *laevigata*, *X.*
frutescens (Annonaceae) e *Lippia pedunculosa* (Verbenaceae)
Sobre Mosquitos *Aedes aegypti*
(Diptera –Culicidae).**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária da Universidade Federal de Sergipe, como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Biologia Parasitária.

Área de Concentração:
Biologia Parasitária

Orientada:
Ana Mércia Dias Nascimento

Orientadora:
Prof^a Dr^a Roseli La Corte dos Santos

Co-orientador:
Prof. Dr. Ricardo Scher

SÃO CRISTÓVÃO
2014

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Nascimento, Ana Mércia Dias

N244a

Atividade repelente e larvicida de *Xylopi* laevigata, *X. frutescens* (Annonaceae) e *Lippia pedunculosa* (Verbenaceae) sobre mosquitos *Aedes aegypti* (Diptera-Culicidae) / Ana Mércia Dias Nascimento ; orientadora Roseli La Corte dos Santos. – São Cristóvão, 2014.

64 f. : il.

Dissertação (mestrado em Biologia Parasitária) – Universidade Federal de Sergipe, 2014.

1. *Aedes aegypti* – Controle. 2. Essências e óleos essenciais. 3. Inseticidas. I. Santos, Roseli La Corte dos, orient. II. Título.

CDU 595.771

FOLHA DE APROVAÇÃO

Ana Mércia Dias Nascimento

Atividade Repelente e Larvicida de *Xylopia laevigata*, *X. frutescens* (Annonaceae) e *Lippia pedunculosa* (Verbenaceae) Sobre Mosquitos *Aedes aegypti* (Diptera –Culicidae).

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária da Universidade Federal de Sergipe, como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Biologia Parasitária.

Área de Concentração: Biologia Parasitária;

Orientadora: Prof^a Dr^a Roseli La Corte dos Santos

Co-orientador: Prof. Dr. Ricardo Scher

Aprovada em: 10 / 03 / 2014

Banca Examinadora

Prof. Dr. Marcelo da Costa Mendonça

Instituição: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa/SE

Prof.(a) Dr.(a) Rogéria de Souza Nunes

Instituição: Departamento de Farmácia – Universidade Federal de Sergipe

Prof. Dr. Ricardo Scher

Instituição: Departamento de Fisiologia – Universidade Federal de Sergipe

Prof. Dr. Ricardo Scher

“A vida é difícil, eu o sei; ela se compõe de mil nadadas que são picadas de alfinetes que acabam por ferir; mas é preciso considerar os deveres que nos são impostos, as consolações e as compensações que temos por outro lado, e, então veremos que as bênçãos são mais numerosas que as dores. O fardo parece menos pesado quando se olha do alto, do que quando se curva a fronte para o chão.”

Allan Kardec

“Ela acreditava em anjos, e, porque acreditava, eles existiam...”

Clarisse Lispector

Aos meus pais, Márcia e Manoel, aos meus irmãos, Márcio e Mayara e à minha avó
Lindaura. A vocês devo todas as minhas conquistas.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, meu mestre e guia espiritual, por conduzir os meus passos durante a minha jornada na vida terrena.

Aos meus pais, Márcia e Manoel, aos meus irmãos, Márcio e Mayara e a minha avó Lindaura pelo amor, carinho, compreensão e paciência.

À prof. Dr^a Roseli La Corte, pela orientação, dedicação e oportunidades, as quais foram indispensáveis ao meu desenvolvimento profissional.

À Meire do Laboratório Central de Saúde Pública de Sergipe - LACEN e as equipes das Secretarias Municipais de Saúde de Umbaúba, Ribeirópolis e Poço Redondo que forneceram todo apoio para execução do meu projeto inicial.

Ao prof. Dr. Ricardo Scher por, gentilmente, fornecer auxílio na orientação deste trabalho.

Aos professores Sócrates Cavalcanti e Emmanoel Vilaça pela parceria, colaboração e fornecimento dos óleos essenciais, imprescindíveis ao desenvolvimento desta pesquisa.

À Leociley que, gentilmente, forneceu os dados referentes à atividade larvívora da *L. pedunculosa*.

À toda equipe do Laboratório de Entomologia e Parasitologia Tropical – LEPaT: às funcionárias Dani e Lenuce, pela disponibilidade em me ajudar nos trabalhos laboratoriais; às professoras Luciene e Satie pelas dicas, auxílio e palavras de carinho. As minhas queridas colegas de trabalho: Lynna, Yrna, Tirzah, Jucy e Letícia. E aos meus amados calouros: Lucas, Sara e Polly, que além de fornecerem todo o auxílio na execução das atividades do insetário, compartilharam comigo medos, angústias, confidências e alegrias!

Aos meus ilustres colegas de classe, em especial: Israel, Mariana e Alda, os quais tornaram essa jornada menos árdua. Amigos, o que seria desse curso de mestrado sem vocês?!

Agradeço, de todo coração, a todas as pessoas que, num nobre gesto de amor ao próximo, foram voluntárias nesta pesquisa: meus amigos pessoais: Raquel, Thiga e Chirstean; (todos) os meus amigos do laboratório e aos amigos dos meus amigos, alunos dos cursos de biologia e farmácia que também contribuíram para a pesquisa.

As minhas amigas Mônica, Glaciane e Adriana por me incluírem em suas orações e por sempre torcerem por mim.

Agradeço, especialmente, à Túlio e à Thales, que além de voluntários oficiais nos experimentos de repelência, estiveram ao meu lado durante a execução de todo o trabalho. Meninos, eu não conseguiria conduzir esse trabalho sem vocês!

À CNPq pelo apoio financeiro.

A todos àqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a execução deste trabalho, os meus mais sinceros agradecimentos!!

RESUMO

NASCIMENTO, A.M.D.; **Atividade Repelente e Larvicida de *Xylopi* *laevigata*, *X. frutescens* (Annonaceae) e *Lippia pedunculosa* (Verbenaceae) Sobre Mosquitos *Aedes aegypti* (Diptera–Culicidae)**, 2014. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2014.

A dengue é uma importante arbovirose transmitida ao homem por meio da picada do mosquito fêmea *Aedes aegypti*. Como não há vacinas, o controle da transmissão da doença se dá, principalmente, com a redução da população de mosquitos e a adoção de medidas de proteção individual que impeçam o contato entre hospedeiros e vetores. Diante do agravamento do processo de resistência aos inseticidas químicos, os produtos de origem vegetal se apresentam como alternativas mais seguras para o controle integrado de doenças vetoriais endêmicas. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade repelente e larvicida dos óleos essenciais extraídos das plantas *Xylopi laevigata*, *Xylopi frutescens* e *Lippia pedunculosa*, bem como seus constituintes voláteis, óxido de piperitenona e r-limoneno sobre mosquitos *Ae. aegypti*. A atividade larvicida foi investigada a partir da exposição de larvas de terceiro estágio às diferentes concentrações dos óleos essenciais e componentes voláteis. Após 24 horas de exposição foram contabilizadas as larvas mortas, considerando mortalidade a ausência de mobilidade ou incapacidade da larva em se mover até a superfície da água. A ação repelente foi observada a partir da supressão de pousos dos mosquitos sobre a pele humana. Os óleos essenciais e compostos químicos foram diluídos em etanol e aplicados diretamente sobre a pele dos voluntários. Para cada produto foram realizados doze testes, nos quais as concentrações variavam de 0,1 à 10%. Tanto o óleo essencial obtido a partir da *L. pedunculosa* quanto os seus principais compostos voláteis mostraram-se tóxicos para larvas de *Ae. aegypti*, apresentando CL50 inferior à 60 ppm. Em contrapartida, as plantas do gênero *Xylopi* apenas mostraram-se tóxicas para as larvas quando em concentrações superiores à 1000 ppm, fato que inviabiliza a sua utilização em larga escala. No que diz respeito à ação repelente, todos os produtos avaliados forneceram algum grau de proteção contra pouso de mosquitos adultos sobre a pele humana. Entretanto, apenas o óleo essencial da *L. pedunculosa* e o óxido de piperitenona foram capazes de fornecer 100% de proteção, quando testados em concentrações inferiores a 1%. Apesar de eficaz na repelência contra o mosquito transmissor da dengue, o óleo essencial da *L. pedunculosa* apresentou toxicidade sobre a pele humana. Portanto, mais estudos fazem-se necessários a fim de que sejam elaboradas formulações de uso tópico capazes de veicular adequadamente os constituintes químicos dos óleos por um prolongado período de tempo.

Palavras-Chave: Controle vetorial, Óleos essenciais, Repelentes, Larvicidas.

ABSTRACT

NASCIMENTO, A.M.D.; **Evaluation of eRepellent and Larvicidal Activities of *Xylopia laevigata*, *X. frutescens* (Annonaceae) and *Lippia pedunculosa* (Verbenaceae) over *Aedes aegypti* Mosquitoes (Diptera–Culicidae)**, 2014. Master Dissertation. Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2014.

Dengue is an important arboviral disease transmitted to humans through the bite of female mosquito *Aedes aegypti*. As there is no vaccine available, the control of disease occurs, mainly, by the reduction of mosquito population and personal protection to prevent contact between hosts and vectors. Given the increasing process of chemical resistance to insecticides, natural products emerge as safer alternatives for integrated control of endemic diseases. The aim of this work was to evaluate the larvicidal and repellent activities of essentials oils extracted from *Xylopia laevigata*, *Xylopia frutescens* and *Lippia pedunculosa* and of their majority compounds, piperitenone oxide and r-limonene. The larvicidal activity was investigated by exposure of third instar larvae to different concentrations of essentials oils. After 24 hours of exposition, larvae showing lack of mobility or inability to move to water's surface were considered as dead. The repellency effect was based on the suppression of mosquitoes landing on human skin. Essentials oils were diluted in ethanol and applied directly over the volunteer's skin. For each essential oil were performed 12 tests, in which oils concentrations ranged from 0.1 to 10%. The essential oil of *L. pedunculosa* and its major volatile compounds were shown to be toxic for *Ae. aegypti* larvae, with CL50 lower than 60 ppm. In the other hand, plants of *Xylopia* genus just proved to be toxic to *Ae. aegypti* when in concentrations higher than 1000 ppm. This fact make their use in large-scale unfeasible. All plants tested provided some degree of protection against mosquitoes landing. However only the essential oil of *L. pedunculosa* and piperitenone oxide provided 100 % of protection against mosquito landings when tested in concentrations lower than 1%. Although its performamnce against dengue mosquitoes, the essential oil of *L. pedunculosa* shows toxicity the human skin. Therefore, further studies are required to get formulations which are able to provide longer time protection.

Key words: Vector control, Essentials oils, Repellents, Larvicidal.

LISTA DE ABREVIATURAS

OMS	Organização Mundial da Saúde
DENV	Sorotipo viral da dengue
DC	Dengue Clássico
FHD	Febre Hemorrágica da Dengue
SCD	Síndrome do Choque da Dengue
PAHO	Organização Pan Americana de Saúde
AChE	Acetilcolinesterase
FUNASA	Fundação Nacional de Saúde
Bti	<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> .
IGRs	Reguladores de crescimento de insetos
PNCD	Programa Nacional de Controle da Dengue
DEET	N,N-dietil-3-metilbenzamida
CDC	Centro de Controle e Prevenção de Doenças
EO	Óleo Essencial
CG	Cromatografia Gasosa
EM	Espectrômetro de Massa
FID	Detector de Ionização de Chamas
LPMAI	Amostra de <i>Lippia pedunculosa</i> coletada em maio
CCDP	Cromatografia em Camada Delgada Preparativa
OXIPIP	Óxido de piperitenona
LEPaT	Laboratório de Entomologia e Parasitologia Tropical
DMO	Departamento de Morfologia
CL	Concentração Letal
ppm	Partes por milhão
ED	Dose Efetiva
RD	Dose Resposta

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição química dos óleos essenciais de <i>Lippia pedunculosa</i> , <i>Xylopi</i> <i>laevigata</i> e <i>X. frutescens</i> . _____	27
Tabela 2: Atividade larvicida do óleo essencial de <i>Lippia pedunculosa</i> e compostos voláteis r- Limoneno e óxido de piperitenona sobre larvas de terceiro estágio de mosquitos <i>Ae. aegypti</i> . _____	28
Tabela 3: Atividade repelente de óleos essenciais de <i>Xylopi</i> <i>laevigata</i> , <i>X. frutescens</i> e <i>Lippia</i> <i>pedunculosa</i> contra mosquitos <i>Aede</i> . <i>aegypti</i> . _____	29
Tabela 4: Atividade repelente contra mosquitos <i>Ae. aegypti</i> do óleo essencial de <i>L.</i> <i>pedunculosa</i> e seus compostos químicos r-Limoneno e óxido de Piperitenona. _____	30

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Esquema de isolamento do óxido de piperitenona. _____ 19
- Figura 2:** Manutenção da colônia de *Aedes aegypti* em condições laboratoriais: a) estágios larvais; b) gaiola para criação de mosquitos adultos, com alimentador e ovipositor (visão externa); c) repasto sanguíneo dos mosquitos fêmeas em ratos Wistar; d) cartela contendo ovos. _____ 20
- Figura 3:** a) Gaiola para manutenção de mosquitos adultos destinados aos testes de repelência. b) Ensaio de repelência. Braço esquerdo do voluntário inserido na gaiola destinada aos testes de repelência contendo 50 mosquitos fêmeas. _____ 23
- Figura 4:** Repelência causada pelo aumento da concentração dos óleos essenciais de *X. laevigata* (a) e *X. frutescens* (b). Os círculos pequenos representam a abrangência da repelência em 12 réplicas ($\pm$ IC); a linha contínua representa o ajuste da curva de dose-resposta. _____ , 29
- Figura 5:** Repelência causada pelo aumento da concentração dos óleos essenciais de *L. pedunculosa*. Os círculos pequenos representam a abrangência da repelência em 12 réplicas ($\pm$ IC); A linha contínua representa o ajuste da curva de dose-resposta. _____ 30
- Figura 6:** Repelência causada pelo aumento da concentração dos compostos químicos r- Limoneno (a) e Óxido de piperitenona (b). Os círculos pequenos representam a abrangência da repelência em 12 réplicas ($\pm$ IC); A linha contínua representa o ajuste da curva de dose-resposta. _____ 31

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
1. INTRODUÇÃO.....	3
1.1 Ecologia e controle de <i>Aedes aegypti</i>	6
1.2 Controle das formas larvárias de <i>Aedes</i>	7
1.3 Prevenção contra picadas de mosquitos	10
1.4 Inseticidas e Repelentes de origem vegetal	11
2. OBJETIVOS	16
2.1 Geral	16
2.3 Específicos.....	16
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
3.1. Coleta de acesso aos espécimes vegetais.....	17
3.2. Processamento e obtenção dos Óleos Essenciais (EO)	17
3.3. Cromatografia Gasosa e Espectrometria de Massas (GC/EM-FID).....	18
3.4. Identificação dos constituintes.....	18
3.5. Obtenção dos constituintes majoritários.....	18
3.6. Manutenção da colônia de mosquitos.....	19
3.7. Avaliação da Atividade Larvicida	21
3.7.1 Seleção de larvas de <i>Ae. aegypti</i>	21
3.7.2. Preparação da emulsão estoque	21
3.7.3. Bioensaio	21
3.8 Avaliação da Atividade Repelente	22
3.8.1 Seleção de voluntários	22
3.8.2 Bioensaios.....	22
a) Determinação da Dose Efetiva.....	23
3.9. Análise de Dados	24
3.9.1. Atividade Larvicida	24
3.9.2. Atividade Repelente	24
4. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	25
5. RESULTADOS	26

5.1. Análises cromatográficas dos EO	26
5.2. Atividade Larvícida	26
5.3 Atividade Repelente	28
6. DISCUSSÃO	32
7. CONCLUSÃO.....	37
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38
APÊNDICE I.....	47

1. INTRODUÇÃO

As doenças transmitidas por insetos permanecem como importantes causas de mortalidade em todo o mundo, principalmente nos países de clima tropical (MIOT et al, 2004). Os insetos são os principais agentes responsáveis pela manutenção do ciclo de diversas doenças infecciosas e parasitárias, como malária, febre amarela, filarioses, tripanossomíase, oncocercose e dengue. Estima-se que doenças transmitidas por insetos vetores sejam responsáveis por causar doenças em mais de 1,5 milhões de pessoas, anualmente (HILL et al, 2005).

Entre as doenças transmitidas por mosquitos vetores, a dengue se destaca por ser uma arbovirose de disseminação rápida, fato que a caracteriza como um dos principais problemas de saúde pública no mundo. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a cada ano, 80 milhões de pessoas se infectam, cerca de 550 mil doentes necessitam de hospitalização e 20 mil chegam a óbito, em consequência da dengue (WHO, 2009a).

A infecção pelo vírus dengue provoca doença de amplo espectro clínico, que pode se manifestar desde infecção inaparente, quadros sintomáticos de dengue clássico (DC), febre hemorrágica da dengue (FHD) e síndrome do choque da dengue (SCD), cuja gravidade pode levar o paciente a óbito. Embora a susceptibilidade ao vírus seja universal, indivíduos infectados com um sorotipo viral desenvolvem imunidade permanente e específica para o mesmo tipo viral infectante e temporária para os demais. Os mecanismos pelos quais o paciente pode evoluir ao quadro de FHD ainda não estão bem estabelecidos, mas se sabe que fatores epidemiológicos e individuais, tais como infecção secundária, etnia e enfermidades crônicas, podem determinar a severidade da doença (BRASIL, 2009; WHO, 2009a).

A transmissão do vírus ao homem, único reservatório vertebrado conhecido, se dá a partir da picada de mosquitos infectados do gênero *Aedes*. As principais espécies envolvidas na transmissão da arbovirose são *Aedes aegypti* e *Ae. albopictus* e, embora ambos se utilizem dos mesmos criadouros artificiais, em áreas de grande concentração humana, *Ae. albopictus* apresenta papel secundário na transmissão da dengue nas Américas (OLIVEIRA & BIAZOTO, 2012).

Ae. aegypti apresenta ampla distribuição nas regiões tropicais e subtropicais do planeta, ocorrendo em mais de 100 países situados no Sudeste Asiático, Américas (Sul, Central e Norte), África, Pacífico e Mediterrâneo (WHO, 2009a). As características intrínsecas ao vetor, como hábito sinantrópico e peridomiciliar, alto grau de antropofilia e atividade hematofágica diurna conferem a *Ae. aegypti* grande importância epidemiológica na transmissão de arboviroses, como dengue e febre amarela urbana (UTSUNOMYIA et al, 2008; OLIVEIRA et al, 2007).

Os mosquitos da espécie *Ae. aegypti* são dípteros, pertencentes à família Culicidae, subfamília Culicinae, caracterizados pela presença de aparelho bucal tipo picador (sugador - pungitivo). São insetos holometábolos, que apresentam ciclo de vida constituído por ovo, quatro estágios larvais (L1-L4), pupa e adulto alado. Na natureza, os ovos de *Ae. aegypti* dão origem às larvas após um período médio de dois a quatro dias. As larvas movimentam-se ativamente e se alimentam dos nutrientes disponíveis no meio e, entre o décimo e vigésimo dia de vida, transformam-se em pupas, as quais darão origem aos insetos adultos. A emergência do inseto alado se dá a partir de uma fenda que se abre no cefalotórax da pupa, fase bastante delicada na vida do mosquito. Os adultos recém-emergidos refugiam-se em abrigos protegidos da luz e do vento, para que haja a oxidação e enrijecimento da quitina, e em seguida, dispersam-se a fim de se alimentar de açúcares ou néctar de plantas. Após 24 horas, machos e fêmeas estão aptos a copular (NEVES, 2010).

Para que haja a maturação dos ovos e continuidade do ciclo biológico, é necessário que o mosquito fêmea realize alimentação sanguínea e, de maneira geral, são necessárias várias picadas antes que a oogênese se complete. É justamente durante o repasto sanguíneo que pode ocorrer a infecção do mosquito pelo vírus dengue. Se o repasto sanguíneo for realizado em um hospedeiro infectado, durante a fase de viremia, o mosquito poderá adquirir o vírus dengue e transmiti-lo a outro hospedeiro suscetível após um período de 8 a 12 dias, denominado incubação extrínseca (BRASIL, 2009; WHO, 2009a).

A infecção pelo vírus dengue parece afetar a longevidade, o comportamento alimentar e a fecundidade de mosquitos *Ae. aegypti*. Sylvestre e colaboradores (2013) observaram que mosquitos infectados levam mais tempo para realizar o repasto sanguíneo, reduzem sua capacidade de oviposição e têm sua longevidade reduzida à metade (SYLVESTRE et al, 2013). Entretanto, os danos causados aos mosquitos, por si só, não são suficientes para limitar a disseminação viral. Ovos de mosquitos *Ae. aegypti* já foram encontrados naturalmente infectados simultaneamente por diferentes sorotipos do vírus

dengue, constatando que a transmissão transovariana também é um evento possível (PESSANHA et al, 2011).

Embora haja divergência, inquéritos sorológicos indicam que as primeiras infecções causadas pelo vírus dengue ocorreram em meados da década de 1920, momento em que aconteceu uma epidemia importante em Durban, África do Sul (WHO, 2009a). Até meados de 1990, o sudoeste da Ásia foi a região mais fortemente afetada pela infecção, desde então a incidência da doença vem aumentando progressivamente, principalmente, nos países das Américas central e do Sul (TEIXEIRA et al, 2009).

A primeira epidemia de dengue no Brasil, comprovada clínica e laboratorialmente, ocorreu em Roraima no início da década de 1980, causada pelos sorotipos 1 e 4. Mas, foi no ano de 1986, com a nova epidemia causada pelo DENV 1 na cidade do Rio de Janeiro, que a doença se tornou o principal problema de saúde pública do país. A localização da cidade e sua proximidade com os grandes centros urbanos, além do intenso fluxo de pessoas, permitiu que a doença fosse dispersa por diversos Estados das regiões sudeste, nordeste e centro-oeste do país (BRASIL, 2009).

Após um período de silenciamento, houve a introdução do DENV 2 no país, identificado inicialmente no Estado do Rio de Janeiro. Neste momento também foram registrados os primeiros casos de FHD, fato que agravou a situação epidemiológica no Brasil. O DENV 3 foi identificado pela primeira vez no ano 2000 no Rio de Janeiro e, posteriormente no Estado de Roraima. Em 2002 foi registrada a maior incidência da doença, reflexo da introdução do novo sorotipo viral, com cerca de 697.000 casos confirmados. Desde então, há a circulação simultânea dos sorotipos 1, 2 e 3 em todos os vinte e quatro Estados da federação (BRASIL, 2009; TEIXEIRA et al, 2009; CÂMARA et al, 2007). Mais recentemente foi observada a circulação do DENV 4 em algumas regiões do país, fato que pode contribuir para a incidência das formas graves da doença (FIGUEREDO et al, 2011).

A gravidade da infecção causada pelo Vírus Dengue tem estimulado o desenvolvimento de pesquisas para a produção de vacinas e, algumas delas, inclusive, já começam a ser testadas em humanos (AMAKU et al, 2012; TRINDADE et al, 2008; SILVA & RICHTMANN, 2006). Mas, a recente descoberta da existência e circulação do DENV 5, durante o surto ocorrido no ano de 2007, na Malásia, pode comprometer o desenvolvimento de uma vacina protetora (NORMILE, 2013). Portanto, a prevenção ou redução na transmissão do vírus ainda depende fundamentalmente do controle do vetor, o elo mais vulnerável na cadeia epidemiológica (WHO, 2009a; OLIVEIRA et al, 2007).

Na década de 1940, a Organização Pan Americana de Saúde (PAHO) deu início a um programa de erradicação do *Ae. aegypti*, a fim de controlar a transmissão da febre amarela urbana no continente Americano. A iniciativa conseguiu eliminar com sucesso o vetor em mais de dezenove países e, por consequência, manteve efetivamente sob controle a transmissão da dengue, com a circulação esporádica do vírus restrita a algumas ilhas caribenhas (GLUBER, 2005; GUZMAN & KOURI, 2003). Mas, a organização do programa, estruturado sem participação da comunidade e essencialmente centrado no controle químico, e, posteriormente, a descontinuidade oficial do mesmo em alguns países do hemisfério norte, permitiram que ao final da década de 1970 o *Ae. aegypti* reinfestasse todos os países dos quais fora eliminado. (TEIXEIRA et al, 2009; GLAUBER & CLARK, 1995).

Diversos fatores políticos, econômicos e sociais estão associados a expansão do *Ae. aegypti* e a emergência da dengue enquanto problema de saúde pública global, dentre eles o crescimento populacional e a urbanização desordenada, a ausência de saneamento básico, o precário abastecimento de água, a modernização e velocidade dos meios de transporte, além da fragilidade das campanhas de controle vetorial (ROSS, 2010; CAPRARA et al, 2009; TEIXEIRA et al, 2009).

Diante da impossibilidade da erradicação do vetor com alta capacidade de adaptação ao ambiente, a redução da incidência de casos de dengue depende, fundamentalmente, da manutenção da população de mosquitos do gênero *Aedes* em nível baixo o suficiente para que a transmissão viral não seja sustentada, e da consequente interrupção do contato entre o homem e o vetor (WHO, 2009a; OOI et al, 2007).

1.1 Ecologia e controle de *Aedes aegypti*

Ae. aegypti se utiliza de uma imensa variedade de recipientes, sejam eles naturais ou artificiais, para a deposição dos ovos e desenvolvimento das larvas. Preferencialmente, os ovos do mosquito são depositados em criadouros artificiais que armazenam água limpa, como lavanderias, caixas d'água ou quaisquer recipientes descartados no entorno das residências. Apesar de determinados tipos de recipientes assumirem papéis diferenciados na produção de adultos, os reservatórios domiciliares constituem os principais criadouros para o mosquito (FORATTINI & BRITO, 2003). Os ovos de *Ae. aegypti* são depositados, preferencialmente, em grandes recipientes destinados ao armazenamento de água, como

tanques, poços, cisternas, tambores, caixas d'água e lavanderias. Mas, os criadouros provenientes do lixo doméstico e os pneus de veículos também apresentam uma grande importância na manutenção do ciclo do vetor (VALENÇA et al, 2013; MARTINS et al, 2010; SANTOS 1999).

A ecologia de *Ae. aegypti* torna o seu controle bastante complexo. De maneira geral, as campanhas de controle vetorial envolvem múltiplas estratégias, que vão desde o combate aos criadouros até a eliminação da população de mosquitos adultos. Diante da impossibilidade da erradicação de todos os recipientes que possam funcionar como habitats para o mosquito, a eliminação das formas juvenis, através do uso de larvicidas, se torna uma estratégia imprescindível para o controle da população de *Aedes* e apresenta mais fácil execução que o combate ao mosquito adulto (FEITOSA et al, 2009; WHO, 2009a).

1.2 Controle das formas larvárias de *Aedes*

Dois tipos de tratamento são possíveis para a eliminação das formas larvárias, quando os criadouros não podem ser removidos. Imóveis que apresentam recipientes de água não potável, que favorecem a proliferação das formas imaturas e contribuem para a dispersão passiva do vetor, como borracharias que armazenam pneus a céu aberto e depósitos de ferro velho, recebem o tratamento perifocal. Este tratamento compreende a borrifação de inseticidas químicos nos recipientes, vazios ou contendo água no momento da aplicação, e em todas as paredes próximas. Portanto, além de agir sobre as larvas o tratamento perifocal apresenta ação adulticida residual. Em contrapartida, domicílios que possuem reservatórios de água para o consumo, a exemplo das caixas d'água, tanques, tonéis e cisternas recebem o tratamento focal, com produtos que agem somente sob as larvas do mosquito, mas não afetam a saúde humana (WHO, 2009a; DONALÍSIO & GLASSER, 2002).

Os principais larvicidas químicos empregados pelos programas de controle da dengue são os compostos organofosforados. Estes compostos atuam no sistema nervoso central da larva, principalmente na inibição da acetilcolinesterase (AChE) (CUNHA et al, 2005). Como consequência, ocorre hiperatividade nervosa e colapso do sistema nervoso, fatos que resultam na morte do inseto (MOREIRA et al, 2012; BISSET, 2002).

O principal larvicida químico empregado pelo Ministério da Saúde para o combate às larvas de *Ae. aegypti* é o Temefós. Este é o larvicida de escolha para tratamento de água

potável porque, além de possuir ação duradoura, apresenta baixa toxicidade para mamíferos, odor quase imperceptível e custo relativamente baixo (RANSON et al, 2008).

Apesar da comprovada eficiência na eliminação das larvas de *Ae aegypti*, diversas populações do mosquito já se mostram resistentes ao Temefós. No Brasil, os primeiros relatos de alteração de susceptibilidade foram registrados no ano de 1998 (MELO-SANTOS et al, 2010; TAUIL, 2002). Hoje, em diversos Estados do país, principalmente nas regiões nordeste e sudeste, os mosquitos são resistentes a este larvicida químico (HORTA et al, 2011).

A evolução e propagação da resistência aos inseticidas químicos tornou-se uma grande preocupação no controle da dengue. Por conta disso, no ano 2000, por determinação da Fundação Nacional de Saúde - FUNASA, o Temefós começou a ser substituído pelo biolarvicida Bti em diversos municípios do Brasil (BRAGA & VALLE, 2007).

O Bti é um biolarvicida constituído a partir da bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. Formulações à base de Bti causam a mortalidade das formas aquáticas do mosquito a partir do envenenamento oral. Após a ingestão, a bactéria multiplica-se no intestino médio do inseto e produz endotoxinas que destroem as células do trato digestório, suspendendo a capacidade de alimentação da larva e levando-a a morte (MOREIRA et al, 2012; BISSET, 2002). Embora recomendado pela OMS para o tratamento de água para o consumo, dois problemas estão associados ao uso do Bti: a reduzida ação residual e o surgimento de insetos resistentes (MOREIRA et al, 2012; BRAGA & VALLE, 2007).

Outra classe de inseticidas que vem sendo empregada para o controle de *Aedes* são os reguladores de crescimento dos insetos (IGRs), os quais estão classificados em hormonais e não hormonais. IGRs hormonais atuam de maneira análoga a hormônio juvenil, provocando retardo no desenvolvimento do inseto. Dentre esta classe de reguladores de crescimento destacam-se o Methoprene e o Pyriproxyfen (MOREIRA et al, 2012). Em contrapartida, os IGRs não hormonais, a exemplo do Diflubenzuron e Triflumuron, atuam sobre a formação do exoesqueleto dos insetos, interferindo na síntese de quitina (SILVA & MENDES, 2007; DONALISIO & GLASSER, 2002).

Por conta da limitada eficiência do Bti, o Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD) tem adotado, como larvicida de escolha para o controle de larvas de *Ae. aegypti*, o regulador de crescimento Diflubenzuron, para tratamento de reservatórios de água potável (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). No entanto, este composto tem sido alvo

de diversos questionamentos, quanto aos riscos que o seu uso pode ocasionar à saúde humana (GURGEL & AUGUSTO, 2010).

Uma importante crítica ao uso dos IGRs também diz respeito a sua forma de atuação. Como esses larvicidas atuam apenas na prevenção da emergência de mosquitos adultos, permitindo que as larvas e pupas permaneçam visivelmente ativas em seus criadouros, transmitem a falsa impressão de que há falha no controle vetorial e, portanto, não são bem aceitos em algumas comunidades (WHO, 2007; BRAGA & VALLE, 2007).

Outro biolarvicida capaz de controlar a população de larvas de mosquito é o Spinosad. Inicialmente desenvolvido para o controle de pragas na agricultura, o Spinosad é um composto natural derivado da fermentação do actinomiceto *Saccharopolyspora spinosa*, e apresenta-se altamente tóxico para numerosas ordens de insetos. Compostos derivados de Spinosad agem a partir da ingestão ou absorção através da cutícula e provocam hiperexcitação de neurônios no sistema nervoso central das larvas, resultando em paralisia associada com fadiga neuromuscular (HERTLEIN et al, 2010; PERÉZ et al, 2007; ROMI et al, 2006). No entanto, já estão sendo descritos os primeiros relatos de Dipteros resistentes a este biolarvicida (SU & CHENG, 2012).

Medidas alternativas para o controle biológico das larvas de *Ae. aegypti* também incluem a introdução de predadores como peixes larvíparos, copépodes e culicídeos do gênero *Toxorhynchites* em bebedouros de animais de grande porte, fossos de elevador de obras, espelhos d'água, piscinas abandonadas e demais reservatórios de água não potável (DONALÍSIO & GLASSER, 2002).

Diversas espécies de peixes, dentre elas *Trichogaster trichopteros*, *Astyanax fasciatus*, *Betta splendens*, *Poecilia sphenops* já demonstraram, em condições laboratoriais, capacidade para predação de larvas de *Ae. aegypti* (CAVALCANTI et al, 2007). Avaliações de campo com a espécie *B. splendens*, inclusive, demonstraram que a introdução destes peixes em tanques de cimento consegue reduzir em até 320 vezes a infestação pelas larvas do mosquito transmissor da dengue (PAMPLONA et al, 2004). O copépode *Mesocyclops longisetus* var. *longisetus*, facilmente encontrado em coleções hídricas naturais, também apresenta capacidade de predação de até 97% das larvas de *Ae. albopictus*, em condições laboratoriais (SANTOS & ANDRADE, 1997).

As diversas ferramentas atualmente disponíveis para o controle da população de *Ae. aegypti* e para sua manutenção em níveis baixos reduzem significativamente o risco de transmissão da dengue, mas não são capazes de eliminá-lo. Para que haja o bloqueio na transmissão da doença é necessário que as estratégias para o controle das populações de

mosquitos estejam associadas às medidas de proteção pessoal, impedindo assim que o contato entre vetores e hospedeiros seja estabelecido (MARZOCHI, 2004; TAUIL, 2002).

1.3 Prevenção contra picadas de mosquitos

A aplicação de repelentes sobre a roupa ou diretamente sobre a pele, o uso de mosquiteiros, comuns ou impregnados com inseticidas, e a utilização de roupas que minimizam a exposição da pele durante o período em que os mosquitos são mais ativos são algumas das medidas adotadas para evitar o contato com os vetores.

Os repelentes contra insetos são os mais importantes métodos de proteção pessoal contra doenças transmitidas por mosquitos, visto que uma única picada pode resultar na transmissão de patógenos (FRADIN & DAY, 2002). O uso de repelentes, seja por moradores de áreas endêmicas ou viajantes que se deslocam para áreas de risco, além de impedir o desconforto causado pelas picadas, pode se configurar como única medida de proteção contra doenças nas quais o controle vetorial não é possível (FRANCES et al, 2009; SINGH et al, 2009).

Os repelentes são substâncias que agem a nível local ou à distância a partir do fornecimento de uma barreira de vapor, a qual interfere no voo dos artrópodes e dificulta o pouso e a picada sobre a pele (GLEISER et al, 2011; NERIO et al, 2010). No entanto, a proteção conferida pelos repelentes pode variar de acordo com o usuário. Alguns fatores podem interferir na eficácia do produto, tais como predisposição individual, de acordo com as substâncias exaladas (ácido lácteo, CO₂, suor), e fatores preponderantes às picadas, como, por exemplo, eczemas, sexo masculino, idade adulta, uso de bebidas alcoólicas, umidade, odor, clima quente e úmido e uso de fragrâncias florais (STEFANI et al, 2009). Além disso, a eficácia do repelente pode ser reduzida por conta da evaporação, absorção dérmica, perda abrasiva, dissolução em água e precipitação (KATRITZKY et al, 2008).

Os repelentes de uso tópico mais utilizados são aqueles que apresentam em sua composição produtos sintéticos, como o N,N-diethyl-3-metilbenzamida (DEET). Considerado “padrão ouro”, o DEET promove um longo tempo de proteção, além de ser efetivo contra diversas ordens de artrópodes, como Hemípteros hematófagos, Siphonaptera, Hymenoptera, Acarina e Gnathobdellida e uma imensa variedade de espécies de dípteros de importância médica (LOGAN et al, 2010; PENNETIER et al, 2007; KOREN et al, 2003; PETERSON & COATS, 2001).

Embora o exato mecanismo de ação do DEET permaneça desconhecido, acredita-se que a repelência esteja envolvida no bloqueio da resposta fisiológica dos receptores dos neurônios olfativos, situados nas antenas e palpos maxilares do inseto, os quais permitem que os seres humanos sejam localizados (MAIA & MOORE, 2011; SYED & LEAL, 2008).

Apesar de altamente eficaz na repelência contra insetos, o uso de produtos à base de DEET exige cuidados. Além de derreter plásticos e danificar equipamentos, como óculos e celulares, muitas reações adversas têm sido relacionadas ao uso do produto (LOGAN et al, 2010). Reações tóxicas e alérgicas incluem quadros dermatológicos como dermatite de contato, prurido e urticária, além de complicações neurológicas, como irritabilidade, fraqueza, tremores, confusão mental, agitação, convulsões, ataxia e encefalopatia. Na literatura, há relato de 3 mortes por encefalite associadas ao uso do DEET (STEFANI et al, 2009).

Na busca por repelentes mais seguros e eficientes, diversas pesquisas têm sido conduzidas com fontes eletrônicas (ANDRADE & BUENO, 2001), luminosas (TORRUELLA & RUÍZ, 2008) e formulações sintéticas que mimetizam odores humanos (LOGAN et al, 2010). Repelentes sintéticos como o IR3535, SS220, Picaridin e MGK-326 também estão disponíveis comercialmente, porém, nenhuma dessas fontes apresenta resultados tão satisfatórios quanto o DEET (MOORE et al, 2012; THAVARA et al, 2001).

1.4 Inseticidas e Repelentes de origem vegetal

O grande potencial inseticida dos extratos e óleos essenciais extraídos de plantas tem impulsionado o desenvolvimento de pesquisas voltadas aos métodos alternativos de controle vetorial. As plantas possuem compostos bioativos, biodegradáveis e apresentam baixa toxicidade para mamíferos, características que as tornam potencialmente adequadas para o controle integrado e seguro de vetores (GOVINDARAJAN & SIVAKUMAR, 2011; KIM et al, 2003). Compostos químicos obtidos de plantas podem ser usados como repelentes, larvicidas, atrativos de oviposição e agentes de dissuasão dos insetos (KEWKA et al, 2008).

Os inseticidas de origem vegetal são substâncias que resultam do metabolismo secundário das plantas e compõem a defesa química destas contra insetos herbívoros. Metabólitos como rotenóides, piretróides, quassinóides, alcalóides, terpenóides,

furanocuraminas e cromenos podem ser produzidos por toda a planta, ou partes dela, e além de repelir os insetos podem levá-los à morte (CORRÊA & SALGADO, 2011; SIMÕES et al, 2008).

A capacidade das plantas em repelir insetos adultos e causar a mortalidade das larvas deve-se principalmente à produção de terpenos como eugenol, limoneno, citronelol, citronelal e timol (NERIO et al, 2010; CORRÊA & SALGADO, 2011), embora a ação tóxica que as plantas exercem sobre as larvas de mosquitos também esteja possivelmente relacionada à ação de alcaloides (FEITOSA et al, 2009; PORTO et al, 2008).

Produtos de origem vegetal já estão incluídos em diversas formulações de repelentes sintéticos. Dos 65 repelentes produzidos fora dos Estados Unidos, 32 contém óleos vegetais, como citronela, limão eucalipto, neem e hortelã-pimenta (SINGH et al, 2009; PETERSON & COAST, 2001).

A utilização de plantas como repelentes de insetos é bastante antiga. Os primeiros registros foram citados na literatura Greco-romana e descrevem a utilização de *Artemisia absinthium* L.(Compositae) contra mosquitos e pulgas (BUENO & ANDRADE, 2010). A utilização de plantas com propriedades repelentes é uma prática comum e algumas comunidades já conseguiram reduzir a infestação domiciliar por *Anopheles spp.* com a adoção desta prática (KEWKA et al, 2008; MAIA & MOORE, 2011).

Diversas famílias de plantas destacam-se por apresentar capacidade de repelir insetos, dentre elas Myrtaceae, Verbenaceae, Lauraceae, Lamiaceae, Poaceae, Meliaceae, Asteraceae, Caesalpiniaceae, Fabaceae e Zingiberaceae, com destaque para os gêneros *Cymbopogon spp.*, *Ocimum spp.* e *Eucalyptus spp* (GLEISER et al, 2011; MAIA & MOORE, 2011).

Em ensaios laboratoriais, óleos essenciais extraídos de *Pseudognaphalium caeruleocanum* (Asteraceae) e *Cinnamomum zeylanicum* (Lauraceae) forneceram 95% de proteção contra picadas de *Lutzomia migonei*, por um período de três horas. Embora a proteção fornecida por essas plantas seja inferior ao DEET, ambas são mais eficazes contra picadas de flebótomos que os repelentes comerciais à base de citronela e eucalipto (NIEVES et al, 2010).

Óleos essenciais extraídos de *Litsea cubeba*, *Melaleuca leucadendron*, *M. quinquenervia*, *Viola odorata* e *Nepeta cataria* podem fornecer, em condições laboratoriais, 100% de proteção contra *Ae. aegypti*, *Anopheles stephensi* e *Culex quinquefasciatus* por um período de até 8 horas, mostrando-se mais eficazes que formulações comerciais à base de DEET (AMER & MEHLHORN, 2006).

O extrato hexânico obtido a partir da raiz *Cyperus rotundus* (Ciperaceae) também se mostra tão eficaz quanto produtos sintéticos à base de DEET, A13-35765, A13-37220 e CIC-4 contra os mosquitos vetores da malária e filariose (SINGH et al, 2009).

Repelentes de insetos derivados do óleo de limão eucalipto apresentam eficácia equivalente ao DEET e, inclusive, são recomendados pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) como forma de prevenir a transmissão da malária em área endêmica (MOORE et al, 2012).

Uma grande vantagem na utilização de repelentes de origem vegetal é a eficácia que apresentam sobre mosquitos infectados. Qualls e colaboradores (2012) verificaram que mosquitos *Ae. aegypti*, com infecção viral disseminada, podem apresentar reduzida sensibilidade aos repelentes sintéticos, contendo DEET e Picaridin, mas não aos repelentes à base de produtos naturais, como eucalipto limão (QUALLS et al, 2012).

Outra importante aplicabilidade das plantas, e dos seus subprodutos, é no controle das formas larvárias dos insetos vetores. Até o ano de 1988, já haviam sido descritas mais de 140 espécies de plantas com ação tóxica para as larvas de mosquitos (ROZO et al, 2008).

Diversos compostos químicos destacam-se por apresentar ação larvicida, dentre eles as amidas, quinonas, flavonoides e rotenóides, os quais são amplamente encontrados, principalmente, nas plantas pertencentes às famílias Rutaceae, Piperaceae e Boraginacea (GARCEZ et al, 2013).

A imensa diversidade da flora brasileira propicia a busca por produtos de origem vegetal, eficazes no controle de insetos vetores. No estado do Amazonas, um estudo etnobotânico confirmou a toxidade de diversas espécies de plantas. Extratos obtidos a partir de *Tapura amazônica*, *Piper aduncum*, *P. tuberculatum* e *Simaba polyphylla*, além de amplamente utilizados no tratamento dos sintomas da malária, são responsáveis por causar 100% de mortalidade às larvas do mosquito *Ae. aegypti* (POHLIT et al, 2004).

Estudos conduzidos no nordeste do país também demonstraram que plantas nativas, como *Ocimum americanum* e *O. gratissimum*, são tão eficazes no controle das larva do mosquito *Ae. agypti* quanto *Lippia sidoides* e *Cymbopogon citratus*com, ambos já utilizadas em escala comercial (CAVALCANTI et al, 2004).

Anacardium humile, conhecido como cajuzinho do serrado, bastante comum no serrado e sul do pantanal matogrossense, também apresenta um elevado potencial larvicida, mostrando-se capaz de causar 100% de mortalidade das larvas de *Ae. aegypti*, em concentrações de até 0,125% (PORTO et al, 2008).

Apesar do delineamento de estudos, o potencial de plantas endêmicas para o controle de doenças vetoriais, a exemplo dos gêneros *Xylopia* (Annonaceae) e *Lippia* (Verbenaceae), ainda precisa ser explorado.

A família Annonaceae está representada por aproximadamente 135 gêneros e 2500 espécies de árvores, arvoretas e arbustos que apresentam distribuição predominantemente tropical. No Brasil, a ocorrência de plantas desta família se dá em praticamente todas as formações naturais (SOUZA & LORENZI, 2008). Muitos representantes da família Annonaceae são apreciados por seus frutos comestíveis, como o fruto do conde (*Annona squamosa*) e a graviola (*A. muricata*). Além disso, apresentam importância econômica na carpintaria (*A. glabra* e *A. crassiflora*), na ornamentação (*A. cacans* e *Xylopia sericea*) e também são bastante utilizados na medicina popular devido as suas propriedades farmacológicas (FORMAGIO et al, 2010; LOBÃO et al, 2005).

Na literatura, há registros de Annonaceae que exibem propriedades leishmanicida e citotóxica, a exemplo de *A. squamosa* e *A. muricata* (VILA-NOVA et al, 2011), e ações antifúngica, antibacteriana, antioxidante e tripanocida, como *Xylopia laevigata* (SILVA et al, 2012). Alguns estudos também têm demonstrado que plantas desta família apresentam compostos bioativos eficazes contra larvas de *Ae. aegypti*. Um trabalho realizado na Venezuela demonstrou que *Annona cherimola* apresenta um grande potencial contra larvas de *Ae. aegypti*, apresentando CL 50 de 30,7 ppm (RAMIREZ et al, 2011).

Feitosa e colaboradores (2009) observaram que *Rollinia leptopetala*, também pertencente à família Annonaceae, é uma fonte potencial de larvicidas naturais. O alcaloide liriodenina obtido desta planta exibiu uma forte atividade sobre larvas de *Ae. aegypti*, com CL 50 igual a 3,6 ppm (FEITOSA et al, 2009).

Semelhante às Annonaceae, as plantas da família Verbenaceae também apresentam distribuição tropical, principalmente nos neotropicos. São ervas ou arbustos aromáticos que estão classificados em 36 gêneros e mais de 1000 espécies (SOUZA & LORENZI, 2008).

As Verbenaceae incluem diversas plantas ornamentais e também são bastante utilizadas para fins terapêuticos (SANTOS et al, 2009). Estudos etnobotânicos conduzidos no estado da Bahia revelaram que as Verbenaceae, sobretudo àquelas pertencentes ao gênero *Lippia*, são amplamente utilizadas na medicina popular como antiespasmódicas, estomáquicas, emenagogos e sedativas (SANTANA et al, 2008).

Na literatura, as Verbenaceae que apresentam ação tóxica sobre insetos vetores também são, em sua maioria, pertencentes ao gênero *Lippia*. A capacidade de repelir mosquitos já foi observada em diversas espécies deste gênero, dentre elas *L. sidoides*, *L.*

javanica, *L. uckambensis*, *L. cheraliera*, *L. integrifolia*, *L. junelliana* e *L. javanica* (GLEISER et al, 2011; MAIA & MOORE, 2011).

O agravamento do processo de resistência de mosquitos aos inseticidas, aliado ao reduzido número de compostos ativos disponíveis para uso em saúde pública e o custo relativamente alto dos repelentes sintéticos, evidenciam a necessidade do desenvolvimento de pesquisas, a fim de que sejam disponibilizadas formas alternativas de controle, mais seguras e acessíveis, contra doenças vetoriais endêmicas. Neste sentido, a grande diversidade da flora brasileira e o comprovado potencial larvicida e repelente de diversos de seus representantes, colocam as plantas brasileiras como uma fonte promissora para a bioprospecção de novos compostos para controle vetorial de *Ae. Aegypti*.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar as ações repelente e larvicida exercida pelos óleos essenciais extraídos de *Xylopia laevigata*, *X. frutescens* (Anonaceae) e *Lippia pedunculosa* (Verbenaceae) contra mosquitos da espécie *Aedes aegypti* (Diptera – Culicidae).

2.3 Específicos

- Avaliar a ação repelente dos óleos essenciais extraídos de *X. laevigata*, *X. frutescens* e *L. pedunculosa* contra mosquito adultos da espécie *Ae. aegypti*.
- Avaliar a atividade repelente dos compostos químicos majoritários do óleo essencial de *L. pedunculosa* contra mosquitos adultos da espécie *Ae. aegypti*.
- Avaliar a atividade larvicida dos óleos essenciais extraídos de *X. laevigata*, *X. frutescens* e *L. pedunculosa* contra larvas de *Ae. aegypti*.
- Avaliar a atividade larvicida dos compostos químicos majoritários do óleo essencial de *L. pedunculosa* contra larvas de *Ae. aegypti*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Coleta de acesso aos espécimes vegetais

Os espécimes de *L. pedunculosa* foram coletados no Povoado Cajueiro na cidade de Poço Redondo, Sergipe, (coordenadas: S 09°40'46,1" W37°39'41,4"), em maio de 2013. As plantas do gênero *Xylopia* foram coletadas em abril de 2013 no Parque Nacional Serra de Itabaiana, município de Itabaiana, Sergipe, (coordenadas: S 10°44' 53" W37°20' 21").

Exsicatas de *L. pedunculosa*, *X. laevigata* e *X. frutescens* foram depositados no Herbário ASE da Universidade Federal de Sergipe, sob os respectivos números de registro: 23159, 15440 e 22178. A identificação taxonômica dos espécimes foi realizada pela professora Dra. Ana Paula Prata, taxonomista vegetal e curadora do herbário.

3.2. Processamento e obtenção dos Óleos Essenciais

Inicialmente, folhas de *L. pedunculosa*, *X. frutescens* e *L. pedunculosa* foram secas, individualmente, em estufa com fluxo de ar circulante a uma temperatura de $45\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 horas, sendo em seguida trituradas em um moinho de quatro facas.

Os óleos essenciais (EO) foram extraídos usando-se a técnica de destilação a vapor (método indireto, hidrodestilação), a qual é normalmente feita através da aparelhagem de Likens-Nickerson ou suas derivações (aparelhagem tipo Clevenger). Utilizou-se 200 g de folhas secas de cada um dos espécimes e 1.500 mL de água destilada por balão. O tempo de destilação foi de 180 minutos após o início da condensação do vapor no Clevenger. Desta forma, o frasco (balão de fundo redondo) contendo o material vegetal foi inicialmente preenchido com água e depois é aquecido (em manta) até a temperatura de ebulição da água, de forma que os voláteis pudessem ser arrastados pelo vapor, o qual é condensado a mistura volatilizada (água + óleo) e em seguida separado o óleo essencial através de um funil de decantação. O processo foi realizado em triplicata e ao final foi obtido um óleo essencial de coloração amarelo límpido. O teor de óleo essencial foi expresso em porcentagem.

3.3. Cromatografia Gasosa e Espectrometria de Massas (GC/EM-FID)

A análise e quantificação da composição química do óleo essencial foram realizadas em um cromatógrafo a gás equipado com um detector de ionização por chamas e um espectrômetro de massa GC/EM-FID (GC-2010 Plus; GCMS-QP2010 Ultra, Shimadzu Corporation, Kioto, Japão), utilizando uma coluna capilar de sílica fundida Rtx-5MS de 30 m x 0,25 mm i.d., 0,25 µm de filme, usando He como gás de arraste com fluxo de 1,0 mL/min. A temperatura foi programada mantendo 40°C por 4 min, seguido de um aumento de 4°C/min até atingir 230 °C mantendo constante esta temperatura por 4 min.; temperatura do injetor de 250°C e temperatura do detector (ou interface) de 250°C; foi injetado um volume de 1,0 µL em diclorometano; taxa de partição do volume injetado de 1:10 e pressão na coluna de 94.70 kPa. As condições do EM foram: detector de captura iônica operando por impacto eletrônico e energia de impacto de 70 eV; velocidade de varredura 1.000; intervalo de varredura de 0,50 fragmentos/s e fragmentos detectados na faixa de 40 a 350 Da. A composição percentual foi realizada através das áreas dos picos nos cromatogramas.

3.4. Identificação dos constituintes

A identificação dos constituintes foi realizada com base na comparação dos índices de retenção da literatura (ADAMS, 2007). Para o índice de retenção foi utilizado a equação de Van den Dool e Kratz (1963), em relação a uma série homóloga de n-alcanos (nC8-nC20). Também foram utilizadas quatro bibliotecas do equipamento WILEY8, NIST05, NIST107 e NIST21 que permite a comparação dos dados dos espectros com aqueles constantes das bibliotecas utilizando um índice de similaridade de 80%.

3.5. Obtenção dos constituintes majoritários

Os constituintes químicos avaliados nesta pesquisa foram r-Limoneno e óxido de piperitenona, sendo que o primeiro deles é disponível comercialmente. Para o isolamento do óxido de piperitenona, uma pequena parte do óleo essencial (300 mg) foi submetida ao fracionamento cromatográfico por meio de cromatografia em camada delgada preparativa, eluída com hexano e acetato de etila na proporção de 9,5:0,5 v/v. O procedimento foi realizado em duplicata, sendo utilizados 600 mg do óleo essencial. O isolamento da referida substância obedeceu ao esquema apresentado na figura 1:

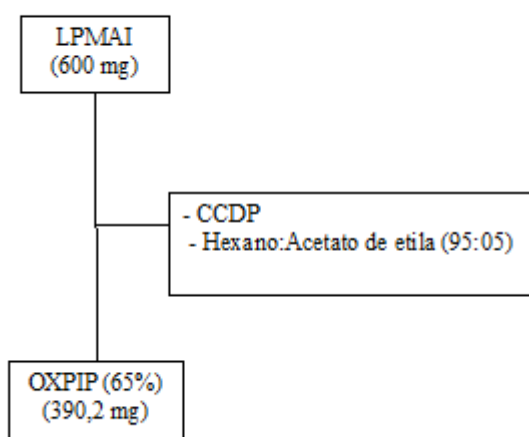


Figura 4: Esquema de isolamento do óxido de piperitenona.

3.6. Manutenção da colônia de mosquitos

Os mosquitos utilizados foram da espécie *Ae. aegypti*, linhagem Rockefeller (ROCK), provenientes de colônias livres de infecção e mantidas pelo laboratório de Entomologia e Parasitologia Tropical - LEPaT, Departamento de Morfologia – DMO, Universidade Federal de Sergipe.

Em laboratório, os mosquitos foram mantidos em sala climatizada, com temperatura média de $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$, umidade relativa do ar controlada $60 \pm 20\%$, e fotoperíodo de 12 horas.

Inicialmente, os ovos de *Ae. aegypti*, contidos em cartelas de papel filtro, foram incubados em bandejas de polietileno (35x20x6 cm), contendo 1,5L de água filtrada (Figura 2a). Após 24 horas, com a eclosão das larvas de primeiro estágio, houve a adição de suplementação nutricional. Durante os estádios larvais (L1-L4), os mosquitos foram alimentados diariamente com ração de peixe triturada, peneirada e esterilizada (0,5 g/300 larvas). Ao atingirem o estágio evolutivo de pupa, em média sete dias após a eclosão das larvas, os insetos foram transferidos para gaiolas de alumínio, teladas, com dimensões de 30 cm^2 , e mantidos sem que houvesse a adição de nutrientes. Após a emergência, era disponibilizada em cada gaiola solução açucarada 10%, para a alimentação dos mosquitos adultos. Para tanto, bolas confeccionadas com algodão e gaze foram embebidas na solução e acopladas à erlemayers com capacidade de 125 mL (Figura 2b).

O repasto sanguíneo das fêmeas, necessário à maturação dos ovos, era iniciado sete dias após a emergência dos adultos. Ratos Wistar (150g), oriundos do biotério central da Universidade Federal de Sergipe, foram anestesiados com cloridrato de xilazina (10 mg/kg) e cloridrato de S(+) cetamina (90 mg/kg), via intramuscular, e em seguida, colocados com o ventre sobre a gaiola por um período aproximado de 30 minutos. Este procedimento foi realizado três vezes a cada semana (Figura 2c).

Após a oferta da alimentação sanguínea, foi disponibilizado em cada gaiola um ovipositor (recipiente plástico de cor escura) contendo papel filtro imerso em água destilada, para a coleta dos ovos. Dois dias após o repasto, as cartelas contendo os ovos eram recolhidas, postas para secar e armazenadas em envelopes (Figura. 2d).

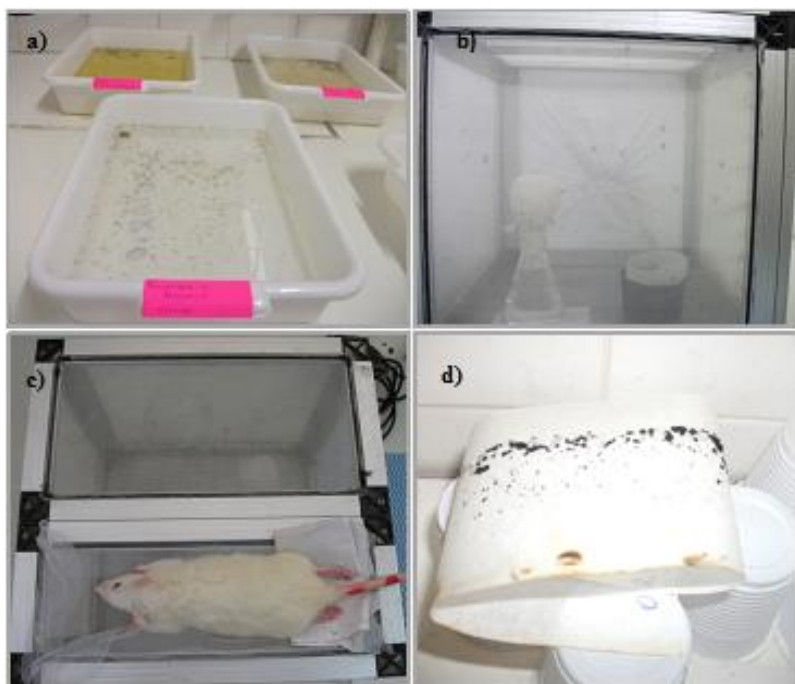


Figura 5: Manutenção da colônia de *Aedes aegypti* em condições laboratoriais: a) estágios larvais; b) gaiola para criação de mosquitos adultos, com alimentador e ovipositor (visão externa); c) repasto sanguíneo dos mosquitos fêmeas em ratos Wistar; d) cartela contendo ovos.

3.7. Avaliação da Atividade Larvicida

3.7.1 Seleção de larvas de *Ae. aegypti*

Para a avaliação da atividade larvicida dos EO, vinte larvas de terceiro estágio foram transferidas cuidadosamente, com o auxílio de uma pipeta, para pequenos béqueres graduados contendo água mineral, completando-se o volume final para 20 mL. Em seguida, todo o conteúdo dos béqueres foi transferido para copos descartáveis. As larvas permaneceram em repouso por 30 minutos, para verificar a ocorrência de injúria durante a manipulação.

3.7.2. Preparação da emulsão estoque

Para cada mililitro da emulsão estoque, pesou-se 20mg dos EO em um recipiente de vidro e, em seguida, foram adicionadas 0,04% do tensoativo Tween - 80 sobre os óleos, fazendo-se então a emulsificação. Em seguida, utilizando-se uma pipeta automática, foi adicionado um mililitro de água destilada, fazendo-se nova emulsificação e obtendo-se assim uma emulsão estoque de 20.000 µg mL⁻¹(ppm).

3.7.3. Bioensaio

Os ensaios consistiram na adição de diferentes volumes da emulsão estoque nos copos descartáveis, os quais continham as 20 larvas de *Ae. aegypti* imersas em 20 mL de água mineral. Inicialmente foi investigada a atividade tóxica dos EO nas seguintes concentrações: 10, 50, 100, 500 e 1000 ppm, a partir daí outras concentrações foram estabelecidas e investigadas. Cada teste foi realizado em triplicata.

Como controle, foram utilizados 20mL de água mineral (26-28°C) contendo 0,04% de Tween -80, também em triplicata.

As larvas foram expostas às soluções por 24 horas, e mantidas sem a adição de suplementação nutricional. Após 24 horas foi contabilizada a mortalidade e calculada a concentração letal para 50% das larvas (CL 50), sendo considerados critérios de morte larvas completamente imóveis ou incapazes de se mover até a superfície da água.

Após testes preliminares, foram estabelecidas concentrações de 10-90 ppm, para avaliar a atividade tóxica do EO da *Lippia pedunculosa*, r-Limoneo e óxido de piperitenona sobre larvas de *Ae. aegypti*.

3.8 Avaliação da Atividade Repelente

3.8.1 Seleção de voluntários

Para cada bioensaio foram selecionados doze voluntários (seis do sexo feminino e seis do sexo masculino), indivíduos adultos com idades entre 18 e 30 anos e etnia branca, não fumantes, sem doenças febris recentes e histórico de alergias a picadas de insetos ou medicamentos. Os voluntários foram previamente orientados a não utilizar fragrâncias, loções hidratantes ou repelentes por um período de 12 horas antes e durante os experimentos.

Todos os voluntários foram alertados quanto ao desconforto relacionado à picada dos insetos e ao prurido subsequente. Após a realização dos bioensaios, foram disponibilizadas loções (à base de lidocaína) para alívio das picadas aos voluntários que assim desejaram.

3.8.2 Bioensaios

Os experimentos foram realizados nas dependências do LEPaT, de acordo com as normas estabelecidas pelo guia para teste da eficácia de repelentes de mosquitos na pele humana, Organização Mundial da Saúde (WHO, 2009b), com algumas adaptações. Todos os bioensaios foram realizados entre as 9:00 e as 16:00 horas, em salas climatizadas ($26 \pm 2^{\circ}\text{C}$), com umidade relativa mantida em torno de 60%.

Antes do início dos testes, os voluntários tiveram a pele lavada com água e sabão neutro, e higienizada com uma solução de álcool etílico 70%. Em seguida, os voluntários tiveram os braços protegidos com luvas plásticas longas, deixando exposto ao tratamento e à ação dos mosquitos apenas uma área de 30 cm^2 , entre o pulso e o cotovelo. Apenas o antebraço esquerdo dos voluntários recebeu o tratamento, com as diferentes concentrações dos óleos essenciais.

Cada ensaio contou com dois controles negativos, nos quais os antebraços foram tratados apenas com etanol 70%, utilizado como diluente dos óleos essenciais. Um dos controles foi realizado no antebraço esquerdo dos voluntários, antes do início do tratamento, e o outro, foi efetuado no antebraço direito dos mesmos, ao final de cada teste.

Cada exposição teve duração de 2 minutos e foram contabilizados os pousos (considerados todos e quaisquer toques que os mosquitos realizassem na área exposta do braço). O critério para descarte dos experimentos foi: número de pousos igual a zero nos controles negativos.



Figura 6: a) Gaiola para manutenção de mosquitos adultos destinados aos testes de repelência. b) Ensaios de repelência. Braço esquerdo do voluntário inserido na gaiola destinada aos testes de repelência contendo 50 mosquitos fêmeas.

a) Determinação da Dose Efetiva

Este ensaio teve por objetivo determinar a Dose Efetiva (ED) dos óleos repelentes, que fornece 99,9% de proteção contra pousos de *Ae. aegypti* sobre a pele humana. Para cada EO, foram adotadas cinco diferentes concentrações (três que forneceram resposta repelente inferior a 50% e três, superiores a 50%), com base na resposta repelente fornecida por um teste preliminar (concentrações: 0,1- 1,0 e 10 %).

Para cada teste foram selecionados 50 mosquitos fêmea, com idade entre 3 e 5 dias, mantidas apenas com solução de sacarose 10% e nunca antes alimentados com sangue (Figura 3a). Os insetos foram transferidos para uma gaiola confeccionada em material que permitisse a visualização e controle do procedimento, e aclimatados por cerca de uma hora (Figura 3b).

Após a higienização e delimitação da área, o antebraço esquerdo do voluntário foi tratado com 0,5 mL de álcool etílico 70% e, após a secagem, inserido na gaiola que continha os mosquitos. Este procedimento consistiu no primeiro controle negativo. Em seguida, o mesmo braço foi tratado com 0,5 ml da solução contendo óleos essenciais diluídos em etanol, iniciando-se pela dosagem de menor concentração. Após cada tratamento, a luva era removida e o voluntário tinha o antebraço lavado com água corrente

e sabão neutro e, em seguida, seco em papel toalha para a completa remoção do óleo. Este procedimento foi repetido após a aplicação de cada uma das dosagens dos óleos essenciais.

Ao final do procedimento, foi realizado o segundo controle negativo, que consistiu na aplicação 0,5 mL de etanol no antebraço direito e posterior exposição aos mosquitos.

3.9. Análise de Dados

3.9.1. Atividade Larvicida

Foi realizada a análise de Probit de dados de mortalidade para determinar a concentração letal para 50% de mortalidade (CL 50) e os intervalos de confiança de 95%, para os respectivos compostos. Quando foi constatada mortalidade de até 20% das larvas no experimento controle, os dados foram corrigidos pela fórmula de Abbott (% Mortes = $[1 - (\text{teste}/\text{controle})] \times 100$). Se a taxa de mortalidade excedesse esse percentual, o experimento deveria ser descartado.

3.9.2. Atividade Repelente

A proteção (p) dos compostos testados foi expressa pela proporção entre as médias dos pousos nos braços tratado (T) e não-tratado (C), de um mesmo indivíduo:

$$p = 1 - \frac{T}{C}$$

Onde C é a cobertura de pousos nos dois braços não tratados de um mesmo indivíduo. Ou seja, o antebraço direito, tratado apenas com etanol, e o antebraço esquerdo.

A dose repelente para 50% (RD50) e 90% (RD90) foram calculadas a partir da curva padrão de dose-resposta (equação de Hill), usando o software GraphPad Prisma 6.0. Os limites inferiores e superiores foram fixados entre 0 (nenhuma repelência) e 100 (repelência completa), respectivamente (MOTULSKY & CHRISTOPOULOS, 2003). Foram considerados estatisticamente significantes os valores de $p < 0,05$.

4. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

A manutenção da colônia de mosquitos seguiu os parâmetros de biossegurança para insetários da Fundação Oswaldo Cruz e obedece a todos os aspectos éticos das pesquisas envolvendo animais FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ, 2005). A autorização para o seu funcionamento foi deferida pelo Comitê de Ética em Pesquisas Envolvendo Animais da Universidade Federal de Sergipe, protocolo número: 95/2011.

A execução desta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisas Envolvendo Seres Humanos do Hospital Universitário, Universidade Federal de Sergipe, sob o número CEP 319/2011 e Nº CAAE - 0280.0.107.000-11. A autorização para a realização desta pesquisa ocorreu mediante a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE (Apêndice I).

5. RESULTADOS

5.1. Análises cromatográficas dos Óleos Essenciais (EO)

A partir das análises cromatográficas, foi possível identificar 91,94% dos constituintes voláteis dos EO de *X. laevigata* e *X. frutescens*. Monoterpenos e diterpenos compuseram a maior parte dos constituintes identificados. Constatamos similaridade entre os constituintes voláteis dos óleos essenciais das plantas do gênero *Xylopi*a. O constituinte mais abundante foi o Germacreno D e seu precursor Bicyclogermacreno.

A partir do EO obtido das folhas de *L. pedunculosa* foi possível identificar 98,09% dos constituintes químicos. Dentre eles, 97,6% foram monoterpenos e 0,49% sesquiterpenos. Os principais compostos voláteis foram o óxido de piperitenona e r-limoneno (Tabela 1).

5.2. Atividade Larvicida

Após testes iniciais, constatamos que as espécies das plantas investigadas apresentaram diferentes graus de toxicidade sobre as larvas de mosquitos *Ae. egypti*. Os EOs extraídos de plantas do gênero *Xylopi*a somente apresentaram atividade tóxica sobre larvas quando testados em elevadas concentrações, apresentando concentração letal para 50% das larvas (CL50) superior a 1000 ppm. Por esta razão, dados referentes à ação larvicida do EO obtidos das plantas deste gênero, bem como seus componentes voláteis, não foram exibidos.

Em contrapartida, o EO obtido a partir da *L. pedunculosa* mostrou-se tóxico para 100% das larvas do culicídeo nas concentrações compreendidas entre 50 e 100 ppm. Em nossos resultados, constatamos que 58 ppm do óleo essencial de *L. pedunculosa* apresenta-se letal para 50% das larvas de *Ae. aegypti*.

As larvas de *Ae. aegypti* também mostraram-se suscetíveis aos principais componentes voláteis presentes no EO da *L. pendunculosa*, óxido de piperotenona e r-limoneno. Os constituintes voláteis foram avaliados nas concentrações que variaram entre 10-100 ppm. A concentração letal para 50% das larvas e os respectivos intervalos de confiança são indicados na Tabela 2:

Tabela 2: Composição química dos óleos essenciais de *Lippia pedunculosa*, *Xylopia laevigata* e *X. frutescens*.

IR ^a	IR ^b	Composto	<i>L. pedunculosa</i> (%)	<i>X. laevigata</i> (%)	<i>X. frutescens</i> (%)
947	946	Campheno	-	0,31±0,10	0,22±0,06
975	974	β-Pineno	-	0,31±0,10	0,06±0,10
987	988	Mirceno	0,21 ± 0,02	-	-
1023	1022	Piperitenona	0,84 ± 0,10	-	-
1025	1024	Limoneno	25,10 ± 3,50	-	-
1027	1024	Oxido de Piperitenona	70,35 ± 4,16	-	-
1028	1024	Limoneno	-	1,71±0,41	-
1036	1032	(Z)-β-Ocimeno	-	0,45±0,10	-
1046	1044	(E)-β-Ocimeno	-	0,05±0,09	5,23±0,92
1295	1289	Timol	0,38 ± 0,05	-	-
1332	1338	Bicyclovelemeno	-	0,29±0,02	0,27±0,01
1335	1335	δ- Elemeno	-	2,73±0,05	0,13±0,12
1347	1345	α-Cubebeno	-	1,32±0,13	1,01±0,03
1370	1373	α-Ylangeno	-	0,62±0,06	0,63±0,02
1376	1374	α- Copaeno	-	4,79±0,42	4,98±0,09
1384	1387	β-Bourboneno	-	0,29±0,03	-
1388	1387	β-Cubebeno	-	1,05±0,02	-
1390	1389	β-Elemeno	-	-	6,35±0,24
1414	1417	(E)-Cariofileno	0,49 ± 0,08	-	-
1421	1417	(E)-Caryophylleno	-	8,64±0,33	17,24±0,50
1431	1430	β-Copaeno	-	1,56±0,05	0,29±0,01
1440	1439	Aromadendreno	-	1,65±0,11	-
1450	1451	trans-Muurolo-3,5-dieno	-	-	0,53±0,03
1457	1452	α-Humuleno	-	1,12±0,01	1,67±0,03
1476	1478	γ-Muurolo	-	8,63±0,25	2,17±0,10
1483	1484	Germacreno D	-	27,04±0,38	21,16±0,79
1488	1492	δ-Selineno	-	0,23±0,01	-
1493	1493	trans-Muurolo-4(14),5-dieno	-	1,76±0,08	-
1497	1500	Bicyclogermacreno	-	12,80±0,42	23,23±0,64
1503	1511	δ-Amorpheno	-	0,61±0,06	-
1509	1508	Germacreno A	-	-	1,05±0,04
1514	1513	γ-Cadineno	-	2,52±0,08	0,76±0,02
1519	1522	δ-Cadineno	-	6,84±0,22	2,64±0,09
1534	1533	trans-Cadina-1,4-dieno	-	0,32±0,01	0,43±0,02
1538	1537	α-Cadineno	-	0,71±0,01	-
1543	1545	Selina-3,7(11)-dieno	-	0,33±0,02	-
1561	1559	Germacreno B	-	6,01±0,50	0,41±0,02
1578	1577	Spathulenol	-	0,89±0,27	0,38±0,04
1584	1582	Óxido de Caryophylleno	-	0,45±0,12	-
1588	1592	Viridiflorol	-	-	0,39±0,02
1645	1640	epi-α-Muurolo	-	0,17±0,30	-
1657	1652	α-Cadinol	-	0,49±0,20	-

IR (índice de retenção): ^a calculado com uma coluna RTx-5MS de acordo com Van Den Dool & Kratz² baseado em uma série homóloga de *n*-alcanos; ^b de acordo com Adams.¹

Tabela 2: Atividade larvica do óleo essencial de *Lippia pedunculosa* e compostos voláteis r- Limoneno e óxido de piperitenona sobre larvas de terceiro estágio de mosquitos *Ae. aegypti*.

Composto	CL50	IC	P	X ²
EO <i>Lippia pedunculosa</i>	58,0	55,7 ---- 60,5	0,277	3,864
r – Limoneno	25,8	21,6 ---- 29,9	0,068	7,119
Óxido piperitenona	24,2	23 ---- 25,5	0,619	1,780

CL50= concentração letal para 50% das larvas, ppm; IC=intervalo de confiança 95%; P= p value; X² = Chi- quadrado (heterogeneidade do modelo de variação).

5.3 Atividade Repelente

A partir de testes preliminares, diferentes concentrações foram estabelecidas, tanto para os EO avaliados, quanto para os constituintes voláteis. Para as plantas do gênero *Xylopi*a, foram testadas as seguintes concentrações: 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 7,5 e 10%. O EO da *L. pedunculosa* foi avaliado em: 0,1; 0,5; 1,0; 2,0; 2,5 e 5,0%. Enquanto os compostos voláteis óxido de piperitenona e r-limoneno foram avaliados em concentrações que variaram de 0,1 a 1,0%.

As três espécies de plantas investigadas apresentaram capacidade de interferir nos pousos que os mosquitos *Ae. aegypti* realizam sobre a pele humana (Figuras 4 e 5). A Tabela 3 indica as concentrações dos EO de *X. laevigata*, *X. frutescens* e *L. pedunculosa* que protegem contra 50% (RD 50) e 90 % (RD 90) dos pousos de *Ae. aegypti*. A curva de Hill reflete a inclinação da hipérbole e os desvios no ajuste da curva de dose reposta são representados por R².

Os resultados do efeito de repelência em função das concentrações dos EOs de plantas do gênero *Xylopi*a podem ser observados na Figura 4. Verificamos ampla variação individual na ação repelente destes EOs representado pela amplitude das barras (intervalo de confiança), principalmente quando testados em concentrações inferiores à 5%.

Tabela 3: Atividade repelente de óleos essenciais de *Xylopi laevigata*, *X. frutescens* e *Lippia pedunculosa* contra mosquitos *Aede. aegypti*.

Óleo essencial	RD 50±IC	RD 90±IC	Curva Hill±IC	R ²
<i>Xylopi frutescens</i>	1,60 (0,6 – 4,26)	4,10 (0,65 – 26,03)	2,32 (-1,62 - 6,28)	0,10
<i>Xylopi laevigata</i>	1,82 (1,19 - 2,78)	7,87 (3,47 – 17, 83)	1,5 (0,70 - 2,29)	0,38
<i>Lippia pedunculosa</i>	0,49 (0,31 - 0,77)	1,08 (0,38 - 3,05)	2,75 (-1,23 - 6,74)	0,30

RD_x concentração (%) dos óleos essenciais contra 50% e 90 % dos pousos de *Ae. aegypti* sobre a pele humana; IC= intervalo de confiança.

Dentre as plantas avaliadas pertencentes à família Annonacea, a espécie *X. laevigata* apresentou maior ação repelente contra mosquitos *Ae. aegypti*. O EO obtido a partir desta planta forneceu proteção superior a 80% contra pousos do mosquito, quando testado na concentração igual a 10%.

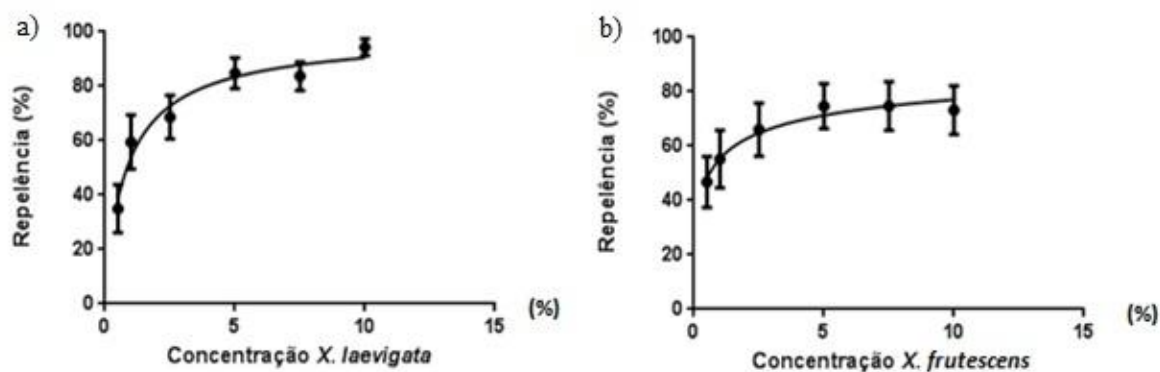


Figura 4: Repelência causada pelo aumento da concentração dos óleos essenciais de *X. laevigata* (a) e *X. frutescens* (b). Os círculos pequenos representam a abrangência da repelência em 12 réplicas (±IC); a linha contínua representa o ajuste da curva de dose-resposta.

Nos testes com o EO da *L. pedunculosa*, observamos que também houve ampla variação individual na resposta repelente quando o EO foi avaliado em baixas concentrações (Figura 5). No entanto, à medida que a concentração do óleo era aumentada, a amplitude de variação era reduzida gradualmente, sendo completamente eliminada na máxima concentração avaliada.

O EO obtido a partir das folhas da *L. pedunculosa* foi capaz de inibir 100% dos pousos que *Ae. aegypti* realizam sobre a pele humana, quando testado na concentração igual à 5%.

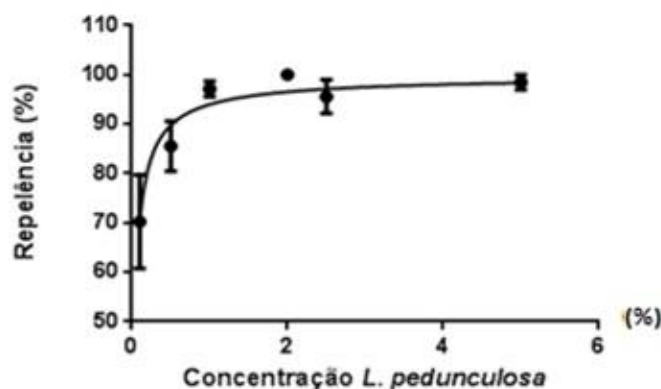


Figura 5: Repelência causada pelo aumento da concentração dos óleos essenciais de *L. pedunculosa*. Os círculos pequenos representam a abrangência da repelência em 12 réplicas ($\pm$ IC); a linha contínua representa o ajuste da curva de dose-resposta.

Os valores das RD 50 e RD 90 para os compostos voláteis obtidos a partir da *L. pedunculosa*, óxido de piperitenona e r-limoneno (Tabela 4), sugerem que a capacidade repelente do EO desta planta deve-se exclusivamente à ação destes dois compostos químicos.

Tabela 4: Atividade repelente contra de mosquitos *Ae. aegypti* do óleo essencial de *L. pedunculosa* e seus compostos químicos r-Limoneno e óxido de Piperitenona.

Composto volátil	RD 50 $\pm$ IC	RD 90 $\pm$ IC	Curva Hill $\pm$ IC	R ²
<i>Lippia</i>	0,49	1,08	2,75	0,30
<i>pedunculosa</i>	(0,31 - 0,77)	(0,38 - 3,05)	(-1,23 - 6,74)	
r – Limoneno	0,42	0,84	3,20	0,35
	(0,30 – 0,59)	(0,47 – 1,50)	(0,46 - 5,95)	
Óxido	0,22	0,44	3,12	0,21
piperitenona	(0,13 – 0,36)	(0,16 – 1,20)	(-1,51 - 7,77)	

RD_x concentração (%) dos óleos essenciais contra 50% e 90 % dos pousos de *Ae. aegypti* sobre a pele humana; IC= intervalo de confiança.

Na Figura 6 são indicados os gráficos das curvas de dose resposta para os compostos r-Limoneno e óxido de piperitenona. Observamos que o óxido de piperitenona forneceu uma resposta repelente superior tanto ao r-limoneno, quanto ao EO do qual foi

obtido, sendo capaz de inibir todos os pousos dos mosquitos *Ae. aegypti* sobre a pele humana, quando testado na concentração igual à 1%.

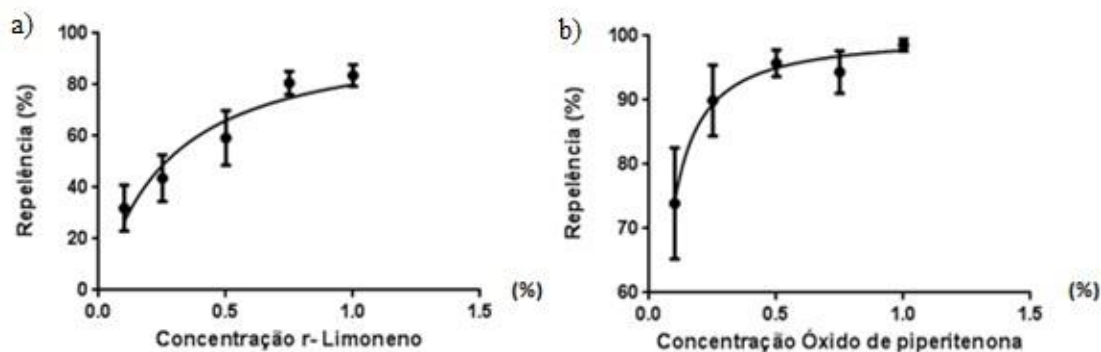


Figura 6: Repelência causada pelo aumento da concentração dos compostos químicos r-Limoneno (a) e Óxido de piperitenona (b). Os círculos pequenos representam a abrangência da repelência em 12 réplicas ($\pm$ IC); a linha contínua representa o ajuste da curva de dose-resposta.

Semelhante aos observado nos testes com os EO houve ampla variação individual na resposta repelente quando os compostos voláteis foram avaliados em concentrações muito baixas. Porém, à medida que a concentração dos compostos químicos era elevada, a variação individual na resposta repelente era reduzida, sendo completamente eliminada na máxima concentração testada (Figura 6). O r-limoneno não foi capaz de fornecer resposta repelente igual à 100% nas dosagens selecionadas para os ensaios.]

6. DISCUSSÃO

A caracterização fitoquímica de diversas plantas do gênero *Xylopia* têm revelado a presença de uma ampla variedade de monoterpenos, sesquiterpenoides, diterpenoides, esteroides, alcaloides, amidas e flavonoides (MOREIRA et al, 2013). A ocorrência de diterpenos é característica às plantas deste gênero, sendo potencialmente importante enquanto marcador quimiotaxonômico das espécies (VILEGAS et al, 1991).

Entre as plantas do gênero *Lippia*, os fitoconstituintes mais abundantes são flavonoides e iridóides, substâncias às quais, possivelmente, se devem as propriedades farmacológicas das espécies (GOMES et al, 2011).

O EO de *L. pedunculosa* exibe um perfil químico diferente da maioria das espécies deste gênero, fato que possivelmente interfere em suas propriedades farmacológicas. Enquanto os compostos mais abundantes nos EO da maioria das plantas do gênero *Lippia* são Limoneno, β -cariofileno, p-cimeno, cânfora, linalool, α -pineno e timol, o EO de *L. pedunculosa* possui como principal constituinte químico o óxido de piperitenona, (GOMES et al, 2011).

Com relação à atividade larvicida, observamos que tanto os EOs quanto os compostos químicos avaliados apresentaram diferentes graus de toxicidade contra larvas do mosquito *Ae. aegypti*. Apesar de ricos em alcaloides e diterpenoides (Tabela 2), os quais são reconhecidamente eficazes contra insetos (GARCEZ et al, 2013), os EOs obtidos a partir de *X. laevigata* e *X. frutescens* apresentaram menor atividade larvicida, com CL50 superior a 1000 ppm.

A baixa eficiência larvicida das plantas do gênero *Xylopia*, entretanto, pode estar relacionada à parte da planta da qual o óleo foi extraído. Como exemplo, podemos citar o trabalho desenvolvido por Feitosa et al (2009), no qual diferentes partes da *Rollinia leptopetala* (Annonaceae) foram avaliadas no combate às larvas do mosquito transmissor da dengue. Os autores observaram que diferentes partes da planta exibem diferentes graus de toxicidade sobre as larvas do mosquito, sendo que a mais baixa eficácia foi atribuída ao EO extraído das folhas da planta (FEITOSA et al, 2009).

As plantas do gênero *Xylopia* apresentam ampla gama de atividades biológicas, tais como, antibacteriana, antifúngica (MOREIRA et al, 2013), tripanocida (SILVA et al, 2012), além de ações antitumorais (FERRAZ et al, 2013; QUITANS et al, 2013), antioxidantes, cardiovasculares, diuréticas e propriedades anestésicas (MOREIRA et al,

2013). Portanto, para uma melhor compreensão acerca da toxicidade que plantas deste gênero podem exercer sobre larvas de mosquitos vetores, são necessários estudos mais detalhados, envolvendo diversos extratos e EOs, obtidos a partir de diferentes partes das plantas e por diferentes métodos de extração.

Diferentemente do observado com as Annonaceae, o EO das folhas da *L. pedunculosa* mostrou-se tóxico contra as larvas de terceiro estágio de *Ae. aegypti*, apresentando CL50 igual à 58 ppm. A concentração letal para 50% das larvas do mosquito é compatível com outras espécies de plantas nativas do nordeste brasileiro, como *Ocimum americanum* (67 ppm), *O. gratissimum* (60 ppm), *L. sidoides* (63 ppm) e *Cymbopogon citratus* (69 ppm), as quais têm sido bem avaliadas para o combate às larvas do mosquito transmissor da dengue (CAVALCANTI et al, 2004).

Durante o delineamento experimental, foi possível observar que elevadas concentrações do EO da *L. pedunculosa* (≥ 500 ppm) provocam a mortalidade em 100 % das larvas de *Ae. aegypti*, ainda nos primeiros minutos da exposição. O mesmo efeito é obtido pela *L. sidoides*, a qual induz 100% de mortalidade larvária entre 1 e 5 minutos após o início do tratamento (CARVALHO et al., 2003).

Ao analisarmos os principais compostos voláteis do EO da *L. pedunculosa*, observamos que tanto o óxido de piperitenona, quanto o r- limoneno apresentaram valores de CL50 inferiores ao óleo essencial do qual foram obtidos (Tabela 4). A ausência de sobreposição entre os intervalos de confiança, do óleo e seus constituintes, indica que a atividade larvicida do EO de *L. pedunculosa* é inferior à ação do óxido de piperitenona e r- limoneno.

A ação tóxica de ambos os compostos já foi observada sobre larvas de mosquitos vetores. Tanto o óxido de piperitenona quanto o limoneno mostraram-se eficazes no combate às larvas do vetor do vírus do oeste do Nilo, *Culex pipiens* (ZAHARAN & ABDELGALEIL, 2011; KOLIOPOULOS et al, 2010). Além disso, o limoneno também tem sido amplamente utilizado para o controle das populações de mosquitos do gênero *Aedes* (SANTOS et al, 2011; CHENG et al, 2009).

O fato de a atividade larvicida do EO bruto de *L. pedunculosa* ter sido menor que a de seus componentes majoritários isoladamente, em particular o óxido de piperitenona, sugerem a ausência de interação sinérgica entre este e o r-limoneno na potencialização da ação larvicida do EO de *L. pedunculosa*. Este fenômeno também não foi observado em outras plantas potencialmente tóxicas para mosquitos, como *Copaifera reticulata* (SILVA et al, 2007), *Eucalyptus camaldulensis* e *E. urophylla* (CHENG et al, 2009), *Ruta*

chalepensis (ALI et al, 2013a) e o gerânio rosa perfumado (*Pelargonium spp*) (ALI et al, 2013b).

O conceito geral de sinergia descreve que o fenômeno ocorre quando a combinação das substâncias de um fitomedicamento fornece um efeito superior àquele esperado pelas contribuições individuais, seja no aumento do efeito terapêutico, na redução dos efeitos colaterais ou em ambos. Em contrapartida, a redução no efeito esperado pela combinação dos constituintes caracteriza a ocorrência de antagonismo entre os compostos químicos (WILLIAMSON, 2001).

Os dados obtidos, referentes à ação tóxica do óxido de piperitenona sobre larvas de mosquitos vetores, apresentaram algumas divergências com trabalhos citados na literatura. Lima et al (2013) observaram que este composto químico, constituinte majoritário no EO da *Mentha x vilosa*, causa a mortalidade de 50% das larvas de terceiro estágio de *Ae. aegypti* apenas quando em 62,5 ppm, concentração 38,7% maior que a observada em nosso trabalho. Em contrapartida, quando avaliado contra as larvas do mosquito transmissor da Febre do Oeste do Nilo, *Cx. Pipiens*, baixas concentrações do óxido de piperitenona (9,95 mg/L) foram necessárias para causar mortalidade em 50% das larvas (KOLIOPOULOS et al. 2010).

Oscilações na concentração letal do óxido de piperitenona sobre larvas de mosquitos vetores podem estar relacionadas a diferenças metodológicas no processamento da emulsão teste. Emulsões são sistemas heterogêneos, termodinamicamente instáveis, que consistem em pelo menos um líquido imiscível intimamente disperso em outro, na forma de glóbulos, a partir da adição de um tensoativo. Em geral as emulsões não se formam espontaneamente e suas propriedades dependem não apenas das condições termodinâmicas como método de preparação, das características e da ordem de adição de cada componente (CAMARGO, 2008).

No que diz respeito à ação repelente, tanto os EO quanto os compostos químicos avaliados forneceram proteção contra pousos de *Ae. aegypti* sobre a pele humana. O critério de proteção foi a inibição de quaisquer toques que o mosquito realizasse sobre a área da pele submetida ao tratamento, independentemente da ocorrência de picadas. À medida que se elevava a concentração dos EO, tanto das plantas do gênero *Xylopi*a, quanto da *Lippia* e dos compostos químicos, era possível observar que os pousos eram significativamente reduzidos, sendo a sua ocorrência um evento quase acidental.

Os fatores envolvidos na atratividade de mosquitos sobre a pele são complexos e pouco compreendidos. Entretanto, sabe-se que os mosquitos se utilizam de estímulos

visuais, térmicos e, principalmente, olfatórios para localizar seus hospedeiros (FRADIN, 1998). Portanto, a predisposição individual à picada de mosquitos depende de diversos fatores, tais como: uso de roupas escuras, idade, sexo, temperatura corpórea e substâncias exaladas pela pele, tais como CO₂, ácido láctico, compostos voláteis derivados do sebo e suor (STEFANI et al, 2009). Embora não haja comprovação científica, acredita-se que a ingestão de alimentos como alho, cebola e vitaminas do complexo B também pode auxiliar na repelência de mosquitos (RUTLEDGE & DAY, 2008).

Dentre os EOs avaliados, os de *X. frutescens* e *X. laevigata* forneceram os menores percentuais de proteção contra pousos de *Ae. aegypti* (Figura. 4). Para se alcançar índices de proteção mais elevados seria necessária a utilização de grandes volumes de EO, o que demandaria uma elevada quantidade de biomassa vegetal. Portanto, apesar de apresentar potencial repelente, a dificuldade para a obtenção do EO das plantas do gênero *Xylopi*a torna a sua comercialização inviável. Por esta razão, as ações repelente e larvicida dos constituintes químicos majoritários do EO das plantas do gênero *Xylopi*a não foram avaliados.

As plantas da família Verbenaceae, por sua vez, em especial aquelas pertencentes ao gênero *Lippia*, têm sido bem avaliadas na repelência contra insetos (AMER & MEHLHORN, 2006; NERIO et al, 2010). Óleos essenciais de *L. origanoides* e *L. alba* são eficazes na repelência de *Sitophilus zeamais*, inseto associado aos danos no armazenamento do milho (NERIO et al, 2010). *L. citriodora* pode repelir 100% de mosquitos *Culex*, por um período de até 480 minutos. Semelhante à *L. pedunculosa* (Figura. 5), baixas concentrações dos óleos essenciais de *L. integrifolia* e *L. junelliana* também são capazes de repelir 100% dos mosquitos *Ae. aegypti* (GLEISER et al, 2011).

A capacidade que as plantas do gênero *Lippia* apresentam em repelir insetos está possivelmente relacionada à presença de monoterpenos, os quais podem apresentar variações quantitativas e qualitativas em função de parâmetros climáticos e agrônômicos (SILVEIRA et al, 2012). No caso da *L. pedunculosa*, a ação repelente se deve, principalmente, à ação dos dois principais constituintes químicos, r- limoneno e óxido de piperitenona (Tabela 4).

O limoneno é um composto de baixa toxicidade, o qual tem sido registrado como ingrediente ativo em produtos pesticidas, como inseticidas, repelentes de insetos para uso em humanos, e no controle de pulgas e carrapatos de animais de estimação (EPA, 1994).

O óxido de piperitenona, o qual se mostrou mais eficaz que o óleo essencial da *L. pedunculosa* na repelência de *Ae. aegypti* (Tabela 4), é tanto eficaz como tóxico, repelente

e retardador na oviposição do vetor da malária, *Anopheles stephensi* (TRIPATHI et al, 2004).

Todos os ensaios repelência apresentados neste trabalho, tanto utilizando EO quanto os componentes voláteis, obedeceram aos mesmos padrões, a fim de que possíveis falhas metodológicas fossem minimizadas. Vários fatores abióticos podem influenciar a interpretação dos ensaios de repelência, como absorção e penetração do repelente na pele, lavagem e resíduos na superfície tratada e características relacionadas ao ambiente, como temperatura, umidade e qualidade do ar. Além disso, fatores biológicos relacionados à nutrição larvária e disponibilidade de carboidratos aos mosquitos adultos também podem contribuir para a ocorrência de erros na interpretação dos resultados (BARNARD, 2005).

Na literatura, várias pesquisas têm sido conduzidas a fim de elucidar o potencial repelente e larvicida de plantas de diversos gêneros, mas, a toxicidade que essas plantas podem exercer sobre humanos tem sido pouco investigada (MAIA & MOORE, 2011). Neste trabalho, observamos que apesar de altamente eficaz no controle da população de *Ae. aegypti* e no bloqueio do contato com o mosquito transmissor da dengue, as plantas do gênero *Lippia* são tóxicas quando em contato com a pele humana, causando irritação, prurido e rubor.

O fato de plantas poderem provocar intoxicação em humanos seja por ingestão ou contato não é raro. A maior parte das plantas envolvidas em acidentes domésticos pertence às Famílias Araceae e Euphorbiaceae e os princípios ativos responsáveis pela ação tóxica são: oxalato de cálcio, saponinas, alcalóides beladonados (atropina, escopolamina e hioscina), felandreno, carvacrol, pineno, histamina, acetilcolina, serotonina e látex irritante (SINITOX, 2009).

7. CONCLUSÃO

Os óleos essenciais obtidos a partir de *Xylopi*a *laevigata* e *X. frutescens* exercem baixa toxicidade sobre larvas de *Ae. aegypti*, embora sejam capazes de interferir no pouso que mosquitos adultos realizam sobre a pele humana. Por outro lado, *Lippia pedunculosa* e seus principais constituintes químicos, além de potencialmente tóxicos contra formas larvárias, são eficazes na repelência de mosquitos adultos. No entanto, a utilização da *L. pedunculosa* requer cuidados e mais estudos devem ser conduzidos, a fim de que sejam produzidas formulações de uso tópico para seres humanos, que forneçam proteção por um prolongado período de tempo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R. P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry**. 4th ed. Allured Publ. Corp., Carol Stream, IL, 2007.

ALI, A.; DEMIRCI, B.; KIYAN, H.T.; BERNIER, U.R.; TSIKOLAIA, M. WEDGE, D.E.; KHAN, I.A.; BASER, K.H.C.; TABANCA, N. Biting Deterrence, Repellency, and Larvicidal Activity of *Ruta chalepensis* (Sapindales: Rutaceae) Essential Oil and Its Major Individual Constituents Against Mosquitoes. **J Med Entomol**, 50(6): 1267-1274, 2013a.

ALI, A; MURPHY, C.C.; DEMIRCI, B.; WEDGE, D.E.; SAMPSON, B.J.; KHAN, I.A.; BASER, K.H.C.; TABANCA, N. Insecticidal and Biting Deterrent Activity of Rose-scented Geranium (*Pelargonium* spp.) Essential Oils and Individual Compounds Against *Stephanitis Pyrioides* and *Aedes aegypti*. **Pest Manag Sci**, 69: 1385–1392, 2013b.

AMAKU, M; COUDEVILLE, L.; MASSAD, E. Designing a Vaccination Strategy Against Dengue. **Rev. Inst. Med. Trop.**, 54(18):S18-S21, 2012.

AMER, A.; MEHLHORN, H. Repellency Effect of Forty-One Essential Oils Against *Aedes*, *Anopheles*, and *Culex* Mosquitoes. **Parasitol Res**, 99: 478–490, 2006.

ANDRADE, C.F.S.; BUENO, V.S. Evaluation of Electronic Mosquito-Repelling Devices Using *Aedes albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae), **Neotrop Entomol** 30(3): 497-499, 2001.

BARNARD, D.R. Biological Assay Methods for Mosquito Repellents. **J Am Mosq Control Assoc**, 21(4) Supplement:12–16, 2005.

BISSET, L.J.A. Uso Correcto de Insecticidas: Control de La Resistência. **Rev Cubana Med Trop**, 54(3):202-219, 2002.

BUENO, V.S.; ANDRADE, C.F.S. Avaliação Preliminar de Óleos Essenciais de Plantas como Repelentes para *Aedes albopictus* (Skuse, 1894) (Diptera: Culicidae). **Rev Bras Pl Med**, 12(2): 215-219, 2010.

BRAGA, I.A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: Vigilância, Monitoramento da Resistência e Alternativas de Controle no Brasil*. **Epidemiol Serv Saúde**, 16(4):295-302, 2007.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. Guia de Vigilância Epidemiológica. 7ª Ed. Brasília: 2009.

CÂMARA, F.P.; THEOPHILO, R.L.G.; SANTOS, G.T.; PEREIRA, S.R.F.G; CÂMARA, D.C.P.; MATOS, R.R.C. Estudo Retrospectivo (Histórico) da Dengue no Brasil: Características Regionais e Dinâmicas. **Rev Soc Bras Med Trop** 40(2):192-196, 2007.

CAMARGO, M.F.P.; **Desenvolvimento de nanoemulsões à base de óleo de maracujá (*Passiflora edulis*) e óleo essencial de lavanda (*Lavandula officinalis*) e avaliação da atividade antiinflamatória utópica**. 2008. 119f. Dissertação (Mestrado em Medicamentos e Cosméticos). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, São Paulo, 2008.

CAPRARA, A.; LIMA, J.W.O.; MARINHO, A.C.P.; CALVASINA, P.G.; LANDIM, L.P.; SOMMERFELD, J. Irregular Water Supply, Household Usage and Dengue: A Bio-social Study in the Brazilian Northeast. **Cad. Saúde Pública**, 25(1): S125-S136, 2009.

CARVALHO, A.F.U.; MELO, V.M.M.; CRAVEIRO, A.A.; MACHADO, M.I.L.; BANTIM, M.B.; RABELO, E.F. Larvicidal Activity of the Essential Oil from *Lippia sidoides* Cham. against *Aedes aegypti* Linn. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 98(4): 569-571, 2003.

CAVALCANTI, L.P.G.; PONTES, R.J.S.; REGAZZI, A.C.F.; PAULA, F.J.J.; FRUTUOSO, R.L.; SOUSA, E.P.; DANTAS, F.F.F.; LIMA, J.W.O. Competência de Peixes Como Predadores de Larvas de *Aedes aegypti*, Em Condições de Laboratório. **Rev Saúde Pública**, 41(4):638-44, 2007.

CAVALCANTI, E.S.B.; MORAIS, S.M.; LIMA, M.A.A.; SANTANA, E.W.P. Larvicidal Activity of Essential Oils from Brazilian Plants against *Aedes aegypti* L.. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 99(5): 541-544, August 2004.

CHENG, SEN-SUNG; H.CHIN-GI; C. YING-JU; Y. JANE-JANE; C. WEI-JUNE; C.SHANG-TZEN. Chemical Compositions and Larvicidal Activities of Leaf Essential Oils from Two Eucalyptus Species. **Bioresour Technol**, 100: 452–456, 2009.

CORRÊA, J.C.R.; SALGADO, H.R.N. Atividade Inseticida das Plantas e Aplicações: Revisão. **Rev Bras Pl Med**, 13(4): 500-506, 2011.

CUNHA, M.P.; LIMA, J.B.P.; BROGDON, W.G.; MOYA, G.E.; VALLE, D. Monitoring of Resistance to The Pyrethroid Cypermethrin in Brazilian *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Populations Collected Between 2001 and 2003. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 100(4): 441-444, July 2005.

DONALÍSIO, M.R.; GLASSER, C.M. Vigilância Entomológica e Controle de Vetores do Dengue. **Rev Bras Epidemiol**, 5(3), 2002.

EPA (1994) Reregistration Eligibility Decision (RED) Facts: Limonene.EPA-738-F-94-030.

FEITOSA, E.M.A.; ARRIAGA, A.M.C.; SANTIAGO, G.M.P.; LEMOS, T.L.G.; OLIVEIRA, M.C.F.; VASCONCELOS, J.N.; LIMA, J.Q.; MALCHER, G.T.; NASCIMENTO, R.F.; BRAZ-FILHO, R. Chemical Composition and Larvicidal Activity of *Rollinia leptopetala* (Annonaceae). **J Braz Chem Soc**, 20(2): 375-378, 2009.

FERRAZ, R.P.C.; CARDOSO, G.M.B.; SILVA, T.B.; FONTES, J.E.N.; PRATA, A.P.N.; CARVALHO, A.A.; MORAES, M.O.; PESSOA, C.; COSTA, E.V.; BEZERRA, D.P. Antitumour properties of the leaf essential oil of *Xylopia frutescens* Aubl. (Annonaceae). **Food Chem** 141:196–200, 2013.

FIGUEIREDO, R. M.P.; NAVECA, F.G.; OLIVEIRA, C.M.; BASTOS, M.S.; MOURÃO, M.P.G.; VIANA, S.S.; MELO, M.F.N.; ITAPIREMA, E.F.; SAATKAMP, C.J.; FARIAS, I.P. Co-infection of Dengue Virus by Serotypes 3 and 4 in Patients from Amazonas, Brazil. **Rev Inst Med Trop** [online]. 53(6): 321-323, 2011.

FRADIN, M.S.; DAY, J.F. Comparative Efficacy Of Insect Repellents Against Mosquito Bites. **N Engl J Med**, 347(1), 2002.

FRADIN, M.S. Mosquitoes and Mosquito Repellents: A Clinician's Guide. **Ann Intern Med.** 128:931-940, 1998.

FRANCES, S.P.; MACKENZIE, D.O.; ROWCLIFFEANDS, K.L.; CORCORAN, K. Comparative Field Evaluation of Repellent Formulations Containing Deet and Ir3535 Against Mosquitoes in Queensland, Australia. **J Am Chem Mosq Controle Assoc** , 25(4):511–513, 2009.

FORATTINI, O.P.; BRITO, M. Reservatórios Domiciliares de Água e Controle do *Aedes aegypti*. **Rev Saúde Pública**, 37(5): 676-7, 2003.

FORMAGIO, A.S.N.; MASETTO, T.E.; BALDIVIA, D.S.; VIEIRA, M.C.; ZÁRATE, N.A.H.; PEREIRA, Z.V. Potencial Alelopático de Cinco Espécies da Família Annonaceae. **Rev Bras Bioci.**, 8(4): 349-354, 2010.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. Parâmetros de Biossegurança Para Insetários e Infectórios de Vetores: Aplicação das Normas Gerais para Laboratórios Definidas pela Comissão Técnica de Biossegurança da Fiocruz. Rio de Janeiro, RJ, 2005.

GARCEZ, W.S.; GARCEZ, F.R.; SILVA, L.M.; SARMENTO, U.C. Substâncias de Origem Vegetal com Atividade Larvicida Contra *Aedes aegypti*. **RVq**, 5(3): 363-393, 2013.

GLEISER, R.M.; BONINO, M.A.; ZYGADLO, J.A. Repellence of Essential Oils of Aromatic Plants Growing in Argentina Against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Parasitol Res**, 108:69–78, 2011.

GLUBER, D. The Emergence of Epidemic Dengue Fever and Dengue Hemorrhagic Fever in The Americas: A Case of Failed Public Health Policy. **Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health**, 17(4), 2005.

GLAUBER, D.; CLARCK, G.G. Dengue/Dengue Hemorrhagic Fever: The Emergence of a Global Health Problem. **Emerg Infect Dis**, 1(2): 55-57, 1995.

GOMES, S.V.C; NOGUEIRA, P.C.L.; MORAES, V.R.S. Aspectos químicos e biológicos do gênero *Lippia* enfatizando *Lippia gracilis* Schauer. **Ecl. Quím**, 36(1): 64-67, 2011.

GOVINDARAJAN, M.; SIVAKUMAR, R. Mosquito Adulticidal and Repellent Activities of Botanical Extracts Against Malarial Vector, *Anopheles stephensi* Liston (Diptera:Culicidae). **Asian Pac J Trop Med**, 941-947, 2011.

GURGEL, A.M.; AUGUSTO, L.G.S. Riscos à Saúde Humana a Serem Considerados no Uso do Diflubenzuron no Combate ao Mosquito da Dengue. In: I Simpósio Brasileiro de Saúde Ambiental, 2010, Belém. Livro de resumos do I Simpósio Brasileiro de Saúde Ambiental, 1: 221-221, 2010.

GUZMAN, M.G.; KOURI, G. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever in the Americas: Lessons and Challenges. **J Clin Virol**, 27: 1-13, 2003.

HERTLEIN, M.B., MAVROTAS, C.; JOUSSEAUME, C.; LYSANDROU, M.; THOMPSON, G.D.; JANY, W.; RITCHIE, S. A Review of Spinosad as a Natural Product for Larval Mosquito Control. **J Am Mosq Controle Assoc**, 26(1):67–87, 2010.

HILL, C.A.; KAFATOS, F.C.; STANSFIELD, S.K.; COLLINS, F.H. Arthropod-borne diseases: vector control in the genomics era. *Nat Rev Microbiol* .3(3): 262-8, 2005.

HORTA, M.A.P.; CASTRO, F.I.; ROSA, C.S.; DANIEL, M.C.; MELO, A.L. Resistance of *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) to Temephos in Brazil: A Revision and New Data for Minas Gerais State. **BioAssay**, 6(7): 1-6, 2011.

KATRITZKY, A.R.; WANG, Z.; SLAVOV, S.; TSIKOLIA, M.; DOBCHEV, D.; AKHMEDOV, N.G.; HALL, C.D.; BERNIER, U.R.; CLARK, G.G.; LINTHICUM, K.J. Synthesis and Bioassay of Improved Mosquito Repellents Predicted from Chemical Structure. **PNAS**, 105(21): 7359 –7364, 2008.

KIM, S.; Roh, J.Y.; KIM, D.H.; LEE, H.S. AHN Insecticidal Activities of Aromatic Plant Extracts and Essential Oils Against *Sitophilus oryzae* and *Callosobruchus chinensis*, Y.J.; J **Stored Prod Res**, 39: 293–303, 2003.

KOLIOPOULOS, G.; PITAROKILI, D.; KIOULOS, E.; MICHAELAKIS, A.; TZAKOU, O. Chemical Composition and Larvicidal Evaluation of Mentha, Salvia, and Melissa Essential Oils Against The West Nile Virus Mosquito *Culex pipiens*. **Parasitol Res**, 107:327–335, 2010.

KOREN, G.; MATSUI, D.; BAILEY, D. DEET-Based Insect Repellents: Safety Implications for Children and Pregnant and Lactating Women. **CMAJ**, 169(3), 2003.

KWEKA, E.J.; MOSHA, F. ; LOWASSA, A.; MAHANDEL, A.M.; KITAU, J.; MATOWO, J.;MAHANDE, M.J.; MASSENGA, C.P.; TENU, F.; FESTON, E.; LYATUU, E.E.; MBOYA, M.A.; MNDEME, R.; CHUWA, G.; TEMU,E.A. Ethnobotanical Study of Some Of Mosquito Repellent Plants in North-Eastern Tanzania. **Malar J**, 7:152, 2008.

LIMA, T.C.; SILVA, T.K.M.; SILVA, F.L.; BARBOSA-FILHO, J.M.; MARQUES, M.O.M.; SANTOS, R.L.C.; CAVALCANTI, S.C.H.; SOUSA, D.P. Larvicidal Activity of *Mentha x villosa* Hudson Essential Oil, Rotundifolone and Derivatives. **Chemosphere** 104 (1): 37-43, 2013.

LOBÃO, A.Q.; ARAUJO, D.S.D.; KURTZ, B.C. Annonaceae das Restingas do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Rodriguésia** 56 (87): 8 5-96, 2005.

LOGAN, J.G.; STANCZYK, N.M.; HASSANALI, A.; KEMEI, J.; SANTANA, A. E.G.; RIBEIRO, K. A.L.; PICKETT, J. A.; MORDUE, J. Arm-In-Cage Testing of Natural Human-Derived Mosquito Repellents. **Malar J**, 9: 239, 2010.

MAIA, M.F.; MOORE, S.J. Plant-Based Insect Repellents: A Review of Their Efficacy, Development and Testing. **Malar J**, 10(Suppl 1):S11, 2011.

MARTINS, V.E.P.; ALENCAR, C.H.M.; FACÓ, P.E.G.; DUTRA, R.F.; ALVES, C.R.; PONTES, R.J.S.; GUEDES, M.I.F. Distribuição Espacial e Características dos Criadouros de *Aedes albopictus* e *Aedes aegypti* em Fortaleza, Estado do Ceará. **Rev Soc Bras Med Trop** 43(1):73-77, 2010.

MARZOCHI, K.B.F. Dengue Endêmico: O Desafio das Estratégias de Vigilância. **Rev Soc Bras Med Trop**, 37(5):413-415, 2004.

MELO-SANTOS, M.A.V.; VARJAL-MELO, J.J.M.; GOMES, T.C.S., PAIVA, M.H.S.; REGIS, L.N.; FURTADO, A.F.; MAGALHÃES, T.; MACORIS, M.L.G.; ANDRIGHETTI, M.T.M.; AYRES, C.F.J. Resistance to The Organophosphate Temephos: Mechanisms, Evolution and Reversion in na *Aedes aegypti* Laboratory Strain from Brazil. **Acta Trop.** 113: 180–189, 2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. COORDENAÇÃO-GERAL DO PROGRAMA NACIONAL DE CONTROLE DA DENGUE. NOTA TÉCNICA N.º 109/ 2010 CGPNCD/DEVEP/SVS/MS, 2010.

MIOT, H.A.; BATISTELLA, R.F.; BATISTA, K.A.;VOLPATO, D.E.C.; AUGUSTO, L.S.T.; MADEIRA, N.G.; HADDAD.V.J.; MIOT, L.D.B. Comparative Study Of The Topical Effectiveness of the Andiroba Oil (*Carapa Guianensis*) and Deet 50% as Repellent for *Aedes* sp..**Rev Inst Med Trop**, 46(5):253-256, Sept-Oct, 2004.

MOORE, S.J.; MORDUE, A.J.; LOGAN, J.G. Insect Bite Prevention. **Infect Dis Clin N Am**, 26: 655–673, 2012.

MOREIRA, I.C.; ROQUE, N.F.; VILEGAS, W.; ZALEWSKI, C.A.; LAGO, J.H.G.; FUNASAKI, M. Genus *Xylopi* (Annonaceae): Chemical and Biological Aspects. **Chem Biodiv** , 10: 1921-43, 2013.

MOREIRA, M.F.; MANSUR, J.F.; MANSUR-FIGUEIRA, J. Resistência e Inseticidas: Estratégias, Desafios e Perspectivas no Controle de Insetos. In: Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular, 2012.

MOTULSKY, H.J.;CHRISTOPOULOS, A. Fitting Models to Biological Data Using Linear and Nonlinear Regression. A Practical Guide to Curve Fitting. GraphPad Software Inc. San Diego, CA, 2003. www.graphpad.com

NERIO, L.S.; VERBEL, J.O.; STASHENKO, E. Repellent Activity of Essential Oils: A Review. **Bioresour Technol**, 101: 372–378, 2010.

NEVES, D.P; Parasitologia Humana. Editora Atheneu, 11ª ed. São Paulo, 2010.

NIEVES, E.; MÉNDEZ, J.F.; LIAS, J.; RONDÓN, M.; BRICEÑO, B. Actividad Repelente de Aceites Esenciales Contra Las Picaduras de *Lutzomyia migonei* (Diptera: Psychodidae). **Rev Bio Trop**, 58(4): 1549-1560, 2010.

NORMILI, D. Surprising New Dengue Vírus Throws A Spanner in Disease Control Efforts. **Science**, 42: 415, 2013.

OLIVEIRA, E.S.; BIAZOTO, C.D.S. Distribuição de Criadouros de *Aedes aegypti* (LINNA.US, 1762) e *Aedes albopictus* (SKUSE, 1894) (Díptera: Culicidae), no Município de Assis Chateaubriand, PR, Brasil. **Biosci J**, Uberlândia, 28(6): 1051-1060, 2012.

OLIVEIRA, C. L.; BIER, V.A.; MAIER, C. R.; RORATO, G. M.; FROST, K. F.; BARBOSA, M. A.; SCHNORRENBURGER, S. C. W.; LANDO, T. T. Incidência da Dengue Relacionada às Condições Climáticas no Município de Toledo - PR. **Arq Ciênc Saúde Unipar**, 11(3): 211-216, 2007.

OOI E-E; GUBLER, D.J; NAM, V.S. Dengue Research Needs Related to Surveillance and Emergency Response. In: Report of the Scientific Working Group Meeting on Dengue. Geneva: World Health Organization; p124-33, 2007.

PAMPLONA, L.G.C.; LIMA, J.W.O.; CUNHA, J.C.L.; SANTANA, E.W.P. Avaliação do Impacto na Infestação por *Aedes aegypti* em Tanques de Cimento do Município de Canindé, Ceará, Brasil, Após a Utilização do Peixe *Betta splendens* como Alternativa de Controle Biológico. **Rev Soc Bras Medic Trop**, 37(5):400-404, set-out, 2004.

PENNETIER, C.; CORBEL, V.; BOKO, P.; ODJO, A.; GUESSAN, R.N.; LAPIED, B; HOUGARD, J.M. Synergy Between Repellents And Non-Pyrethroid Insecticides Strongly Extends The Efficacy of Treated Nets Against *Anopheles gambiae*. **Malar J**, 6:38, 2007.

PERÉZ, C.M.; MARINA, C.F.; BOND, J.G.; ROJAS, J.C.; VALLE, J.; WILLIAMS, T. Spinosad, a Naturally Derived Insecticide, for Control of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): Efficacy, Persistence, and Elicited Oviposition Response. **Entomol Soc America**, 44(4): 632-638, 2007.

PESSANHA, J.E.M.; CAIAFFA, W.T.; CECILIO, A.B.; IANI, F.C.M.; ARAUJO, S.C.; NASCIMENTO, J.C.; KROON, E.G.; PRIOETTI, F.A.; ARIAS, J.R. Co circulation of Two Dengue Virus Serotypes in Individual and Pooled Samples of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* Larvae. **Rev Soc Bras Med Trop** 44(1):103-105, 2011.

PETERSON, C.; COATS, J. Insect Repellents – Past, Present and Future. **Pesticide Outlook**, 2001.

PORTO, K.R.A.; ROEL, A.R.; SILVA, M.M.; COELHO, R.M.; SCHELEDER, E.J.D.; JELLER, A.H. Atividade larvicida do óleo de *Anacardium humile* Saint Hill sobre *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae). **Rev Soc Bras Med Trop**, 41(6):586-589, nov-dez, 2008.

POHLIT, A.M.; QUIGNARD, E.L.J.; NUNOMURA, S.M.; TADEI, W.P.; HIDALGO, A.F.; PINTO, A.C.S.; SANTOS, E.V.M.; MORAIS, S.K.R.; SARAIVA, R.C.G.; MING, L.C.; ALECRIM, A.M.; FERRAZ, A.B.; PEDROSO, A.C.S.; DINIZ, E.V.; FINNEY, E.K.; GOMES, E.O.; DIAS, H.B.; SOUZA, K.S.; OLIVEIRA, L.C.P.; DON, L.C.; QUEIROZ, M.M.A.; HENRIQUE, M.C.; SANTOS, M.; LACERDA JÚNIOR, O.S.; PINTO, P.S.; SILVA, S.G.; GRAÇA, Y.R. Screening of Plants Found in The State of Amazonas, Brazil for Larvicidal Activity Against *Aedes aegypti* Larvae. **Acta Amazon**, 34(1): 97 – 105, 2004.

QUALLS, W.A.; DAY, J.F.; XUE, R.; BOWERS, D.F. Altered Behavioral Responses of Sindbis Virus-infected *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) to DEET and Non-DEET Based Insect Repellents. **Acta Trop** 122: 284–290, 2012.

QUITANS, J.S.S.; SOARES, B.M.; FERRAZ, R.P.C.; OLIVEIRA, A.C.A.; SILVA, T.B.; MENEZES, L.R.A.; SAMPAIO, M.F.C.; PRATA, A.P.N.; MORAES, M.O.; PESSOA, C.; ANTONIOLLI, A.R.; COSTA, E.V.; BEZERRA, D.P. Chemical Constituents and Anticancer Effects of the Essential Oil from Leaves of *Xylopia laevigata*. **Planta Med**, 79: 123–130, 2013.

RAMIREZ, R.N.; MORA, F.D.; AVILA, J.L.; ROJAS, L.B.; USUBILLAGA, A.; SEGNINI, S.; CARMONA, J. Composición Química y Actividad Larvicida Del Aceite

Esencial de *Annona cherimola* Mill. Del Los Andes Venezolanos Contra El Mosquito *Aedes aegypti* (L). **Rev Fac Farm.**, 53(2): 2-6, 2011.

RANSON, H.; BURHANI, J.; LUMJUAN, N.; BLACK, W.C. Insecticide Resistance in Dengue Vectors. **TropIKA.net** (<http://journal.tropika.net>), 2008.

ROMI, R.; PROIETTI, S.; DI LUCA, M.; CRISTOFARO, M. Laboratory Evaluation Of The Bioinsecticide Spinosad for Mosquito Control. **J Am Chem Mosq Control Assoc**, 22(1):93–96, 2006.

ROSS, T.M. Dengue Virus. **Clin Lab Med**, 30:149–160, 2010.

ROZO, A.; ZAPATA, C.; BELLO, F.J. Evaluación Del Efecto Tóxico de Extractos de *Eupatorium microphyllum* L.F. (Asteraceae) sobre Larvas de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) em Condições de Laboratório. **Rev Cien Salud**, 6 (2): 64-73, 2008.

RUTLEDGE, C.R.; DAY, J.F. Mosquito Repellents. ENY-671. Entomology and Nematology Department, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, 2008.

SANTANA, D.L.; PREZA, D.L.C.; ASSIS, J.G.A.; GUEDES, M.L.S. Plantas Com Propriedades Terapêuticas Utilizadas na Comunidade de Campos, Amélia Rodrigues, Bahia, Brasil. **Magistra**, 20(3): 218-230, 2008.

SANTOS, S.R.L.; MELO, A.M.; CARDOSO, A.V.; SANTOS, R.L.C.; SOUZA, D.P.; CAVALCANTI, S.C.H. Structure–Activity Relationships of Larvicidal Monoterpenes and Derivatives against *Aedes aegypti* Linn. **Chemosphere**, 84: 150–153, 2011.

SANTOS, J.S.; MELO, J.I.M.; ABREU, M.C.; SALES, M.F. Verbenaceae Sensus Stricto Na Região de Xingó: Alagoas e Sergipe, Brasil. **Rodriguésia** 60(4): 985-998. 2009.

SANTOS, L.U.; ANDRADE, C.F.S. Levantamento de Ciclopídeos (Crustacea, Copepoda) no Brasil e Avaliação Preliminar de seu Potencial como Predadores dos Vetores da Dengue. **Rev Saúde Pública**, 31 (3): 221-6, 1997.

SANTOS, R.S. Fatores Associados à Ocorrência de Formas Imaturas de *Aedes aegypti* na Ilha do Governador, Rio de Janeiro, Brasil. **Rev Soc Bras Med Trop**, 32(4):373-382, 1999.

SILVA, D.M.; COSTA, E.V.; NOGUEIRA, P.C.L.; MORAIS, V.R.S.; CAVALCANTI, S.C.H.; SALVADOR, M.J.; RIBEIRO, L.H.G.; GADELHA, F.R.; BARISON, A.; FERREIRA, A.J. Ent-Kaurane Diterpenoids and Other Constituents from the Stem of *Xylopia Laevigata* (Annonaceae). **Quim Nova**, 35(8): 1570-1576, 2012.

SILVA, H.H.G.; GERIS, R.; RODRIGUES, E.F.; ROCHA, C.; SILVA, I.G. Larvicidal Activity of Oil-Resin Fractions from The Brazilian Medicinal Plant *Copaifera reticulata* Ducke (Leguminosae-Caesalpinoideae) Against *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). **Rev Soc Bras Med Trop** 40(3):264-267, 2007.

SILVA, J.J.; MENDES, J. Susceptibility of *Aedes aegypti* (L) to The Insect Growth Regulators Diflubenzuron and Methoprene in Uberlândia, State of Minas Gerais. **Rev Soc Bras Med Trop** 40(6): 612-616, 2007.

SILVA, L.J.; RICHTMANN, R. Vaccines Under Development: Group B Streptococcus, Herpes-Zoster, HIV, Malaria and Dengue. **J Pediatr**, 82(3): S115-S124, 2006.

SILVEIRA, J.C.; BUSATO, N.V.; COSTA, A.O.S.; COSTA-JÚNIOR, E.F. Levantamento e Análise de Métodos de Extração de Óleos Essenciais. **Enc Biosfera**, 8(15); 2038- 52, 2012.

SIMÕES, C.M.O. et al; Farmacognosia: da Planta ao Medicamento. Editora daUFRGS: Porto Alegre; Editora da UFSC: Florianópolis, 6º Ed, 2008.

SINGH, S. P.; RAGHAVENDRA, K; DASH, A.P. Evaluation of Hexane Extract of Tuber of Root of *Cyperus rotundus* Linn (Cyperaceae) for Repellency against Mosquito Vectors. **J Parasitol Res**, 1-5, 2009.

SINITOX- SISTEMA NACIONAL DE INFORMAÇÕES TOXICO FARMACOLÓGICAS. FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ, 2009.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. Botânica Sistemática: Guia Ilustrado para Identificação das Famílias de Fanerógamas Nativas e Exóticas do Brasil, Baseado em APG III. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2ºed., 2008.

STEFANI, G.P.; PASTORINO, A.C.; CASTRO, A.P.B.M.; FOMIN, A.B.F.; JACOB, C.M.A. Repelentes de Insetos: Recomendações para Uso em Crianças. **Rev Paul Pediatr**, 27(1):81-9, 2009.

SU, T.; CHENG, M.L. Resistance Development in *Culex quinquefasciatus* to Spinosad: A Preliminary Report. **J Am Chem Mosq Controle Assoc** , 28(3):263–267, 2012.

SYED, Z.; LEAL, W. Mosquitoes Smell and Avoid The Insect Repellent DEET. **PNAS**, 105(36): 13598–13603, 2008.

SYLVESTRE, G.; GANDINI, M.; MACIEL-DE-FREITAS, R. Age-Dependent Effects of Oral Infection with Dengue Virus on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Feeding Behavior, Survival, Oviposition Success and Fecundity. **PLOS ONE**, 8(3): 1-8, 2013.

TEIXEIRA, M.G.; COSTA, M.C.N.; BARRETO, F.; BARRETO, M.L. Dengue: Twenty-Five Years Since Reemergence in Brazil. **Cad Saúde Pública**, 25(1):S7-S18, 2009.

TAUIL, P.L. Aspectos Críticos do Controle do Dengue no Brasil. **Cad Saúde Pública**, 18(3):867-871, 2002.

THAVARA, U; Tawatsin, A.; Chompoosri, J.; Suwonkerd, W.; Chansang, U.; Asavadachanukorn, P. Laboratory and Field Evaluations of the Insect Repellent 3535(Ethyl Butylacetylaminopropionate) and Deet against Mosquito Vectors in Thailand. **J Am Chem Mosq Controle Assoc**, 17(3): 190-195, 2001.

TORRUELA, X.J.; RUIZ, M.T.C. Eficacia Del Repelente de Mosquitos Mosi-Guard® en El Medio Natural Mediante Trampa de Luz Blanca para Muestreo de Dípteros. **Piel**, 23(3):102-5, 2008.

TRINDADE, G.F.; MARCHEVSKY, R.S.; FILLIPIS, A.M.B.; NOGUEIRA, R.M.R.; BONALDO, M.C.; ACERO, P.C.; CARIDE, E.; FREIRE, M.S.; GALLER, R. Limited Replication of Yellow Fever 17DD and 17D-Dengue Recombinant Viruses in Rhesus Monkeys. **An Acad Bras Cienc**, 80(2): 311-321, 2008.

TRIPATHI, A.K.; PRAJAPATI, V.; AHMAD, A.; AGGARWAL, K.K.; KHANUJA, P.S. Piperitenone Oxide as Toxic, Repellent, and Reproduction Retardant Toward Malarial Vector *Anopheles stephensi* (Diptera:Anophelinae). **J Med Entomol**, 41(4):691-698. 2004.

UTSUNOMIYA, H.S.M.; LOUSAN, N.E.P.; BREIER, T.B.; BARRELA, W. Influência do Parque da Biquinha como Foco de *Aedes* (Stegomyia) *aegypti* em Relação a área Urbana. **REB**, 1(3): 21-30, 2008.

VALENÇA, M.A.; MARTEIS, L.S.; STEFFLER, L.M.; SILVA, A.M.; SANTOS, L.R.C. Dynamics and Characterization of *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) Key Breeding Sites. **Neotrop Entomol** 42(1): 311-316, 2013.

VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P. D. A Generalization of The Retention Index System Including Linear Temperature Programmed Gas-Liquid Partition Chromatography. **J Chromatogr**, 11: 463-471, 1963.

VILA-NOVA, N.S.; MORAIS, S.M.; FALCÃO, M.J.C.; MACHADO, L.K.A.; BEVILÁQUA, C.M.L.; COSTA, I.R.S.; BRASIL, N.V.G.P.S.; ANDRADE-JÚNIOR, H.F. Leishmanicidal Activity and Cytotoxicity of Compounds from Two Annonacea Species Cultivated in Northeastern Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, 44(5):567-571, 2011.

VILEGAS, W.; FELICIO, J. D.; ROQUE, N. F.; GOTTLIEB, H. E. Diterpenic adducts from *Xylopia* species. **Phytochemistry**, v. 30, p. 1869-1872, 1991.

ZAHARAN, H.EL-DIM.M.; ABDELGALEIL, S.A.M. Insecticidal and Developmental Inhibitory Properties of Monoterpenes on *Culex pipiens* L. (Diptera: Culicidae). **J Asia Pac Entomol**, 14: 46–51, 2011.

WILLIAMSON, E.M. Synergy and other interactions in phytomedicines. **Phytomedicine**, 8(5), 401–409, 2001.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. EXPERT CONSULTATION FOR THE 4TH EDITION OF THE GUIDELINES FOR DRINKING-WATER QUALITY, 2007.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. DENGUE: GUIDELINES FOR DIAGNOSIS, TREATMENT, PREVENTION AND CONTROL, 2009a.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. GUIDELINES FOR EFFICACY TESTING OF MOSQUITO REPELLENTS FOR HUMAN SKIN, 2009b.

APÊNDICE I

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Nome da Pesquisa

Avaliação da Atividade Repelente Larvicida de Óleos Essências de *Xylopia* spp. (Annonaceae) e *Lippia* sp. (Verbenaceae) Contra Mosquitos *Aedes aegypti* (Diptera – Culicidae).

Pesquisadores responsáveis

Orientadora: Dr^a Roseli La Corte dos Santos (79) 2105.6626 rlacorte@ufs.br

Mestranda: Ana Mércia Dias Nascimento (79)9948-8794 ana.dia@hotmail.com

Instituição responsável pela pesquisa

Universidade Federal de Sergipe (UFS) – Departamento de Morfologia (DMO)

Informações aos voluntários

Você está sendo convidado(a) para participar de uma etapa da pesquisa “Avaliação da atividade repelente e larvicida de óleos essenciais de *Xylopia* spp.(Annonaceae) e *Lippia* sp.(Verbenaceae) sobre mosquitos da espécie *Aedes aegypti* (Diptera – Culicidae)”. Sua participação não é obrigatória. A qualquer momento, você pode desistir de participar e retirar o seu consentimento, sem que haja qualquer prejuízo em sua relação com os pesquisadores ou com a Universidade Federal de Sergipe.

O objetivo deste trabalho é avaliar a eficácia dos produtos naturais na proteção contra pousos de mosquitos. Os óleos essenciais a serem testados não possuem, comprovadamente, ação tóxica sobre a pele.

Sua participação nesta etapa da pesquisa consistirá na aplicação de uma solução de álcool a 70% em seu antebraço esquerdo. Esta área tratada será exposta dentro de uma gaiola de madeira contendo 50 fêmeas sadias do mosquito *Aedes aegypti*. Após o tratamento com álcool, o mesmo antebraço será tratado com produtos com potencial de repelência em cinco diferentes concentrações. A cada novo tratamento, será repetido o processo de expor a área tratada na gaiola. Após essa etapa, o antebraço direito será tratado com álcool 70% e realizado o mesmo procedimento ocorrido com o braço esquerdo. No total, serão sete sessões de exposição dos antebraços tratados, sendo o esquerdo exposto em seis sessões (um tratamento com álcool e cinco com as diferentes concentrações dos repelentes) e o direito em apenas uma sessão (um tratamento com álcool 70%), contendo, cada uma, até 2 minutos de duração. Os mosquitos serão provenientes de colônia mantida no insetário do Laboratório de Parasitologia. Os insetos utilizados são isentos de doença, não havendo nenhum risco de transmissão de patógenos. Os riscos antecipáveis em decorrência da participação na pesquisa restringem-se ao aparecimento de vermelhidão no local da aplicação e eventuais reações alérgicas devido à sensibilidade ao óleo ou à picada. Neste caso, o voluntário que apresentar reações de sensibilidade será afastado do ensaio. Devido à irritação que ocorre após a picada, se assim o desejar, será aplicada sobre a pele do voluntário uma loção pós-picada, que ameniza o incômodo causado pelo prurido.

Para a participação nesta pesquisa os voluntários devem apresentar idades entre 18 e 30 anos, não possuir alergia a picadas de insetos ou repelentes. Não poderão fazer uso de nenhum produto de fragrância, como perfumes, repelentes ou serem fumantes.

A pesquisadora Roseli La Corte dos Santos será responsável por quaisquer despesas decorrentes de reações ou danos aos voluntários relacionados ao ensaio.

As informações obtidas através desta pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre sua participação.

Você receberá uma cópia deste termo onde constam os telefones dos pesquisadores, podendo tirar dúvidas sobre o projeto e sua participação em qualquer momento.

Eu: _____
RG: _____, abaixo assinado, tendo recebido as informações no verso e ciente dos meus direitos abaixo relacionados, concordo em participar como voluntário da pesquisa citada.

- 1- A garantia de receber a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida a cerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros, relacionado com a pesquisa e o tratamento a que serei submetido(a);
- 2- A liberdade de retirar o meu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo;
- 3- A segurança de que não serei identificado(a) e de que será mantido o caráter confidencial da informação relacionada com a minha privacidade;
- 4- O compromisso de me proporcionar informação atualizada durante o estudo, ainda que esta possa afetar a minha vontade de continuar participando;
- 5- A disponibilidade de tratamento médico e a indenização que legalmente tenho direito, por parte da Instituição, à Saúde em caso de danos que sejam comprovados como diretamente causados pela pesquisa;
- 6- Que se existirem gastos adicionais, estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa;
- 7- Que se ocorrerem reações adversas na pele (como alergia, irritações e outras), decorrentes da aplicação local das diferentes formulações, ou pela picada dos mosquitos, os voluntários serão afastados do ensaio.

Tenho ciência do exposto acima e desejo colaborar com a pesquisa.

São Cristóvão, _____ de _____ de _____.

Assinatura do voluntário