

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

CLARICE NOLETO DIAS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA EM *Aedes aegypti* L. (DIPTERA:
CULICIDAE) DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE ESPÉCIES VEGETAIS: um estudo de
revisão e bioprospecção**

São Luís – MA
2013

CLARICE NOLETO DIAS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA EM *Aedes aegypti* L. (DIPTERA:
CULICIDAE) DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE ESPÉCIES VEGETAIS: um estudo de
revisão e bioprospecção**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Saúde e Ambiente, Área de Concentração em
Produtos Naturais, da Universidade Federal do
Maranhão, para a obtenção do Título de Mestre em Saúde
e Ambiente.

Orientadora: Profa. Dra. Denise Fernandes Coutinho
Moraes

São Luís – MA
2013

Dias, Clarice Noleto

Avaliação da atividade larvicida em *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) de óleos essenciais de espécies vegetais: um estudo de revisão e bioprospecção / Clarice Noleto Dias. – São Luís, 2013.

121 f.

Impresso por computador (Fotocópia)

Orientadora: Profa. Dra. Denise Fernandes Coutinho Moraes

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Maranhão, Programa de Pós-Graduação em Saúde e Ambiente, 2013.

1. *Aedes aegypti* L. 2. Dengue. 3. Espécies aromáticas. 4. Inseticida botânico. 5. Óleos essenciais 6. Amazônia Legal.

CDU 596.2:615.285.7

CLARICE NOLETO DIAS

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA EM *Aedes aegypti* L. (DIPTERA: CULICIDAE) DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE ESPÉCIES VEGETAIS: um estudo de revisão e bioprospecção

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Ambiente, Área de Concentração em Produtos Naturais, da Universidade Federal do Maranhão, para a obtenção do Título de Mestre em Saúde e Ambiente.

São Luís – MA, 28 de fevereiro de 2013

Banca Examinadora

Profa. Dra. Denise Fernandes Coutinho Moraes
Universidade Federal do Maranhão – Orientadora

Profa. Dra. Flávia Maria Mendonça do Amaral
Universidade Federal do Maranhão – Examinadora interna

Prof. Dr. Neuton da Silva Souza
Universidade Estadual do Maranhão – Examinador externo

Agradecimentos

A minha orientadora, Denise Moraes, pela contribuição na minha formação acadêmica e ética, dedicação concedida desde a graduação. Meus sinceros agradecimentos pela oportunidade de crescimento intelectual, ensinamentos diários e exemplo de moral e conduta.

A minha família, pelo incentivo e apoio em todos os momentos.

A minha mãe, Zilah Noletto, pelo apoio e dedicação incondicional.

A minha tia, Zeila Noletto, pela presença constante em minha vida.

Ao meu namorado, Ricieri Zorzal, pelo companheirismo, compreensão e paciência nos momentos de estresse dessa caminhada. Com você ao meu lado, sempre é possível ficar melhor!

Aos amigos por compreenderem meus momentos de ausência e estarem sempre na torcida me motivando a seguir em frente.

Aos queridos colegas do Laboratório de Farmacognosia II: Luciana, Wellyson, Milena, Maria Cristiane, Priscila, Marjane, Larissa, Carliane, Pryscila e Hugo Leonardo e aos agregados: James e Joaquim pelo apoio, companheirismo e boa convivência.

Aos professores colaboradores, Eloísa Andrade, Léa Carreira, José G Maia e Odair Monteiro, pela importante contribuição no desenvolvimento deste trabalho.

À equipe do Laboratório de Entomologia e Vetores da UFMA pelo auxílio na coleta e caracterização morfológica das larvas.

À coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Ambiente, Márita Ribeiro, pelo empenho e competência com a qual coordena este Programa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

Finalmente, desejo agradecer, embora não nominalmente, aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento desta dissertação.

A todos, expresso minha sincera gratidão.

“A natureza é o único livro que oferece um
conteúdo valioso em todas as suas folhas.”

(Johann Goethe)

RESUMO

A dengue é considerada a arbovirose mais importante do mundo, sendo endêmica em mais de 100 países, onde anualmente, 50 a 100 milhões de pessoas são infectadas pelo seu vírus. Como o seu controle depende essencialmente do combate ao seu principal vetor, o mosquito *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae), uma das formas mais eficientes de realizar este combate é através do uso de produtos químicos sintéticos, como o organofosforado temefós, contra as larvas deste mosquito. No entanto, o uso contínuo e repetido destes produtos tem contribuído para o desenvolvimento de cepas resistentes. A solução para a ocorrência de resistência pode ser encontrada na busca por novos compostos inseticidas obtidos a partir de produtos do metabolismo das plantas, como os óleos essenciais. Sendo assim, o presente trabalho objetivou realizar um levantamento dos óleos essenciais com estudos de avaliação da atividade larvicida contra *A. aegypti* e analisar a composição química e a atividade larvicida de óleos obtidos de seis espécies vegetais da Amazônia Legal maranhense. Esta dissertação foi dividida em dois capítulos; o capítulo 1 consiste no artigo de revisão de literatura, onde foi possível observar que 210 óleos essenciais de 159 espécies vegetais foram avaliados quanto à atividade larvicida e que mais de 75% destes óleos mostraram-se ativos ($CL_{50} < 100$ mg/L). Foram apresentados, ainda, os fatores que afetam a atividade larvicida, a relação estrutura atividade, os mecanismos de ação, bem como trabalhos com os constituintes isolados desses óleos. Já o capítulo 2 relata a parte experimental da avaliação da atividade larvicida e a composição química de óleos essenciais extraídos de seis espécies vegetais coletadas na região do Parque Nacional da Chapada das Mesas (Amazônia Legal maranhense), Maranhão, Brasil; os óleos foram extraídos por hidrodestilação, utilizando aparelho de Clevenger e sua composição analisada por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (CG/EM). A atividade larvicida foi avaliada segundo metodologia preconizada pela Organização Mundial de Saúde. Os sesquiterpenos hidrocarbonados constituíram a maior fração dos óleos essenciais de *Eugenia patrisii* Vahl, *Eugenia piauiensis* Vellaf., *Myrcia erythroxylon* O. Berg, *Psidium myrsinites* DC. e *Siparuna camporum* (Tul.) A. DC.; enquanto que, *Lippia gracilis* Schauer apresentou como constituintes majoritários, monoterpenos oxigenados. Cinco dos seis óleos testados demonstraram resultados promissores para o desenvolvimento de produtos larvicidas contra as larvas de *A. aegypti*, apresentando CL_{50} entre 230 e 417 mg/L. A partir desses resultados foi possível observar a necessidade de padronização de metodologias para avaliação larvicida contra *A. aegypti*, o baixo número de patentes e o potencial de óleos essenciais da flora maranhense para obtenção de produtos que possam contribuir com o controle da dengue.

Palavras-chave: Espécies aromáticas. Óleos voláteis. Amazônia Legal. Dengue.

ABSTRACT

Dengue is considered the most important mosquito-borne viral disease in the world; it is endemic in over 100 countries, where 50-100 million are infected by dengue virus per year. As the dengue control is based on the combat of the primary vector of dengue, the mosquito *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae), one of the most effective ways to achieve this combat is by the use of synthetic chemicals, such as organophosphate temephos, against the mosquito larvae. However, the continued and repeated use of these products has contributed to the development of resistant strains. The occurrence of resistance can be figured out by researches to find out news plant-base insecticides, such as essential oils. Thus, this study aimed to perform a review of the essential oils with studies on the evaluation of the larvicidal activity against *A. aegypti* and to analyze the chemical composition and the larvicidal activity of essential oils from six plant species from Amazônia Legal maranhense. This dissertation was divided into two chapters; the chapter 1 consists of a review of the scientific papers which showed that 210 essential oils from 159 plant species have already been tested by their larvicidal potential and that more than 75% of these essential oils were considered active ($LC_{50} < 100$ mg/L). This study has further information such as the factors affecting the activity, structure-activity relationships, mechanisms of action, as well as the studies with the main compounds of these oils. The chapter 2 reports the experimental research to evaluate the larvicidal activity and chemical composition of essential oils extracted from six plants collected in the “Parque Nacional da Chapada das Mesas”, Maranhão, Brazil (Amazônia Legal maranhense). The oils were extracted by hydrodistillation, using a Clevenger apparatus and their compositions were analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC/MS). The larvicidal activity was performed according to the guidelines from the World Health Organization. The sesquiterpenes hydrocarbons were the major fraction of the essential oils from *Eugenia patrisii* Vahl, *Eugenia piauiensis* Vellaff., *Myrcia erythroxylon* O. Berg, *Psidium myrsinites* DC., and *Siparuna camporum* (Tul.) A. DC.; whereas, *Lippia gracilis* Schauer essential oil showed the oxygenated monoterpenes as major compounds. Five of the six tested oils showed promising results for the development of products larvicides against *A. aegypti* larvae, showing LC_{50} value among 230 and 417 mg/L. From these results, it was possible to observe the need for standardization of methodologies for evaluation of larvicides against *A. aegypti*, the low number of patents and potential of oils from the “maranhense” flora to obtain products that can contribute to the control of dengue.

Key words: Aromatic herbs. Volatile oils. Amazônia Legal. Dengue.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

pg

Figura 1. Chemical structures of compounds that were studied for their larvicidal activity against <i>Aedes aegypti</i> L. (Diptera: Culicidae)	80
--	----

CAPÍTULO 2

Figura 1. Cromatogramas obtidos a partir da análise dos óleos essenciais de espécies vegetais da Amazônia Legal, Maranhão, Brasil, no cromatógrafo a gás Thermo modelo DSQ II; A – <i>Eugenia patrisii</i> Vahl; B – <i>Eugenia piauhiensis</i> Vellaff.; C – <i>Myrcia erythroxylon</i> O. Berg; D – <i>Psidium myrsinites</i> DC.; E - <i>Siparuna camporum</i> (Tul.) A. DC.; F – <i>Lippia gracilis</i> Schauer	106
--	-----

LISTAS DE TABELAS

CAPÍTULO 1

pg

Tabela 1. Plant essential oils that have been considered active ($LC_{50} < 100$ mg/l) against <i>Aedes aegypti</i> L. (Diptera: Culicidae) larvae, according to the criterion established by Cheng et al. (2003)	62
Tabela 2. Plant essential oils that have been considered not active ($LC_{50} > 100$ mg/l) against <i>Aedes aegypti</i> L. (Diptera: Culicidae) larvae, according to the criterion established by Cheng et al. (2003)	68
Tabela 3. Metabolites from essential oils that have been considered active ($LC_{50} < 100$ mg/l) against <i>Aedes aegypti</i> L. (Diptera: Culicidae) larvae, according to the criterion established by Cheng et al. (2003)	71
Tabela 4. Metabolites from essential oils that have been considered not active ($LC_{50} > 100$ mg/l) against <i>Aedes aegypti</i> L. (Diptera: Culicidae) larvae, according to the criterion established by Cheng et al. (2003)	74

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Espécies vegetais aromáticas coletadas no Parque Nacional da Chapada das Mesas, Centro-Sul do estado do Maranhão, Brasil	100
Tabela 2. Principais constituintes dos óleos essenciais de espécies vegetais da Amazônia Legal, Maranhão, Brasil, testados contra as larvas de <i>Aedes aegypti</i> L. (Diptera: Culicidae)	107
Tabela 3. Determinação das concentrações médias letais de 50% dos indivíduos (CL_{50}) apresentada pelos óleos essenciais de espécies vegetais da Amazônia Legal, Maranhão, Brasil, contra <i>Aedes aegypti</i> L. (Diptera: Culicidae) (n = 10) após 24h de exposição	109

LISTA DE ABREVIATURAS / SIGLAS

AChE	Acetylcholinesterase
Bs	<i>Bacillus sphaericus</i>
Bti	<i>Bacillus thuringiensis israelensis</i>
CG-EM	Cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas
CL ₅₀	Concentração média letal de 50% dos indivíduos
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CO ₂	Dióxido de carbono
DC	Dengue clássica
d.C.	Depois de Cristo
d.i.	Diâmetro interno
DENV-1-4	Sorotipos do vírus da dengue
DMAPP	Pirofosfato de dimetilanila
DMSO	Dimetilsulfóxido
EPA	United States Environmental Protection Agency
Epa	<i>Eugenia patrisii</i>
Epi	<i>Eugenia piauiensis</i>
EUA	Estados Unidos da América
FHD	Febre hemorrágica da dengue
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICMBio	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
IE	Impacto eletrônico
IPP	Pirofosfato de isopentanila
IR	Índice de Retenção
LC ₅₀	Median lethal concentration of 50% of organisms
Lg	<i>Lippia gracilis</i>
Me	<i>Myrcia erythroxylon</i>
MEP	Via do Metil-eritritol fosfato
MMA	Ministério do Meio Ambiente
NI	Information is not available
OMS	Organização Mundial de Saúde

OMS/UNICEF	Organização Mundial de Saúde / The United Nations Children's Fund
OPAS	Organização Pan-Americana de Saúde
PBO	Piperonyl Butoxide
Pm	<i>Psidium myrsinites</i>
PNCD	Programa Nacional de Controle da Dengue
PNCM	Parque Nacional da Chapada das Mesas
Sc	<i>Siparuna camporum</i>
SCD	Síndrome do Choque da Dengue
SISBIO	Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
SUS	Sistema Único de Saúde
USA	United States of America
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

	pg
1 INTRODUÇÃO	14
2 REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1 Dengue e <i>Aedes (Stegomyia) aegypti</i> L.	17
2.1.1. Aspectos epidemiológicos da dengue	18
2.1.2 Controle da dengue	25
2.2 Considerações gerais sobre os óleos essenciais	30
2.3 Espécies vegetais na atenção a saúde	32
2.4 Parque Nacional da Chapada das Mesas: Cerrado e Amazônia Legal	34
3 OBJETIVOS	37
3.1 Objetivos gerais	37
3.2 Objetivos específicos	37
REFERÊNCIAS	38
CAPÍTULO 1. Essential oils and their compounds as <i>Aedes aegypti</i> L. (Diptera, Culicidae) larvicides: review	55
Introduction	56
Essential oils and their compounds as larvicides against <i>Aedes aegypti</i>	58
Factors affecting the larvicidal activity of essential oils and their compounds	75
Structure–activity relationships of essential oils compounds	77
Mode of action	81
Patents	83
Conclusion	84
References	85
CAPÍTULO 2. Atividade larvicida de óleos essenciais de espécies vegetais da Amazônia Legal, Maranhão, Brasil, contra <i>Aedes aegypti</i> L. (Diptera: Culicidae) ...	95
1 Introdução	97
2 Materiais e Métodos	99
2.1 Material vegetal	99
2.2 Destilação dos óleos essenciais	101
2.3 Análise química dos óleos essenciais	101

2.4 Bioensaio larvicida	102
2.5 Análise estatística	103
3 Resultados	104
3.1 Análise química dos óleos essenciais	104
3.2 Bioensaio larvicida	104
4 Discussão	110
5 Conclusão	112
Referências	113
CONSIDERAÇÕES FINAIS	120

1 INTRODUÇÃO

O uso de plantas para o tratamento e controle de doenças remonta às mais antigas civilizações. Essa prática se tornou um hábito nas diversas comunidades e um dos pilares da indústria e do comércio na formulação e comercialização de produtos farmacêuticos e agrícolas (MOSIHUZZAMAN; SYDNES, 2010; AZMIR et al., 2013).

Existem cerca de 215.000 espécies vegetais catalogadas no planeta (MORA et al., 2011). Aproximadamente 20% desse valor é representado pela flora brasileira, com cerca de 40.000 espécies, que estão distribuídas nos biomas Amazônia, Cerrado, Mata Atlântica, Caatinga, Pampa e Pantanal. Da flora mundial, estima-se que 10 a 20% das espécies permanecem desconhecidas. Esta situação se torna mais grave em relação às espécies vegetais do Brasil; apesar da rica biodiversidade brasileira, estas espécies são consideradas as menos estudadas e as que mais sofrem ameaças de extinção no planeta (JOPPA et al., 2011; BRASIL, 2012; OLIVEIRA, et al. 2012).

O presente trabalho está inserido em um projeto de rede intitulado “Avaliação botânica, química e biológica das plantas aromáticas da Amazônia Oriental (BIONORTE)”, coordenado pelo Prof. Dr. Jose Guilherme Soares Maia e financiado pelo CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), através do Edital MCT/CNPq/FNDCT/CT-AMAZÔNIA/BIONORTE N° 66/2009, com o objetivo de levantar, coletar e estudar, quimicamente, espécies vegetais aromáticas da região da Amazônia Oriental, incluindo áreas dos estados do Pará, Maranhão e Tocantins.

Dentro das linhas de pesquisa do grupo, encontra-se a exploração de espécies vegetais que têm sido pouco estudadas; portanto, uma das atividades realizadas durante o desenvolvimento do projeto foi a coleta de espécies vegetais aromáticas de grande ocorrência, selecionadas através de critérios sensoriais, no Parque Nacional da Chapada das Mesas (PNCM), estado do Maranhão, Brasil.

O PNCM é uma Unidade de Conservação que abriga diversas espécies da flora e fauna da Amazônia e do Cerrado (MORAES; LIMA, 2007). A Amazônia e o Cerrado são os maiores biomas brasileiros; juntos eles ocupam 86% do território nacional. Apesar da importância da biodiversidade presente nestes biomas, 17% e 55% da vegetação da Amazônia e do Cerrado, respectivamente, foi desmatada devido ao dinamismo da ocupação humana (VIEIRA et al., 2008; BRASIL, 2011a).

Neste contexto, a pesquisa por componentes ativos em espécies vegetais com atividades biológicas e farmacológicas pode ser uma medida importante na preservação e utilização sustentável da biodiversidade vegetal. O desenvolvimento do conhecimento científico e o do acesso aos recursos genéticos associados às espécies presentes em nossa flora conferem valor econômico a elas (BRASIL, 2007; MAY, 2011).

Os componentes ativos identificados nas espécies vegetais são, principalmente, micromoléculas produzidas pelo seu metabolismo secundário. Estes metabólitos variam de espécie para espécie e podem estar presentes em diversas partes das plantas (HADACEK, 2002; BIESKI, 2005).

Um produto formado por metabólitos secundários é o óleo essencial, também conhecido como óleo volátil ou essência. Os óleos essenciais são constituídos, principalmente, por fenilpropanoides, sesquiterpenos e monoterpenos; podendo estar presentes em diversas espécies pertencentes às famílias consideradas aromáticas (BASER; BUCHBAUER, 2010). Estas famílias, geralmente, apresentam importância comercial pela aplicação de seus óleos essenciais na perfumaria, cosmetologia, na indústria de alimentos, medicamentos e produtos de higiene (CUNHA et al., 2004).

Um papel ecológico dos óleos essenciais na natureza é o de proteger a planta contra danos causados por insetos herbívoros e patógenos (GRODNITZK; COATS, 2002; ISMAN, 2005; BAKKALI et al., 2008; HARE, 2011). Partindo do pressuposto de que os óleos essenciais são inseticidas naturais, diversos estudos têm confirmado o potencial biológico de óleos essenciais contra larvas de *Aedes (Stegomyia) aegypti* L. (1762) (Diptera: Culicidae) (COSTA et al., 2004; DHARMAGADDA et al., 2005; LEE, 2006; ALMEIDA et al., 2009; CHUNG et al., 2009; FREITAS et al., 2010).

Aedes aegypti é o principal vetor da dengue, doença infecciosa aguda causada por quatro sorotipos do vírus do gênero *Flavivirus*. Atualmente, a prevenção da propagação da dengue depende essencialmente do combate ao vetor. Este combate pode ser realizado através de diversas medidas, dentre elas o uso de produtos químicos que apresentem ação larvicida contra as formas imaturas de *A. aegypti* (BRASIL, 2010a).

Considerando a importância do controle da dengue em nosso país, este trabalho foi realizado para avaliar os estudos de óleos essenciais com atividade larvicida contra *A. aegypti* e determinar a composição química e o potencial larvicida contra *A. aegypti* de óleos essenciais extraídos de seis espécies vegetais coletadas no interior e nas zonas de

amortecimento do Parque Nacional da Chapada das Mesas. Dessa forma, espera-se contribuir para o estudo de óleos essenciais da flora da Amazônia Legal maranhense e para a diminuição dos casos de dengue.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Dengue e *Aedes (Stegomyia) aegypti* L.

A dengue é uma doença infecciosa aguda, cujo agente etiológico é o vírus do gênero *Flavivirus* (sorotipos: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4) (BRASIL, 2010a). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2012, a dengue passou a ser considerada a arbovirose mais importante do mundo; a incidência mundial da dengue está 30 vezes maior que há algumas décadas. Atualmente, a dengue é endêmica em mais de 100 países, onde vivem aproximadamente 2,5 bilhões de pessoas. Estima-se que, anualmente, 50 a 100 milhões de pessoas são infectadas por este vírus; dentre os casos de infecção, 500.000 são da forma clínica de dengue grave. A porcentagem de mortalidade da doença é de 2,5% e as maiores vítimas são as crianças (OMS, 2009a, 2012a, b).

A dengue pode causar nos seres humanos manifestações clínicas benignas ou graves; a evolução clínica benigna pode se apresentar como uma infecção inaparente ou, como na maioria dos casos, com sintomas de dengue clássica (DC). Esta é caracterizada pelo início súbito de febre alta, cefaleia, mialgia, dor retro-orbital, prurido cutâneo e uma variedade de sintomas não específicos. Já os casos graves de dengue podem se apresentar como febre hemorrágica da dengue (FHD) e/ou síndrome do choque da dengue (SCD). Nestes casos, inicialmente se observa sintomas semelhantes aos da DC, com o diferencial de que entre o 3º e 4º dia há um agravamento do quadro clínico do paciente, que sofre manifestações hemorrágicas e colapso circulatório (BRASIL, 2005a; 2010b).

O principal vetor da dengue, *A. aegypti*, foi originalmente descrito no Egito e é oriundo da região etiópica. Este mosquito tem acompanhado a migração do homem pelo mundo, sendo levado aos diversos locais de forma passiva através dos meios de transporte; é considerado um inseto cosmopolita, pois está disperso em áreas tropicais e subtropicais; e antropofílico, pois é bem adaptado ao ambiente urbano (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994).

Este vetor é um pequeno mosquito de escamas pretas, com manchas branco-prateadas na superfície dorsal do tórax. Para completar seu desenvolvimento, este inseto passa pelas fases de: ovo, larva (quatro estádios), pupa e mosquito adulto; as larvas e a pupa se desenvolvem em ambiente aquático. Já os mosquitos adultos, tanto os machos quanto as fêmeas, obtêm fontes de carboidratos a partir de sucos vegetais; no entanto, as fêmeas

necessitam para a manutenção de seus ovos, de fontes proteicas, que são obtidas durante o repasto sanguíneo (KLOWDEN, 2007; OMS, 2009a).

Este repasto sanguíneo das fêmeas de *A. aegypti* geralmente é realizado em horários diurnos e preferencialmente em humanos. Devido a estas características de hábito alimentar, esta espécie desenvolveu certa habilidade de escapar de ser morto por sua vítima durante a hematofagia, o que permite que ela tenha várias refeições curtas de sangue em diferentes hospedeiros. Apesar de este ser um processo natural para o desenvolvimento da espécie, durante a hematofagia, as fêmeas de *A. aegypti* infectadas pelos vírus da dengue e da febre amarela urbana podem inocular partículas virais com a saliva e transmitir estes vírus para os seres humanos (EIRAS, 2005; ELDRIDGE, 2005; SINGHI et al., 2007).

2.1.1. Aspectos epidemiológicos da dengue

O mosquito *A. aegypti*, originalmente identificado na África, invadiu outros continentes a partir do século XV. Nos séculos XVII, XVIII e XIX, ele se dispersou por todo hemisfério ocidental, pelo Mediterrâneo e pela Ásia tropical, respectivamente. No final do século XIX e início do século XX, *A. aegypti* chegou às Ilhas do Pacífico (TEIXEIRA et al., 1999).

Na enciclopédia chinesa, publicada pela primeira vez durante a Dinastia Chin (265 a 420 d.C.), há registros de casos clinicamente compatíveis com a dengue. Nestes relatos são listados os sintomas e os medicamentos para o tratamento de uma enfermidade que, nesta situação foi chamada de “veneno de água”, pois se correlacionou os mosquitos às coleções de água (GUBLER, 1998).

Os primeiros registros de epidemias de dengue ocorreram na Ásia, África e Estados Unidos da América (EUA) nos anos 1779 e 1780. A ocorrência destes surtos quase que simultaneamente em três continentes indicou que o vírus e o seu mosquito vetor estavam distribuídos pelos trópicos há mais de 200 anos. Nesta época, as grandes epidemias não eram muito frequentes; aconteciam em intervalos de 10 a 40 anos, pois a disseminação se sucedia a partir das embarcações à vela, que eram um modo lento de transporte (GUBLER; CLARK, 1995).

Na Europa, a primeira epidemia foi registrada na Grécia nos anos 1927-1928. Nesta ocasião, mais de um milhão de pessoas foram infectadas, com o registro de 1000 mortes ocasionadas pela FHD/SCD. Após a II Guerra Mundial, a dengue foi erradicada na Europa,

provavelmente devido ao uso de inseticidas em campanhas de erradicação da malária; no entanto, ainda existe a preocupação do retorno da transmissão da dengue no Velho Continente. Em países como a Albânia, Itália, Bélgica, França, Montenegro, Suíça, Hungria e Espanha, há a presença de *A. albopictus*, que é uma espécie que também pode transmitir a dengue (LÓPEZ-VÉLEZ; MORENO, 2005).

A dinâmica de transmissão e a epidemiologia da dengue mudaram drasticamente durante a II Guerra Mundial. A perturbação ecológica criou condições ideais para o início de uma pandemia global originada no sudeste da Ásia; o movimento das tropas expandiu a propagação do vírus. Com esta distribuição geográfica, muitos países sofreram frequentes epidemias causadas por múltiplos sorotipos do vírus da dengue (hiperendemicidade), que cocirculavam nas comunidades. A primeira epidemia de FHD/SCD no sudeste da Ásia emergiu nos anos de 1950; entre 1953 e 1954, ocorreu nas Filipinas, seguido da Tailândia em 1958 e de Singapura e Vietnã em 1960. Nos anos 1970, as epidemias de DC e FHD/SCD se espalharam por toda a região (GUBLER, 2002; 2006).

Acredita-se que a entrada no Hemisfério Ocidental de *A. aegypti*, o principal vetor de dengue nas Américas, se iniciou no período das Grandes Navegações, por meio dos navios que traficavam escravos africanos e dos navios europeus vindos da Espanha e de Portugal, entre os séculos XV e XVII. Em relação à ocorrência de casos de dengue nas Américas, os primeiros relatos datam de mais de 200 anos atrás; fontes históricas indicam que, nos anos 1600, ocorreu um surto de dengue nas Antilhas Francesas (1635) e no Panamá (1699). Peru, México, Colômbia, EUA (Filadélfia) e diversas ilhas do Caribe foram países afetados por epidemias de dengue nos anos 1700. Em países como o Brasil, Venezuela e Argentina isto só aconteceu nos anos 1800 e na primeira metade dos 1900 (DÁNTES, 1991; PINHEIRO; NELSON, 1997; ISTURIZ et al., 2000; MOORE; FREIER, 2005).

Os primeiros relatos de dengue no Brasil surgiram no final do século XIX; entre 1846 e 1848, foram registradas várias epidemias no Rio de Janeiro, São Paulo e Salvador. Novos surtos foram relatados entre 1851 e 1853, em São Paulo (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994; TEIXEIRA et al., 1999).

Uma campanha continental, planejada pela Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS), foi realizada entre os anos 1940 e 1960 para a erradicação de *A. aegypti*; o mosquito foi então considerado erradicado em 19 países da América do Sul e Central. Somente no sul dos EUA, algumas ilhas do Caribe e uma parte do norte da América do Sul, *A. aegypti* não foi

erradicado. Devido ao sucesso dos programas de erradicação, não foram registradas epidemias de dengue entre 1946 e 1963 (SCHLIESSMAN; CALHEIRO, 1974; TAPIA-CONYER et al., 2009; SHEPARD et al., 2011).

Apesar dos programas nacionais terem sido bem sucedidos, as medidas de controle de *A. aegypti* não foram mantidas nos anos 1970. Isto ocasionou a reinfestação do mosquito em todos os países onde ele havia sido erradicado (GUBLER, 2005). A partir de então surgiram surtos epidemiológicos em quase todos os países das Américas. No Brasil, os primeiros registros após a reintrodução de *A. aegypti*, foram em Salvador (1976), seguido do Rio de Janeiro e Santos (1977), Natal (1979) e Foz do Iguaçu (1981) (EIRAS, 2005). Como os meios de transporte estavam mais modernos e rápidos, a mobilidade das pessoas fez com que aumentasse a incidência e a distribuição geográfica do vírus de dengue (GUBLER, 2002; OMS, 2012b).

O grande marco da reemergência da dengue nas Américas foi o primeiro registro de DENV-1 na região, em 1977. Esta expansão do vírus causou uma pandemia devastadora que só terminou em 1980, tendo afetado 43 países das Américas. Em 1981, DENV-2 causou uma grande epidemia de FHD em Cuba, seguido de outras partes do Caribe e da América Central e do Sul (MARTÍN et al., 2010). Neste mesmo ano, ocorreu o primeiro surto de dengue documentado clínica e laboratorialmente no Brasil (DENV-1 e DENV-4), mais especificamente, no noroeste da Amazônia (Boa Vista, Roraima) (BRASIL, 2004; BRAGA; VALLE, 2007a). A segunda maior epidemia de FHD aconteceu na Venezuela entre 1989 e 1990, com 3.108 casos. O número de casos de FHD, nas Américas, no período de 1980 a 1996 variou bastante; foram registrados 39.307 casos em 1984 e 388.591 em 1991 (PINHEIRO; NELSON, 1997; WILSON; CHEN, 2002).

Somente em 1990, DENV-2 foi introduzido no Brasil, o que levou a ocorrência dos primeiros casos confirmados de dengue hemorrágica no país. A partir de 1994, a dengue passou a ocorrer no Brasil de forma contínua, com o registro de várias epidemias, o que caracterizou o país em um padrão endêmico e epidêmico (SIQUEIRA-JR et al., 2005). Em 1995, o Maranhão foi o estado nordestino que apresentou a maior incidência de casos de dengue, totalizando 38,8% de todos os casos desta região brasileira. Neste mesmo ano, Rebêlo et al. (1999) analisaram a distribuição de *A. aegypti* nos municípios do Estado e aqueles que apresentaram os maiores índices de positividade predial foram os pertencentes a Amazônia Maranhense (3,5%) e os da Ilha de São Luís (2,5%). Durante este período, somente os

sorotipos DENV-1 e DENV-2 haviam sido isolados no Maranhão (VASCONCELOS et al., 1999).

Em 2000, DENV-3 foi detectado pela primeira vez no Brasil, mais especificamente no estado do Rio de Janeiro. Entre 1990 e 2009, DENV-1–3 foram os três sorotipos do vírus responsáveis por aproximadamente cinco milhões de casos de dengue no Brasil; dentre estas infecções, mais de 15.000 casos foram de FHD e acarretaram mais de 1.000 mortes. Em 2002, pela primeira vez no Brasil, o número absoluto de mortes por FHD foi maior que por malária, demonstrando que a dengue é a doença transmitida por vetor de maior gravidade na região tropical (NUNES et al., 2012).

No município de São Luís, Maranhão, Brasil, entre 2001 e 2005, foram notificados 5.780 casos de dengue, sendo que 46,5% destes casos ocorreram no ano de 2005. A partir do inquérito sorológico realizado, identificou-se DENV-1 e DENV-2 em 2001, e a partir de 2002, DENV-3 (OLIVEIRA, A. et al., 2008).

No estado do Maranhão, em 2007, foram notificados 13.412 casos de dengue; no ano seguinte, este número reduziu para 5.723. Em 2009, houve uma nova redução, desta vez para 2.251 notificações. Já em 2010, houve um aumento de 156,7% no número de casos (5.778), quando comparado com o ano anterior. A predominância dos diferentes sorotipos do vírus da dengue variou no decorrer dos anos. O período de 2001 a 2006 foi marcado pela predominância de DENV-3; de 2007 a 2009, DENV-2 predominou e em 2010, houve maior notificação de DENV-1 (BRASIL, 2009a, 2011b).

Desde a introdução do vírus da dengue no Brasil, os adultos jovens (20 a 40 anos de idade) eram os mais afetados pela doença. No entanto, esta situação mudou a partir de 2006; com a recirculação de DENV-2 as crianças passaram a ser o grupo mais atingido pelos sintomas da dengue, pois eram os mais susceptíveis por não terem tido contato prévio com este sorotipo. Esta mudança no perfil da doença, com deslocamento da faixa etária, levou a um aumento no número de casos das formas graves da dengue (BRASIL, 2009b).

Em 2008, no estado do Rio de Janeiro, Brasil, foram registrados mais de 240.000 casos de dengue, com mais de 11.000 hospitalizações e 230 mortes confirmadas. Esta situação levou ao urgente cumprimento de medidas para a melhoria na assistência à saúde e nas operações para o controle do vetor (BARRETO; TEIXEIRA, 2008).

Apesar dos esforços, em 2010, DENV-4 reemergiu no Brasil, 28 anos depois de ter sido identificado pela última vez no estado de Roraima. Com a cocirculação de DENV-4,

DENV-1 e DENV-2, mais de 1,2 milhões de casos de dengue foram registrados no país. Um exemplo desse sobressalto ocorreu no município de Boa Vista, estado de Roraima; este município, que possuía aproximadamente 270.000 habitantes, em 2010, registrou 5.243 casos de dengue (TEMPORÃO et al., 2011).

Dados do Ministério da Saúde do Brasil mostram que em 2011 houve uma redução de 18% no número de casos (715.666) no país quando comparado a 2010. No entanto, nas regiões Norte, Nordeste e Sul observou-se um aumento significativo de casos (BRASIL, 2011c). Segundo a OPAS (2012), o Brasil notificou 545.443 casos de dengue em 2012, com a cocirculação dos quatro sorotipos do vírus. Destes casos, 3.702 foram de FHD/SCD e causaram 237 óbitos. Os casos notificados no Brasil corresponderam a mais da metade (51,8%) dos casos relatados nas Américas.

Apesar de estes dados oficiais serem considerados alarmantes, é importante notar que eles não correspondem à realidade. Este fato pôde ser confirmado a partir de um estudo realizado por Teixeira et al. (2002), no qual os autores demonstraram que em um período de 12 meses, 560.000 pessoas foram infectadas pelo vírus da dengue, enquanto que o sistema oficial de notificação registrou apenas 360 casos. Outro dado importante demonstrado neste estudo é que somente os casos das pessoas atendidas no sistema público de saúde eram registrados pelo sistema de notificação. Devido a isso, as notificações indicam que as pessoas das classes socioeconômicas menos favorecidas são as mais atingidas pela dengue, pois são elas as que mais usam esse sistema de saúde.

A situação da dengue nas Américas é preocupante; a incidência tem aumentado no decorrer das décadas. O estado da dengue evoluiu de pouco endêmico para hiperendêmico, com transmissão autóctone. Mais de 30 países de uma larga faixa do continente americano registram casos da doença anualmente. Dados da OMS mostram que a região das Américas reporta mais casos de dengue no mundo (68%, entre os anos 2000 e 2006). Os países que mais sofrem com o impacto da dengue são Brasil, Colômbia, Venezuela, Costa Rica e Honduras (82% do total) e os casos mais graves ocorrem em crianças (BRASIL, 2009b; OMS, 2011; OPAS, 2012).

A transmissão da dengue se mantém endêmica nas regiões tropicais e subtropicais dos países em desenvolvimento. A incidência da dengue no mundo nos últimos anos é maior do que em qualquer outro período da história (MORRISON et al., 2008). A última década tem mostrado uma situação alarmante em relação às epidemias de dengue. Elas atingem mais de

cem países da África, Américas, Mediterrâneo Ocidental, Sul e Leste da Ásia e Oeste do Pacífico (ACIOLE, 2009). A OMS (2012b) mostra que, comparada com a situação há 50 anos, a incidência de dengue aumentou 30 vezes.

Portanto, hoje a dengue é considerada a arbovirose mais importante no mundo; a difusão dos quatro sorotipos do vírus da dengue representa uma ameaça de pandemia global. Segundo Gubler (2011), se o crescimento populacional, a urbanização e a globalização continuarem como previsto, a frequência e a severidade das epidemias de dengue tenderão a piorar.

A dengue causa um significativo impacto tanto na saúde, quanto na economia das populações que vivem em áreas endêmicas (OMS, 2009a). No entanto, este impacto é difícil de ser medido com exatidão; esta é uma doença que apresenta baixa taxa de letalidade, não obstante causa muitas perturbações sociais que não são notificadas. Além disso, os números reais da dengue são, provavelmente, muito piores. A subnotificação, a fiscalização precária e os erros na classificação dos casos tornam escassos os dados fidedignos do impacto da dengue (GUBLER, 2002).

Shepard et al. (2011) calcularam o fardo econômico da dengue nas Américas; para isso, consideraram a perspectiva social da doença. No entanto, não incluíram os custos voltados para o controle do vetor e nem os prováveis valores que deixaram de ser arrecadados através de perdas no turismo. O custo da dengue para a região ficou estimado, em média, em US\$ 2,1 bilhões por ano, com uma faixa de intervalo de US\$ 1 a 4 bilhões.

Segundo Singhasivanon e Jacobson (2009), a quantificação do impacto da dengue ainda é difícil, pois não existem estimativas precisas da incidência de dengue no mundo. É necessário definir, além dos custos do tratamento e da prevenção da doença, os custos indiretos promovidos por ela, como a morbidade, que representa perda de produtividade e de renda da comunidade.

A alta incidência e a expansão geográfica da dengue são influenciadas por diversos fatores, que contribuem para a emergência e reemergência da doença em diversos países do mundo. Dentre eles, podemos citar: a falta de infraestrutura dos sistemas públicos de saúde, o crescimento exponencial das populações, as mudanças nos estilos de vida das comunidades, os descuidos no controle do vetor, entre outros (PINHEIRO; NELSON, 1997; GUBLER, 2011).

No Brasil, as condições socioambientais para a proliferação de *A. aegypti* são ideais. Com a urbanização acelerada, desordenada e não planejada, surgiu um ambiente com diversas deficiências estruturais (BRADBURY, 2011). Segundo a OMS/The United Nations Children's Fund (OMS/UNICEF) (2008), entre 1990 e 2006, a população urbana sem acesso adequado a água potável aumentou de 107 para 137 milhões.

A ausência de boas condições de saneamento básico, como a coleta adequada de resíduos sólidos e o abastecimento de água, faz com que haja um aumento na formação de criadouros de *A. aegypti*. Isso por que algumas comunidades, para satisfazer suas necessidades de consumo, armazenam a água em recipientes inapropriados. Assim, para dar continuidade ao seu ciclo de vida, este inseto deposita seus ovos nas paredes úmidas desses recipientes, um pouco acima da superfície líquida (MENDONÇA et al., 2009). Durante o verão, com a maior ocorrência de precipitação de chuvas, esta situação tende a piorar, pois o nível da água nos recipientes aumenta, permitindo a eclosão dos ovos (SILVA et al., 2012).

No entanto, a dengue não é uma doença que ocorre apenas nos períodos de chuva; *A. aegypti* é um inseto altamente antropofílico, que prefere depositar seus ovos em reservatórios artificiais de água feitos pelo homem e que independem da água das chuvas. Além disso, apesar de preferirem águas limpas, há registros de larvas de *A. aegypti* presentes em águas poluídas (SILVA et al., 1999; GARCÍA-REJÓN et al., 2011).

Diversos estudos têm caracterizado os locais preferidos pela fêmea de *A. aegypti* para a deposição de seus ovos. Forattini e Brito (2003), Gonçalves-Neto e Rebêlo (2004) e Fernández et al. (2010) relataram em seus estudos que caixas d'água, cisternas, tanques e tambores, utilizados para o armazenamento de água nos domicílios, foram os tipos de recipientes onde mais se encontrou larvas de *A. aegypti*. Outros recipientes como vasos de planta, garrafas, latas, pneus e frascos de plástico também são locais onde é comum encontrar larvas desse mosquito.

Teixeira et al. (1999) observaram que no Nordeste do Brasil, região mais pobre do país, os depósitos que mais comumente continham larvas de *A. aegypti* eram aqueles utilizados para o armazenamento de água, pois nesta região é comum as pessoas não terem em seus domicílios um abastecimento de água adequado. Enquanto que, no Sudeste, região mais rica, os vasos de planta predominavam na positividade destas larvas.

Um dos grandes desafios no controle da dengue surge do fato de que os ovos de *A. aegypti* são muito resistentes à dessecação. Depois que os ovos completam o período

embrionário, eles podem sofrer diapausa e permanecer viáveis por mais de um ano. Esta característica de *A. aegypti* permite que os seus ovos sejam transportados por longas distâncias. Isto auxilia na dispersão da espécie, pois basta que o ovo entre em contato com água, em outro local, para que eles eclodam, dando origem a outros espécimes (EIRAS, 2005).

2.1.2 Controle da dengue

O controle da dengue depende diretamente do combate aos seus vetores. Visto que, apesar de diversas pesquisas realizadas até o momento, não há vacinas disponíveis comercialmente. Para que uma vacina possa ser utilizada na prevenção da dengue, esta precisa promover proteção contra os quatro sorotipos do vírus da dengue, pois o desenvolvimento de resposta imunológica pode estar relacionado ao aumento da severidade da doença (GALLER et al., 2011; KONISHI, 2011).

Além disso, não existem drogas farmacológicas disponíveis para o tratamento da dengue. Desta forma, atualmente, a prevenção da propagação do vírus depende essencialmente do combate ao seu principal vetor, o mosquito *A. aegypti* (GUBLER, 2011).

A erradicação de *A. aegypti* tem se constituído um grande desafio, principalmente nos países em desenvolvimento. Apenas um tipo de intervenção não é suficiente para o controle efetivo da dengue. A erradicação do mosquito vetor deve ser fundamentada em uma abordagem integrada (OMS, 1995). Segundo a OMS (2012a), o controle integrado de vetores deve ser definido com decisões racionais, que utilizem metodologias eficazes, de baixo custo, ecologicamente corretas e sustentáveis. Além disso, os programas de controle devem ser suportados pelos diversos setores governamentais e não somente pelo da saúde, adequando-se a cada realidade local.

Erlanger et al. (2008) compararam a eficiência de diferentes intervenções de controle da dengue em países em desenvolvimento. A partir dos dados obtidos neste estudo, os autores confirmaram que o controle integrado de vetores é a metodologia mais eficaz em reduzir a propagação da dengue. Os melhores resultados foram obtidos quando as intervenções foram adaptadas às condições ecoepidemiológicas e socioculturais das comunidades, agregadas a programas educacionais.

Segundo Teixeira et al. (1999), o combate ao vetor é baseado em três componentes: melhorias no saneamento do meio ambiente, ações de educação/comunicação para a

população e combate direto ao vetor. O saneamento é fundamentado no manejo ambiental, no qual se pretende eliminar os potenciais criadouros de *A. aegypti*. Este manejo pode ser realizado através de medidas como o fornecimento adequado de água, para que a população não precise armazená-la de forma imprópria, e a coleta de resíduos sólidos que, ao serem descartados inadequadamente, formam reservatórios de água (NASCIMENTO-JR; BERNARDES, 1999; BRASIL, 2002).

As ações de educação, comunicação e informação visam proporcionar mudanças de base cultural e social no comportamento das pessoas em relação aos cuidados individuais e coletivos que podem ser realizados para prevenir a dengue. A participação da comunidade em ações de prevenção da dengue é fundamental nos programas de controle da dengue (GUBLER, 1998; TAPIA-CONYER et al., 2009).

No entanto, as campanhas educativas não afetam de forma duradoura o comportamento da população. A participação da comunidade é significativa apenas durante as epidemias e a população não se conscientiza sobre as informações técnicas da dengue (REIS et al., 2013). Como a eliminação mecânica de focos de *A. aegypti* só é eficiente se todos os membros da comunidade agirem para alcançar este objetivo, campanhas baseadas apenas na participação da comunidade não são bem sucedidas (MORRISON et al., 2008). Para modificar esta situação, é necessário conhecer as comunidades e os seus hábitos. A partir daí é possível criar ferramentas que reforcem a ideia de que cada agente social é corresponsável pela prevenção de casos de dengue (DONALÍSIO; GLASSER, 2002).

O combate direto ao vetor pode ser considerado o fator prevalente no sucesso dos programas de controle da dengue. Este combate pode ser químico, biológico e físico. O controle químico, através do uso de inseticidas, é uma das intervenções mais utilizadas nos programas de saúde pública (BRAGA; VALLE, 2007b). Os produtos químicos podem ser utilizados em tratamentos focais, perifocais e espaciais. O tratamento focal consiste na eliminação das formas imaturas de *A. aegypti* através da aplicação de larvicidas, como o organofosforado temefós, em focos onde as larvas estejam presentes. O tratamento perifocal é realizado em superfícies próximas aos focos para impedir a infestação do vetor. No tratamento espacial é realizada a nebulização de inseticida, com o objetivo de matar as fêmeas adultas contaminadas. No entanto, esta última técnica tem pouca aplicabilidade diante da complexidade dos centros urbanos (BRASIL, 2002; OMS, 2006; MACORIS, 2011).

Para o controle biológico de *A. aegypti* são utilizados organismos vivos que competem, eliminam ou parasitam estes vetores. Inclui-se o uso de predadores invertebrados aquáticos: *Toxorhynchites* e copépodos; de peixes larvófagos: *Gambusia affinis* e *Poecilia* spp. (SENG et al., 2008); de bactérias patogênicas para as larvas: *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) e *Bacillus sphaericus* (Bs); e dos fungos patogênicos *Metharizium anisopliae* (POLANCZYK et al., 2003). Além destas medidas, o uso de hormônios miméticos (reguladores de crescimento sintéticos) (MARTINS; SILVA, 2004) e o controle genético apresentam um bom potencial para erradicar as populações de *A. aegypti* (OMS, 2012b).

A esterilização de machos adultos de *A. aegypti* e a encubação de uma bactéria intracelular simbiote chamada *Wolbachia* nas populações naturais destes mosquitos são intervenções biológicas que podem ser utilizadas como alternativa no controle da dengue. Esta segunda intervenção é baseada em estudos que mostram que mosquitos fêmeas, que portam esta bactéria, ficam incapazes de transmitir o vírus da dengue (MOREIRA et al., 2009; FREITAS et al., 2012).

Outra ferramenta de fácil aplicabilidade para o controle dos vetores da dengue é o controle físico. Este controle pode ser realizado através de ações mecânicas, como a eliminação dos criadouros (BRASIL, 2009c). A flambagem das paredes dos reservatórios de água que não podem ser eliminados e o aquecimento da água também são formas úteis de eliminação de ovos, larvas e pupas de *A. aegypti*, pois eles não sobrevivem a temperaturas superiores a 49°C (SMITH et al., 1988).

Pode-se, ainda, utilizar produtos que formem um filme ultrafino na superfície da água. Estes filmes são monomoleculares e se espalham sob a superfície da água, atuando como larvicidas e pupicidas por mecanismos muito mais físicos que químicos. Eles impedem a suspensão das larvas e pupas à superfície da água pela diminuição da tensão superficial desta. Assim, as larvas e as pupas ficam sufocadas e incapazes de emergir para a forma adulta (NAYAR; ALI, 2003).

No Brasil, o Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD) é hoje a maior campanha de saúde pública instituída pelo Ministério da Saúde. A dengue é um grande desafio para o país, pois é uma doença que, mesmo com os recursos científicos e tecnológicos disponíveis atualmente, ainda não apresenta um tratamento efetivo contra o agente etiológico e nem uma vacina eficaz e segura para a sua prevenção (TAUIL, 2006).

Mesmo com a execução dos programas de controle da dengue, observa-se um avanço significativo da dengue no Brasil e em outros países. Esta situação demonstra que programas como o PNCD, apesar de fornecerem informações para a população sobre a transmissão da doença, não estão sendo capazes de mudar de forma permanente os hábitos das comunidades (PESSANHA et al., 2009).

Devido à dinâmica da dengue, os programas que visam o seu controle são difíceis de serem administrados. Portanto, é fundamental que as ações sejam tanto a nível nacional quanto comunitário (TAPIA-CONYER et al., 2009). Um programa bem sucedido de controle da dengue tem que ser sustentado pelo compromisso das lideranças em obter efeitos duradouros, que podem ser obtidos a partir de um planejamento cuidadoso, que seja executado conscientemente (MORRISON et al., 2008).

A OMS recomenda alguns compostos e formulações que podem ser usados no controle da larva de *A. aegypti*. Entre eles, há o organofosforado temefós, a bactéria larvicida *Bacillus thuringiensis israelensis* e o hormônio juvenil piriproxifeno. Temefós é o larvicida mais apropriado para ser usado em programas de controle da dengue, pois é eficaz por várias semanas nos reservatórios de água tratados. Além disso, o temefós apresenta baixo custo e baixa toxicidade a organismos não alvos e a humanos, quando aplicado na concentração recomendada (menor que 1 mg/L) (OMS, 2009b, 2012c).

O uso contínuo e repetido de temefós e de outros inseticidas nos programas de saúde pública e na agricultura tem contribuído para o desenvolvimento de cepas resistentes de vetores transmissores de doenças (LINES, 1988; OMS, 1992; POLSON et al., 2011). Este processo de resistência ocorre, naturalmente, em uma frequência muito baixa em populações de mosquitos, porém em populações expostas aos inseticidas é inevitável que este processo de evolução seja acelerado. A exposição aos inseticidas mata os indivíduos suscetíveis, mas seleciona aqueles que são resistentes às dosagens aplicadas. A partir daí, as cepas resistentes se reproduzem, transferindo aos seus descendentes a habilidade de tolerar certos inseticidas (DONALÍSIO; GLASSER, 2002; MACORIS, 2011).

Diversos fatores podem estar envolvidos no processo de evolução da resistência aos inseticidas. Fatores genéticos são caracterizados pela frequência, número e dominância dos alelos que conferem resistência. Fatores relacionados à biologia e ecologia dos insetos podem ser divididos em bióticos (duração do ciclo biológico, características do processo reprodutivo e tamanho da população) e comportamentais (dispersão, isolamento e sobrevivência). Os

fatores operacionais estão intimamente ligados à execução de medidas de controle promovidas pelo homem e são determinados pelas características química e física do inseticida, a frequência e o modo de aplicação deste, a área tratada e a concentração aplicada (GEORGHIOU; TAYLOR, 1986).

Segundo a OMS (1998), os insetos podem desenvolver resistência aos inseticidas por meio de quatro possíveis tipos de mecanismos. O aumento do metabolismo para produtos não tóxicos está relacionado ao processo de detoxificação da via metabólica do inseto. O aumento do nível de excreção dos inseticidas também está relacionado a este processo. Nestes dois mecanismos supracitados, há o envolvimento das enzimas esterases, monooxigenases, glutathione-S-transferase, através de superprodução e/ou alteração no centro catalítico da atividade enzimática. A diminuição da sensibilidade do sítio-alvo impede a ligação deste com a forma ativa do inseticida. Por último, a diminuição do nível de penetração do inseticida ocorre a partir da modificação da composição do exoesqueleto do inseto (MILLER, 1988; MELO-SANTOS et al., 2010).

Todos os mecanismos supracitados são inespecíficos e conferem resistência cruzada a outros inseticidas estruturalmente semelhantes. Apesar da existência de metodologias alternativas para o controle da transmissão de doenças como a dengue, o uso de produtos químicos ainda é a técnica mais empregada em programas de saúde pública. Portanto, a resistência aos inseticidas tem se tornado um grande obstáculo no controle da dengue (BRAGA; VALLE, 2007b).

Consequentemente, para combater os vetores da dengue em locais onde se tem registrado a presença de cepas resistentes, tem sido necessário aplicar com maior frequência dosagens crescentes de inseticidas. Com isso, os danos ambientais são maiores, levando a contaminação do ambiente sem a garantia de que os insetos vetores serão controlados (LUNA et al., 2005; BATISH et al., 2008; PERUMALSAMY et al., 2010).

O desenvolvimento de resistência dos insetos aos inseticidas convencionais fortalece a necessidade de pesquisar novas alternativas para o combate dos vetores da dengue. Dentre estas alternativas, inclui-se o uso de produtos naturais. Este é um campo de estudo que tem atraído bastante a atenção de pesquisadores em todo o mundo (GERIS et al., 2008; COELHO et al., 2009; CARVALHO et al., 2011; KOVENDAN et al., 2012; PROPHIRO et al., 2012; SOUZA et al., 2012).

A busca por novos compostos inseticidas com diferentes mecanismos de ação pode ser a solução para a ocorrência de resistência. Uma forma viável de alcançar este propósito é através do uso de extratos vegetais, visto que eles são constituídos por uma complexa mistura de substâncias. Além disso, as substâncias presentes nas espécies vegetais podem atuar sinergicamente, dificultando os mecanismos envolvidos no desenvolvimento da resistência. Outras vantagens observadas na utilização de inseticidas naturais são que estes são originários de recursos renováveis, são biodegradáveis e apresentam um baixo custo (SIMAS et al., 2004).

Outro motivo que reforça o interesse em buscar produtos a base de plantas é a relação entre as plantas e os insetos. Por milhares de anos, os vegetais e os insetos têm convivido e evoluído nos mesmos ambientes. Esta coevolução tem desenvolvido nas espécies vegetais alguns mecanismos químicos e físicos para a sua defesa contra os insetos (RYAN; BYRNE, 1988). Sendo assim, as espécies vegetais são fontes naturais de constituintes inseticidas (MELO, 2006).

Muitas das pesquisas desenvolvidas com o objetivo de investigar novos larvicidas para o controle de *A. aegypti* têm focado no estudo da bioatividade dos óleos essenciais, pois eles são misturas complexas de metabólitos secundários (VILA et al., 2010; MAGALHÃES et al., 2010; PARK et al., 2011; GOVINDARAJAN et al., 2012). Os óleos essenciais são compostos por substâncias voláteis, odoríferas, lipofílicas, líquidas a temperatura ambiente e, em geral, menos densas que a água. Devido a estas propriedades, eles são chamados também de óleos etéreos, óleos voláteis ou essências. Apesar de serem lipofílicos, não devem ser confundidos com os óleos fixos, visto que estes dois produtos naturais apresentam propriedades químicas e físicas muito diferentes (BASER, 1995; KAR, 2007).

2.2 Considerações gerais sobre os óleos essenciais

Dentre as Angiospermas, os óleos essenciais podem estar presentes em espécies vegetais pertencentes a famílias botânicas conhecidamente aromáticas como: Anacardiaceae, Apiaceae, Asteraceae, Chenopodiaceae, Cupressaceae, Lamiaceae, Myrtaceae, Pinaceae, Piperaceae, Poaceae, Rutaceae, Verbenaceae e Zingiberaceae (SILVA, 2006). Pode-se obter óleo essencial a partir de todos os órgãos das plantas; uma mesma espécie pode produzir óleo em mais de um órgão. Entretanto, estes óleos, em geral, apresentam composições químicas

distintas. Algumas espécies concentram seus óleos essenciais em órgãos específicos, como as folhas, flores, caule e rizoma. Esta especificidade é uma característica que pode ser analisada de acordo com a família a qual a espécie pertence (LAWRENCE, 1995; MCTAGGART, 2003).

Outra característica que pode ser relacionada à família e ao gênero da espécie vegetal é o tipo de estrutura especializada que secreta e armazena o óleo essencial nos tecidos ou na superfície da planta. Estas estruturas podem ser células parenquimáticas ou epidérmicas diferenciadas, tricomas glandulares e bolsas lisígenas ou esquizolisígenas (ROBBERS et al., 1997; SVOBODA et al., 2000; HANDA, 2008).

Existem várias formas de se extrair os óleos essenciais das espécies vegetais. Os principais métodos usam como princípio a destilação, que implica na vaporização do óleo, com a presença de umidade (TANDON, 2008). A hidrodestilação é o método mais empregado em laboratórios de pesquisa, apesar de poder provocar alterações nos constituintes dos óleos quando se utiliza um tempo de extração excessivo, pelo fato do material vegetal permanecer, diretamente, em contato com a água em ebulição e com a fonte de calor. A destilação por arraste de vapor d'água é outra metodologia empregada para a extração da maioria dos óleos essenciais em larga escala. Nesta técnica, o vapor é gerado em um recipiente separado da matéria vegetal, evitando alterações por degradação térmica (HUNTER, 2009).

A prensagem ou expressão é um método mais utilizado para extrair óleo essencial de frutos cítricos. A enfloração é a extração com gordura à temperatura ambiente e é comumente utilizado quando a matéria-prima são pétalas de flores. A extração com solventes orgânicos é a técnica que resulta um extrato com aroma mais parecido ao material vegetal *in natura*, embora haja a solubilização de muitos outros constituintes diferentes. Uma alternativa ao uso de solventes é a extração com dióxido de carbono (CO₂) supercrítico. Como o CO₂ é um material inerte, nesta extração não há a presença de traços de solvente. A escolha do método de extração do óleo essencial influencia na sua composição química e no seu rendimento (BERTUCCO; FRANCESCHIN, 2008; BASER; BUCHBAUER, 2010).

Os óleos essenciais podem conter de 20 a 60 componentes químicos. Dentre estes componentes, dois ou três, geralmente, estão em maior concentração. Os constituintes principais identificados nos óleos essenciais são monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanoides. Estes são produzidos a partir de três rotas biossintéticas do metabolismo das espécies vegetais. A produção dos sesquiterpenos, normalmente, é realizada pela rota do

acetato/mevalonato. A síntese dos monoterpenos ocorre, preferencialmente, pela via do metil-eritritol fosfato (MEP), também denominada xilulose-5-fosfato. A existência desta segunda rota foi confirmada e caracterizada recentemente. Ambas as rotas produzem os precursores dos terpenos, o pirofosfato de isopentanila (IPP) e o seu isômero pirofosfato de dimetilanila (DMAPP) (CARSON; HAMMER, 2011). Já a rota do ácido chiquímico é responsável pela produção dos fenilpropanoides, que são compostos por um esqueleto básico de um anel aromático com uma cadeia lateral de três carbonos (SIMÕES et al., 2005).

Os óleos podem apresentar outros constituintes como os diterpenos, hidrocarbonetos alifáticos (lineares, ramificados, saturados e insaturados), ácidos, aldeídos, ésteres acíclicos ou lactonas (YUNES; CECHINEL-FILHO, 2007).

2.3 Espécies vegetais na atenção a saúde

As espécies vegetais não são somente fontes de constituintes inseticidas; o uso das plantas para o tratamento de sintomas e doenças é algo tão antigo quanto o surgimento das civilizações. Diversos constituintes obtidos a partir de extratos vegetais são considerados bioativos, podendo ser utilizados em sua forma natural ou como protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos (AZMIR et al., 2013).

Os primeiros registros do uso de plantas medicinais foram escritos a cerca de 5000 anos na Mesopotâmia. A civilização dos Semérios, desenvolvida nessa região, desenvolveram consideravelmente a medicina, devido ao rápido aumento da população humana e a propagação de doenças (BORCHARDT, 2002). Uma importante contribuição para o uso racional de medicamentos a base de plantas surgiu a partir de gregos e romanos. Dioscórides (90 d.C.), médico grego considerado o fundador da farmacognosia, em sua obra “*De materia medica*”, registrou a coleta, de armazenamento e o uso de cerca de 600 ervas medicinais. Galeno (130 d.C.), médico e filósofo, influenciou bastante a medicina ocidental, através de suas complexas prescrições para a composição de drogas farmacêuticas (NEWMAN et al., 2008).

No decorrer da história, as espécies vegetais continuaram a ser utilizadas para a cura e a prevenção de doenças e a melhoria na saúde nas diversas comunidades. Este uso levou à descoberta de novos constituintes biologicamente ativos e à derivação direta e indireta de novas moléculas bioativas. Um grande marco na história da indústria farmacêutica ocorreu a

partir da conjugação química do ácido salicílico, obtido da casca de *Salix alba* L., com acetato para a obtenção do ácido acetilsalicílico, composto menos tóxico, com ação analgésica e antipirética (RASKIN et al., 2002; MUELLER, 2004; MAHDI, 2010).

Em 1785, o médico inglês Withering publicou dados sobre o uso de *Digitalis purpurea* L. para o tratamento de desordens cardíacas; estes dados levaram ao isolamento da digoxina, agente cardiotônico. A partir de *Papaver somniferum* L., foi isolado, em 1816, o fármaco analgésico morfina; a estrutura química deste composto levou ao desenvolvimento de vários outros analgésicos altamente eficientes. O uso empírico da casca de *Cinchona* spp. pelos indígenas da região amazônica para o tratamento de febres levou ao isolamento, em 1820, do alcaloide antimalárico quinina; a quinina foi a base para a produção sintética de cloroquina e a primacrina, drogas também eficientes contra malária (CRAGG; NEWMAN, 2002).

Assim é possível observar que um número significativo de fármacos foi originalmente obtido a partir de espécies vegetais. Estima-se que cerca de 25% dos medicamentos prescritos no mundo são provenientes de espécies vegetais. Das drogas consideradas básicas e essenciais pela OMS, 11% foram originadas de espécies vegetais. Além desses dados, estima-se que 60% dos fármacos antitumorais e antimicrobianos, disponíveis no comércio, são de origens naturais (RATES, 2001).

A OMS reconheceu, oficialmente, o uso dos fitoterápicos para fins profiláticos, curativos, paliativos e de diagnóstico, em 1978, ao recomendar a difusão dos conhecimentos tradicionais relacionados ao uso de plantas medicinais. A valorização deste tipo de terapia surge da ciência de que 80% da população, principalmente dos países em desenvolvimento, dependem, para a manutenção da atenção primária à saúde, de práticas tradicionais como a utilização de preparações a base de vegetais (BRASIL, 2006).

No Brasil, várias políticas foram implantadas visando desenvolver a terapêutica a partir das plantas medicinais. Dentre elas, a mais recente, a Política Nacional de Plantas Medicinais foi instituída pelo Decreto 5.813, de 22 de junho de 2006. Esta política busca preservar o conhecimento tradicional e reconhecer as práticas populares do uso de plantas medicinais, de forma a garantir o acesso seguro e o seu uso racional. O programa relacionado a esta política insere as práticas integrativas e complementares ao Sistema Único de Saúde (SUS), como forma de ampliar as opções terapêuticas aos usuários do SUS, com segurança, eficácia e qualidade (BRASIL, 2008, 2011d).

A demanda comercial por plantas medicinais e pelos fitoterápicos tem aumentado consideravelmente nas últimas décadas, em todo o mundo. Esse crescimento está relacionado a fatores econômicos e o interesse pelo uso de alternativas consideradas mais saudáveis que os medicamentos sintéticos. Freitas (2007) calculou o faturamento do segmento brasileiro de produção de agentes fitoterapêuticos, entre 2003 e 2006; indicando uma quantia de cerca de R\$ 1,840 bilhões, com a venda de 122,7 milhões de unidade farmacêuticas. Segundo Moraes (2010), o segmento de fitoterápicos brasileiro cresce 8-10% ao ano e corresponde a R\$ 500 milhões dos R\$ 9 bilhões de venda de todos os tipos de medicamentos no país.

2.4 Parque Nacional da Chapada das Mesas: Cerrado e Amazônia Legal

O Maranhão é um estado localizado no nordeste brasileiro e compreende a uma área total de aproximadamente 331 mil km². Por ser uma região de transição entre biomas (Amazônia, Cerrado e Caatinga), apresenta uma rica biodiversidade, com vegetações diversas (IBGE, 2010).

No Centro-Sul do estado do Maranhão, está localizado o Parque Nacional da Chapada das Mesas, criado em 2005, com o objetivo de proteger uma área composta pela flora do Cerrado e da Amazônia. A abrangência dessa Unidade de Conservação se estende pelos municípios de Carolina, Riachão e Estreito (BRASIL, 2005b).

O Cerrado localizado na região da Chapada das Mesas é composto por um mosaico de formações vegetais. A vegetação se apresenta basicamente com duas fisionomias distintas: áreas cobertas com vegetação rasteira e arbustos escassos (formações savânicas) e áreas cobertas com florestas de árvores relativamente altas formando um grande dossel (formações florestais) (MORAES; LIMA, 2007).

A flora do Cerrado apresenta características que enquadra esse bioma em três tipos de formações vegetais. As formações florestais são observadas na mata ciliar, na mata de galeria, na mata seca e no cerradão. As formações savânicas são características do cerrado *sensu stricto*, do parque de cerrado, do palmeiral e da vereda. Já as formações campestres são compostas pelo campo sujo, campo rupestre e campo limpo (RIBEIRO; WALTER, 1998). Além disso, o Cerrado se constitui como uma área rica em água, pois nele estão presentes as três maiores bacias hidrográficas da América do Sul: Tocantins - Araguaia, São Francisco e Prata (OLIVEIRA et al., 2005; MASCARENHAS et al., 2009).

Cerca de metade da extensão do Cerrado foi transformada em pastagens plantadas e culturas anuais. As transformações ocorridas nesta área trouxeram grandes danos ambientais, tais como: fragmentação de habitats, extinção da biodiversidade, invasão de espécies exóticas, erosão dos solos, poluição de aquíferos, degradação de ecossistemas, alterações nos regimes de queimadas, desequilíbrios no ciclo do carbono e possivelmente modificações climáticas regionais (KLINK; MACHADO, 2005). Este bioma tornou-se um “hotspot” para conservação da biodiversidade mundial, pois apresenta altas taxas de desmatamento e há a constatação de que algumas espécies de animais e vegetais estão ameaçadas de extinção (OLIVEIRA, D. et al., 2008).

A identificação dos “hotspots” mundiais é uma abordagem que auxilia no planejamento da conservação. Este planejamento possibilita que se concentrem os esforços onde há maior necessidade. As áreas com altas concentrações de espécies endêmicas e com perdas excepcionais de habitat, como o Cerrado e Amazônia, são consideradas as de maior prioridade (MYERS et al., 2000).

A Amazônia Legal brasileira corresponde a uma área de cerca de 5 milhões de Km², que se estendem pelos estados do Acre, Amapá, Amazonas, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima, Tocantins e região ocidental do Maranhão. Cerca de 17% da cobertura total de vegetação original deste bioma sofreu efeitos do desmatamento. A região com maiores taxas de desflorestamento compreende ao leste do Acre, Rondônia, norte do Mato Grosso, leste do Pará e Maranhão; esta região é denominada de “Arco do desflorestamento” (ALMEIDA et al., 2010; XAUD et al., 2013).

O desmatamento na Amazônia brasileira é devido, principalmente, ao avanço da agropecuária e ao extrativismo madeireiro. Estas atividades são realizadas, em grande parte, ilegalmente e não levam ao crescimento econômico da região; altos índices de desmatamento estão associados a altos níveis de desigualdade social. Os recursos naturais da Amazônia são utilizados de uma forma abusiva; além dessa exploração causar sérios danos ao meio ambiente, ainda contribui para baixas taxas de renda per capita (KOHLHEPP, 2002; SILVA et al., 2011).

Apesar de existir um número significativo de grupos de pesquisa na Amazônia, investigando agentes fitoterapêuticos, fitocosméticos e plantas medicinais, Frickmann e Vasconcellos (2011) relataram que estas pesquisas não têm sido eficientes na geração de inovação na região. Este resultado confirma que a rica biodiversidade amazônica não tem sido

utilizada adequadamente; os estudos relacionados à flora regional não tem cooperado plenamente para o desenvolvimento sustentável da Amazônia brasileira.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

Realizar um estudo de revisão das pesquisas envolvendo óleos essenciais e seus constituintes com atividade larvica contra *Aedes aegypti* e uma bioprospecção da atividade larvica de óleos essenciais de seis espécies vegetais da Amazônia Legal maranhense.

3.2 Objetivos específicos

- Realizar uma revisão referente à atividade larvica contra *Aedes aegypti* de óleos essenciais e de seus constituintes;
- Evidenciar espécies vegetais aromáticas com potencial larvica;
- Demonstrar os fatores que influenciam na atividade larvica de óleos essenciais;
- Evidenciar as estruturas químicas dos constituintes relacionadas à atividade larvica;
- Analisar os possíveis mecanismos de ação larvica de constituintes dos óleos essenciais;
- Determinar a composição química dos óleos essenciais extraídos de espécies vegetais da Amazônia Legal maranhense;
- Quantificar os constituintes detectados nas espécies em estudo;
- Definir os marcadores químicos das amostras testadas;
- Determinar os rendimentos dos óleos essenciais extraídos;
- Avaliar a atividade larvica dos óleos essenciais extraídos contra *A. aegypti*.

REFERÊNCIAS

- ACIOLE, S. D. G. **Avaliação da atividade inseticida dos óleos essenciais das plantas amazônicas Annonaceae, Boraginaceae e de mata atlântica Myrtaceae como alternativa de controle às larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae)**. 86 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Ambiente) Universidade de Lisboa, Lisboa, 2009.
- ALMEIDA, C. A.; VALERIANO, D. M.; ESCADA, M. I. S.; RENNO, C. D. Estimativa de área de vegetação secundária na Amazônia Legal Brasileira. **Acta Amazonica**, v. 40, n. 2, p. 289-302, 2010.
- ALMEIDA, R. R. P.; SOUTO, R. N. P.; BASTOS, C. N.; SILVA, M. H. L.; MAIA, J. G. S. Chemical variation in *Piper aduncum* and biological properties of its dillapiol-rich essential oil. **Chemistry & Biodiversity**, v. 6, n. 9, p. 1427-1434, 2009. doi:10.1002/cbdv.200800212
- AZMIR J.; ZAIDUL, I. S. M.; RAHMAN, M. M.; SHARIF, K. M.; MOHAMED, A.; SAHENA, F.; JAHURUL, M. H. A.; GHAFOR, K.; NORULAINI, N. A. N.; OMAR, A. K. M. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. **Journal of Food Engineering**, v. 117, n. 4, p. 426-436, 2013.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK D, IDAOMAR M. Biological effects of essential oils – a review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446-475, 2008.
- BARRETO, M. L.; TEIXEIRA, M. G. Dengue no Brasil: situação epidemiológica e contribuições para uma agenda de pesquisa. **Estudos avançados**, v. 22, n. 64, p. 53-72, 2008.
- BASER, K. H. C. Analysis and quality assessment of essential oils. In: SILVA, K. T. (Org.) **A manual on the essential oil industry**. Austria: United Nations Industrial Development Organization Vienna, 1995. pp. 155-178.
- BASER, K. H. C.; BUCHBAUER, G. **Handbook of essential oils: science, technology, and applications**. Boca Raton: CRC Press, 2010. 980 p.
- BATISH, D. R.; SINGH, H. P.; KOHLI, R. K.; KAUR, S. *Eucalyptus* essential oil as a natural pesticide. **Forest Ecology Management**, v. 256, p. 2166-2174, 2008. doi:10.1016/j.foreco.2008.08.008

BERTUCCO, A.; FRANCESCHIN, G. Supercritical fluid extraction of medicinal and aromatic plants: fundamentals and applications. In: HANDA, S. S.; KHANUJA, S. P. S.; LONGO, G.; RAKESH, D. D (Org.) **Extraction technologies for medicinal and aromatic plants**. Trieste: ICS Unido, 2008. pp. 169-180.

BIESKI, I. G. C. **Plantas medicinais e aromáticas no sistema único de saúde da região sul de Cuiabá-MT**. 92 f. Monografia (Pós-Graduação *Lato Sensu* em Plantas Medicinais: manejo, uso e manipulação) Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

BORCHARDT J. K. The beginnings of drug therapy: ancient mesopotamian medicine. **Drug News Perspect**, v. 15, n. 3, p. 187-192, 2002.

BRADBURY, J. Beyond the fire-hazard mentality of medicine: the ecology of infectious diseases. **PloS Biology**, v. 1, n. 2, p. 148-151, 2011. doi: 10.1321/journal.pbio.0000022

BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: histórico do controle no Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 16, n. 2, p. 113-118, 2007a.

_____. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 16, n. 4, p. 279-293, 2007b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Programa Nacional de Controle da Dengue**. Brasília: Ministério da Saúde, 2002.

_____. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **100 anos de Saúde Pública: a visão da Funasa**. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 2004. 232 p.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Diretoria Técnica de Gestão. **Dengue: diagnóstico e manejo clínico**. 2 ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2005a. 24p.

_____. Decreto s/nº de 12 de dezembro de 2005. **Cria o Parque Nacional da Chapada das Mesas**, nos Municípios de Carolina, Riachão e Estreito, no Estado do Maranhão, e dá outras providências. Legislação Federal. DOU DE 13/12/2005 P2, 2005b.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. A Fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisas de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos. 1ª ed. Série B. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 148 p.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Secretaria de Biodiversidade e Florestas. **Áreas Prioritárias para Conservação, Uso Sustentável e Repartição de Benefícios da Biodiversidade Brasileira:** Atualização - Portaria MMA nº9, de 23 de janeiro de 2007. Brasília: MMA, 2007.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. **Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos.** Brasília: Ministério da Saúde, 2008. 78 p.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Sistema nacional de vigilância em saúde:** relatório de situação: Maranhão. 4. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2009a. 64 p.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Diretrizes nacionais para a prevenção e controle de epidemias de dengue.** 1 ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2009b. 160 p.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **O agente comunitário de saúde no controle da dengue.** 1. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2009c. 37 p.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de vigilância epidemiológica.** 7 ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2010a.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Doenças infecciosas e parasitárias:** guia de bolso. 8 ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2010b.

_____. Ministério do Meio Ambiente. **Monitoramento do desmatamento nos biomas brasileiros por satélite.** Acordo de cooperação técnica MMA/IBAMA. Monitoramento do bioma cerrado 2008-2009. Brasília: MMA, 2011a.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Sistema nacional de vigilância em saúde:** relatório de situação: Maranhão. 5. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2011b. 35 p.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Balanço dengue:** situação epidemiológica e atividades desenvolvidas. Brasília: Ministério da Saúde, 2011c. 17 p.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira** / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2011d. 126 p.

_____. Ministério do Meio Ambiente. **Geografia**. Biomas brasileiros, 2012. Disponível em: <http://www.brasil.gov.br/sobre/meio-ambiente/geografia>. Acesso em 17 de novembro de 2012.

CARSON, C. F.; HAMMER, K. A. Chemistry and bioactivity of essential oils. In: THORMAR, H. (Org.) **Lipids and essential oils as antimicrobial agents**. New Delhi: Wiley, 2011. pp. 203-238.

CARVALHO, G. H. F.; SILVA, H. H. G.; CUNHA, L. C.; SILVA, I. G. Atividade inseticida do extrato bruto etanólico de *Persea americana* (Lauraceae) sobre larvas e pupas de *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). **Revista de Patologia Tropical**, v. 40, n. 4, p. 348-361, 2011.

CHUNG, I. M.; SEO, S. H.; KANG, E. Y.; PARK, S. D.; PARK, W. H.; MOON, H. I. Chemical composition and larvicidal effects of essential oil of *Dendropanax morbifera* against *Aedes aegypti* L. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 37, n. 4, p. 470-473, 2009. doi:10.1016/j.bse.2009.06.004

COELHO, J. S.; SANTOS, N. D. L.; NAPOLEÃO, T. H.; GOMES, F. S.; FERREIRA, R. S.; ZINGALI, R. B.; COELHO, L. C. B. B.; LEITE, S. P.; NAVARRO, D. M. A. F.; PAIVA, P. M. G. Effect of *Moringa oleifera* lectin on development and mortality of *Aedes aegypti* larvae. **Chemosphere**, v. 77, p. 934-938, 2009. doi:10.1016/j.chemosphere.2009.08.022

CONSOLI, R. A. G. B.; OLIVEIRA, R. L. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1994. 228 p.

COSTA, J. G. M.; PESSOA, O. D. L.; MENEZES, E. A.; SANTIAGO, G. M. P.; LEMOS, T. L. G. Composition and larvicidal activity of essential oils from heartwood of *Auxemma glazioviana* Taub. (Boraginaceae). **Flavour Fragrance Journal**, v. 19, n. 6, p. 529-531, 2004. doi:10.1002/ffj.1332

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Drugs from nature: past achievements, future prospects. In: IWU, M.; WOOTTON, J. (Org.) **Ethnomedicine and drug discovery**. Amsterdam: Elsevier Science, 2002. pp. 23-37.

CUNHA, A. P.; SILVA, A. P.; ROQUE, O. R.; CUNHA, E. **Plantas e produtos vegetais em cosmética e dermatologia**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2004. 310 p.

DÁNTES, H. G. El dengue en las Américas. Um problema de salud regional. **Salud Pública de México**, v. 33, n. 4, p. 347-355, 1991.

DHARMAGADDA, V. S. S.; NAIK, S. N.; MITTAL, P. K.; VASUDEVAN, P. Larvicidal activity of *Tagetes patula* essential oil against three mosquito species. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 11, p. 1235-1240, 2005. doi:10.1016/j.biortech.2004.10.020

DONALÍSIO, M. R.; GLASSER, C. M. Vigilância entomológica e controle de vetores do dengue. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 5, n. 3, p. 259-272, 2002.

EIRAS, A. E. Culicidae. In: NEVES, D. P. (Org.) **Parasitologia Humana**. 11 ed. São Paulo: Atheneu, 2005. pp. 355-367.

ELDRIDGE, B. F. Mosquitoes, the Culicidae. In: MARQUARDT, W. C. (Org.) **Biology of disease vectors**. 2 ed. Amsterdam: Elsevier, 2005. pp. 95-111.

ERLANGER, T. E.; KEISER, J.; UTZINGER, J. Effect of dengue vector control interventions on entomological parameters in developing countries: a systematic review and meta-analysis. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 22, p. 203-221, 2008. doi:10.1111/j.1365-2915.2008.00740.x

FERNÁNDEZ, M. C. M.; TRUJILLO, M. C.; SILVA, M. L.; LAZCANO, J. B. Factores relacionados con la presencia de *Aedes aegypti* (Diptera:Culicidae) en dos regiones de Cuba. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, v. 62, n. 2, p. 112-118, 2010.

FORATTINI, O. P.; BRITO, M. Reservatórios domiciliares de água e controle do *Aedes aegypti*. **Revista de Saúde Pública**, v. 37, n. 5, p. 676-677, 2003.

FREITAS, A. **Estrutura de mercado do segmento de fitoterápicos no contexto atual da indústria farmacêutica brasileira**. Brasília: Ministério da Saúde, 2007.

FREITAS, F. P.; FREITAS, S. P.; LEMOS, G. C. S.; VIEIRA, I. J. C.; GRAVINA, G. A.; LEMOS, F. J. A. Comparative larvicidal activity of essential oils from three medicinal plants against *Aedes aegypti* L. **Chemistry & Biodiversity**, v. 7, n. 11, p. 2801-2807, 2010. doi:10.1002/cbdv.200900260

FREITAS, R. M.; AGUIAR, R.; BRUNO, R. V.; GUIMARÃES, M. C.; OLIVEIRA, R. L.; SORGINE, M. H. F.; STRUCHINER, C. J.; VALLE, D.; O'NEILL, S. L.; MOREIRA, L. A.

Why do we need alternative tools to control mosquito-borne diseases in Latin America? **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 6, p. 828-829, 2012.

FRICKMANN, F. S. S.; VASCONCELLOS, A. G. Research and patent of phytotherapeutic and phytocosmetic products in the Brazilian Amazon. **Journal of Technology Management & Innovation**, v. 6, n. 4, p. 136-150, 2011.

GALLER, R.; BONALDO, M. C.; ALVES, A. M. B. Dengue vaccines: closer but not there yet. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 8, p. 905-906, 2011.

GARCÍA-REJÓN, J. E.; LÓPEZ-URIBE, M. P.; LOROÑO-PINO, M. A.; FARFÁN-ALE, J. A.; NAJERA-VAZQUEZ, M. R.; LOZANO-FUENTES, S.; BEATY, B. J.; EISEN, L. Productive container types for *Aedes aegypti* immatures in Mérida, México. **Journal of Medical Entomology**, v. 48, n. 3, p. 644-650, 2011. doi:10.1603/ME10253

GEORGHIOU, G. P.; TAYLOR, C. E. **Pesticide resistance**: strategies and tactics for management. Washington: National Research Council. National Academy Press, 1986. pp. 157-169.

GERIS, R.; RODRIGUES-FO, E.; SILVA, H. H. G.; SILVA, I. G. Larvicidal effects of fungal meroterpenoids in the control of *Aedes aegypti* L., the main vector of dengue and yellow fever. **Chemistry & Biodiversity**, v. 5, p. 341-345, 2008. doi:10.1002/cbdv.200890032

GONÇALVES-NETO, V. S.; REBÊLO, J. M. M. Epidemiological characteristics of dengue in the Municipality of São Luís, Maranhão, Brazil, 1997-2002. **Caderno de Saúde Pública**, v. 20, n. 5, p. 1424-1431, 2004.

GOVINDARAJAN, M.; SIVAKUMAR, R.; RAJESWARI, M.; YOGALAKSHMI, K. Chemical composition and larvicidal activity of essential oil from *Mentha spicata* (Linn.) against three mosquito species. **Parasitology Research**, v. 110, n. 5, p. 2023-2032, 2012. doi:10.1007/s00436-011-2731-7

GRODNITZKY, J.; COATS, J. R. QSAR evaluation of monoterpenoids insecticidal activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 4576-80, 2002.

GUBLER, D. J.; CLARK, G. G. Dengue/Dengue Hemorrhagic Fever: The Emergence of a Global Health Problem. **Emerging Infectious Diseases**, v. 1, n. 2, p. 55-57, 1995.

GUBLER, D. J.; CLARK, G. G. Dengue and dengue hemorrhagic fever. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 3, p. 480-496, 1998.

GUBLER D. J. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. **Trends in Microbiology**, v. 10, n. 2, p. 100-103, 2002.

_____. The emergence of epidemic dengue fever and dengue hemorrhagic fever in the Americas: a case of failed public health policy. **Pan American Journal of Public Health**, v. 17, n. 4, p. 221-224, 2005.

_____. Dengue/dengue hemorrhagic fever: history and current status. **Novartis Foundation symposium**, v. 277, p. 3-16, 2006.

_____. Dengue, urbanization and globalization: the unholy trinity of the 21st Century. **Tropical Medicine and Health**, v. 39, n. 4, p. 3-11, 2011. doi:10.2149/tmh.2011-S05.

HADACEK, F. Secondary Metabolites as Plant Traits: Current Assessment and Future Perspectives. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 21, n. 4, p. 273-322, 2002.

HANDA, S. S. An overview of extraction techniques for medicinal and aromatic plants. In: HANDA, S. S.; KHANUJA, S. P. S.; LONGO, G.; RAKESH, D. D. (Org.) **Extraction technologies for medicinal and aromatic plants**. Trieste: ICS Unido, 2008. pp. 21-54.

HARE, J. D. Ecological role of volatiles produced by plants in response to damage by herbivorous insects. **The Annual Review of Entomology**, v. 56, p. 161-80, 2011.

HUNTER, M. **Essential oils: art, agriculture, science, industry and entrepreneurship**. New York: Nova Science Publishers, 2009. 780 p.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Maranhão**, 2010. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/estadosat/perfil.php?sigla=ma>. Acesso em: 27 dezembro de 2011.

ISMAN, M. B. Tropical forests as sources of natural insecticides. In: ROMEO, J. T. (Org.) **Recent advances in phytochemistry: chemical ecology and phytochemistry of forest ecosystems**. V 39. Tampa: Elsevier, 2005. pp. 145-161.

ISTURIZ, R. E.; GUBLER, D. J.; CASTILLO, J. B. Dengue and dengue haemorrhagic fever in Latin America and the Caribbean. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 14, p. 121-140, 2000.

JOPPA, L. N.; ROBERTS, D. L.; PIMM, S. L. How many species of flowering plants are there? **Proceedings of the Royal Society**, v. 278, p. 554-559, 2011. doi:10.1098/rspb.2010.1004

KAR, A. **Pharmacognosy and Pharmacobiotechnology**. 2 ed. New Delhy: New Age International Publishers, 2007. 879 p.

KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. A. Conservação do Cerrado brasileiro. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 147-155, 2005.

KLOWDEN, M. J. Making generalizations about vectors: Is there a physiology of “the mosquito”? **Entomological Research**, v. 37, p. 1-13, 2007. doi:10.1111/j.1748-5967.2007.00044.x

KOHLHEPP, G. Conflitos de interesse no ordenamento territorial da Amazônia brasileira. **Estudos Avançados**, v. 16, n. 45, p. 37-61, 2002.

KONISHI, E. Issues related to recent dengue vaccine development. **Tropical Medicine and Health**, v. 39, n. 4, p. 63-71, 2011. doi:10.2149/tmh.2011-S01

KOVENDAN, K.; MURUGAN, K.; KUMAR, A. N.; VINCENT, S.; HWANG, J. S. Bioefficacy of larvicidal and pupicidal properties of *Carica papaya* (Caricaceae) leaf extract and bacterial insecticide, spinosad, against chikungunya vector, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Parasitology Research**, v. 110, p. 669-678, 2012. doi:10.1007/s00436-011-2540-z

LAWRENCE, B. M. The isolation of aromatic materials from natural plant products. In: SILVA, K. T. (Org.) **A manual on the essential oil industry**. Austria: United Nations Industrial Development Organization Vienna, 1995. pp. 57-154.

LEE, H. S. Mosquito larvicidal activity of aromatic medicinal plant oils against *Aedes aegypti* and *Culex pipiens pallens*. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 22, n. 2, p. 292-295, 2006. doi:10.2987/8756-971X(2006)22[292:MLAOAM]2.0.CO;2

LINES, J. D. Do agricultural insecticides select for insecticide resistance in mosquitoes? A look at the evidence. **Parasitology Today**, v. 4, n. 7, p. S17-S20, 1988.

LÓPEZ-VÉLEZ, R.; MORENO, R. M. Cambio climático en España y riesgo de enfermedades infecciosas y parasitarias transmitidas por artrópodos y roedores. **Revista Española de Salud Pública**, v. 79, p. 177-190, 2005.

LUNA, J. S.; SANTOS, A. F.; LIMA, M. R. F.; OMENA, M. C.; MENDONÇA, F. A. C.; BIEBER, L. W.; SANT'ANA, A. E. G. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, p. 199-206, 2005. doi:10.1016/j.jep.2004.10.004

MACORIS, M. L. G. **Mecanismos de resistência de *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) a inseticidas**. 82 f. Tese (Doutorado em Biologia Geral e Aplicada) Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2011.

MAGALHÃES, L. A. M.; LIMA, M. P.; MARQUES, M. O. M.; FACANALI, R.; PINTO, A. C. S.; TADEI, W. P. Chemical composition and larvicidal activity against *Aedes aegypti* larvae of essential oils from four *Guarea* species. **Molecules**, v. 15, n. 8, p. 5734-5741, 2010. doi:10.3390/molecules15085734

MAHDI, J. G. Medicinal potential of willow: A chemical perspective of aspirin discovery. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 14, p. 317-322, 2010.

MARTÍN, J. L. S.; BRATHWAITE, O.; ZAMBRANO, B.; SOLÓRZANO, J. O.; BOUCKENNOOGHE, A.; DAYAN, G. H.; GUZMÁN, M. G. The epidemiology of dengue in the Americas over the last three decades: A worrisome reality. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 82, n. 1, p. 128-135, 2010. doi:10.4269/ajtmh.2010.09-0346

MARTINS, F.; SILVA, I. G. Avaliação da atividade inibidora do diflubenzuron na ecdise das larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, n. 2, p. 135-138, 2004.

MASCARENHAS, L. M. A.; FERREIRA, M. E.; FERREIRA, L. G. Sensoriamento remoto como instrumento de controle e proteção ambiental: análise da cobertura vegetal remanescente na Bacia do Rio Araguaia. **Sociedade & Natureza**, v. 21, n. 1, p. 5-18, 2009.

MAY, R. M. Why worry about how many species and their loss? **PLoS Biology**, v. 9, n. 8, p. e1001130, 2011. doi:10.1371/journal.pbio.1001130

MCTAGGART. Basic Plant Taxonomy, Chemistry, Extraction, Biosynthesis, and Analysis. In: BUCKLE, J. (Org.) **Clinical aromatherapy**: Essential oils in practice. 2 ed. Philadelphia: Elsevier, 2003. pp. 38-75.

MELO, A. C. R. Estudo das folhas de sacaca (*Croton cajucara* Benth.) como bioinseticida contra as larvas de *Aedes aegypti*. In: I Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte Nordeste de Educação Tecnológica. **Anais...**, Natal, 2006. pp. 1-7.

MELO-SANTOS, M. A. V.; VARJAL-MELO, J. J. M.; ARAÚJO, A. P.; GOMES, T. C. S.; PAIVA, M. H. S.; REGIS, L. N.; FURTADO, A. F.; MAGALHAES, T.; MACORIS, M. L. G.; ANDRIGHETTI, M. T. M.; AYRES, C. F. J. Resistance to the organophosphate temephos: Mechanisms, evolution and reversion in an *Aedes aegypti* laboratory strain from Brazil. **Acta Tropica**, v. 113, p. 180-189, 2010.

MENDONÇA, F. A.; SOUZA, A. V.; DUTRA, D. A. Saúde pública, urbanização e dengue no Brasil. **Sociedade & Natureza**, v. 21, n. 3, p. 257-269, 2009.

MILLER, T. A. Mechanisms of resistance to pyrethroid insecticide. **Parasitology Today**, v. 4, n. 7, p. 8-12, 1988.

MOORE, C. G.; FREIER, J. E. Invasive species and emerging vector-borne infections. In: MARQUARDT, W. C. (Org.) **Biology of disease vectors**. 2 ed. Amsterdam: Elsevier, 2005. pp. 219-224.

MORA, C.; TITTENSOR, D. P.; ADL, S.; SIMPSON, A. G. B.; WORM, B. How Many Species Are There on Earth and in the Ocean? **Plos Biology**, v. 9, n. 8, p. e1001127, 2011. doi:10.1371/journal.pbio.1001127

MORAES, M. O. Semiárido: um possível celeiro de matéria-prima para medicamentos fitoterápicos. **Jornal da Ciência e-mail**. 3983 ed. Rio de Janeiro: SBPC, 2010.

MORAES, R. C.; LIMA, L. P. Utilização de SIG como ferramenta na gestão do Parque Nacional Chapada das Mesas (Carolina/MA). In: XIII Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto. **Anais...**, Florianópolis: INPE, 2007. pp. 4057-4064.

MOREIRA, L. A.; ITURBE-ORMAETXE, I.; JEFFERY, J. A.; LU, G.; PYKE, A. T.; HEDGES, L. M.; ROCHA, B. C.; HALL-MENDELIN, S.; DAY, A.; RIEGLER, M.; HUGO, L. E.; JOHNSON, K. N.; KAY, B. H.; MCGRAW, E. A.; VAN DEN HURK, A. F.; RYAN, P. A.; O'NEILL, S. L. A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, chikungunya and Plasmodium. **Cell**, v. 139, p. 1268-1278, 2009.

MORRISON, A. C.; ZIELINSKI-GUTIERREZ, E.; SCOTT, T. W.; ROSENBERG, R. Defining challenges and proposing solutions for control of the virus vector *Aedes aegypti*. **PLoS Medicine**, v. 5, n. 3, p. 362-366, 2008.

MOSIHUZZAMAN, M.; SYDNES L. K. Herbal products in healthcare: challenges and potential. In: GUPTA, V. K. (Org.) **Comprehensive bioactive natural products**. V 1. Houston: Studium Press, 2010. pp. 279-306.

MUELLER, R. L. First-generation agents: aspirin, heparin and coumarins. **Best Practice & Research Clinical Haematology**, v. 17, n. 1, p. 23-53, 2004.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; FONSECA, G. A. B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, p. 853-858, 2000.

NASCIMENTO-JR, J. A.; BERNARDES, R. S. Estudo epidemiológico da relação entre limpeza pública e a ocorrência do *Aedes aegypti*. In: 20º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental. **Anais...** Rio de Janeiro, 1999. pp. 3948-3956. Disponível em: <http://www.bvsde.paho.org/bvsaidis/brasil20/vii-007.pdf>. Acesso em: 14 de janeiro de 2012.

NAYAR, J. K.; ALI, A. A review of monomolecular surface films as larvicides and pupicides of mosquitoes. **Journal of Vector Ecology**, v. 28, n. 2, p. 190-199, 2003.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; KINGSTON, D. G. I. Natural products as pharmaceuticals and sources for lead structures. In: WERMUTH, C. G. (Org.) *The practice of medicinal chemistry*. 3 ed. Illkirch: Academic Press, 2008. pp. 159-186.

NUNES, M. R. T.; FARIA, N. R.; VASCONCELOS, H. B.; MEDEIROS, D. B. A.; LIMA, C. P. S.; CARVALHO, V. L.; SILVA, E. V. P.; CARDOSO, J. F.; et al. Phylogeography of dengue virus serotype 4, Brazil, 2010–2011. **Emerging Infectious Diseases**, v. 18, n. 11, p. 1860-1866, 2012. doi:10.3201/eid1811.120217

OLIVEIRA, A. C. C.; SILVA, M. V. S.; MIRANDA, J. L.; BRAGA, V. M.; MOURA, G. S.; CALDAS, A. J. M.; AQUINO, D. M. C. Aspectos epidemiológicos do dengue em São Luís-

MA no período de 2001 a 2005. In: 44º Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. **Anais...**, Porto Alegre: PUCRS, 2008. pp. 154-154.

OLIVEIRA, D. A.; PIETRAFESA, J. P.; BARBALHO, M. G. S. Manutenção da biodiversidade e o hotspots cerrado. **Caminhos de Geografia**, v. 9, n. 26, p. 101-114, 2008.

OLIVEIRA, I. P.; COSTA, K. A. P.; SANTOS, K. J. G.; MOREIRA, F. P. Considerações sobre a acidez dos solos de cerrado. **Revista Eletrônica Faculdade Montes Belos**, v. 1, n. 1, p. 1-12, 2005.

OLIVEIRA, V. B.; YAMADA, L. T.; FAGG, C. W.; BRANDÃO, M. G. L. Native foods from Brazilian biodiversity as a source of bioactive compounds. **Food Research International**, v. 48, p. 170-179, 2012. doi:10.1016/j.foodres.2012.03.011

OMS. **Vector resistance to pesticides**: fifteenth report of the WHO expert committee on vector biology and control. Geneva: WHO Technical Report Series 818, 1992. 62 p.

_____. **Vector Control for Malaria and other Mosquito-Borne**. Diseases Report of a WHO Study Group. Geneva: WHO/TRS/857, 1995. 100 p.

_____. **Techniques to detect insecticide resistance mechanisms (field and laboratory manual)**. Geneva: World Health Organization, 1998. 35 p. Disponível em: http://whqlibdoc.who.int/hq/1998/WHO_CDS_CPC_MAL_98.6.pdf. Acesso em: 24 de outubro de 2011.

_____. **Pesticides and their application**: for the control of vectors and pests of public health importance. 6 ed. Geneva: World Health Organization, 2006. 125 p. Disponível em: http://whqlibdoc.who.int/hq/2006/WHO_CDS_NTD_WHOPES_GCDPP_2006.1_eng.pdf. Acesso em: 15 de agosto de 2012.

_____. **Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control**. 2. ed. Geneva: World Health Organization, 2009a. 147 p.

_____. **Temephos in drinking-water**: use for vector control in drinking-water sources and containers. Geneva: WHO Press, 2009b. 14 p.

OMS. **Dengue Net**, 2011. Disponível em: <http://www.who.int/csr/disease/dengue/denguenet/en/index.html>. Acesso em: 18 de Setembro de 2011.

_____. **Handbook for integrated vector management**. Geneva: World Health Organization, 2012a. 78 p.

_____. **Global strategy for dengue prevention and control 2012-2020**. Geneva: WHO Press, 2012b. 43 p.

_____. **Recommended compounds and formulations for control of mosquito larvae**. WHOPES, 2012c. Disponível em: http://www.who.int/whopes/Mosquito_Larvicides_Sept_2012.pdf. Acesso em: 28 de Setembro de 2012.

OMS/UNICEF. **Progress on drinking-water and sanitation**: special focus on sanitation. Nova York: United Nations Children's Fund e Geneva: World Health Organization, 2008. 58 p. Disponível em: http://www.who.int/water_sanitation_health/monitoring/jmp2008.pdf. Acesso em: 18 de maio de 2012.

OPAS. **Number of reported cases of dengue and severe dengue (SD) in the Americas, by country**: Epidemiological Week/EW 48 (Updated 15 Dic 2012), 2012. Disponível em: http://new.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=264&Itemid=363&lang=en. Acesso em: 20 de dezembro de 2012.

PARK, H. M.; KIM, J.; CHANG, K. S.; KIM, B. S.; YANG, Y. J.; KIM, G. H.; SHIN, S. C.; PARK, I. K. Larvicidal activity of Myrtaceae essential oils and their components against *Aedes aegypti*, acute toxicity on *Daphnia magna*, and aqueous residue. **Journal of Medical Entomology**, v. 48, n. 2, p. 405-410, 2011. doi:10.1603/ME10108

PERUMALSAMY, H.; CHANG, K. S.; PARK, C.; AHN, Y. J. Larvicidal activity of *Asarum heterotropoides* root constituents against insecticide-susceptible and -resistant *Culex pipiens pallens* and *Aedes aegypti* and *Ochlerotatus togoi*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 10001-10006, 2010. doi:10.1021/jf102193k

PESSANHA, J. E. M.; CAIAFFA, W. T.; CÉSAR, C. C.; PROIETTI, F. A. Evaluation of the Brazilian National Dengue Control Plan. **Caderno de Saúde Pública**, v. 25, n. 7, p. 1637-1641, 2009.

PINHEIRO, F.; NELSON, M. Re-emergence of dengue and emergence of dengue haemorrhagic fever in the Americas. **Dengue Bulletin**, v. 21, p. 16-24, 1997.

POLANCZYK, R. A.; GARCIA, M. O.; ALVES, S. B. Potencial de *Bacillus thuringiensis israelenses* Berliner no controle de *Aedes aegypti*. **Revista de Saúde Pública**, v. 37, n. 6, p. 813-816, 2003.

POLSON, K. A.; BROGDON, W. G.; RAWLINS, S. C.; CHADEE, D. D. Characterization of insecticide resistance in Trinidadian strains of *Aedes aegypti* mosquitoes. **Acta Tropica**, v. 117, n. 1, p. 31-38, 2011. doi:10.1016/j.actatropica.2010.09.005

PROPHIRO, J. S.; SILVA, M. A. N.; KANIS, L. A.; SILVA, B. M.; DUQUE-LUNA, J.; SILVA, O. S. Evaluation of time toxicity, residual effect, and growth-inhibiting property of *Carapa guianensis* and *Copaifera* sp. in *Aedes aegypti*. **Parasitology Research**, v. 110, p. 713-719, 2012. doi:10.1007/s00436-011-2547-5

RASKIN, I.; RIBNICKY, D. M.; KOMARNYTSKY, S.; ILIC, N.; POULEV, A.; BORISJUK, N.; BRINKER, A.; MORENO, D. A.; RIPOLL, C.; YAKOBY, N.; O'NEAL, J. M.; CORNWELL, T.; PASTOR, I.; FRIDLENDER, B. Plants and human health in the twenty-first century. **Trends in Biotechnology**, v. 20, n. 12, p. 522-531, 2002.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, p. 603-613, 2001.

REBÊLO, J. M. M.; COSTA, J. M. L.; SILVA, F. S.; PEREIRA, Y. N. O.; SILVA, J. M. Distribuição de *Aedes aegypti* e do dengue no Estado do Maranhão, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, v. 15, n. 3, p. 477-486, 1999.

REIS, C. B.; ANDRADE, S. M. O.; CUNHA, R. V. Aliados do *A. Aegypti*: fatores contribuintes para a ocorrência do dengue segundo as representações sociais dos profissionais das equipes de saúde da família. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 18, n. 2, p. 517-526, 2013.

RIBEIRO, J. R.; WALTER, B. M. T. Fitofisionomias do bioma Cerrado. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, A. P. (Org.) **Cerrado**: Ambiente e flora. Planaltina: Embrapa – Cerrados, 1998. pp. 89-166.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Farmacognosia e farmacobiotechnologia**. São Paulo: Premier, 1997. 372 p.

RYAN, M. F.; BYRNE, O. Plant-insect coevolution and inhibition of acetylcholinesterase. **Journal of Chemical Ecology**, v. 14, p. 1965-1975, 1988.

SHEPARD, D. S.; COUDEVILLE, L.; HALASA, Y. A.; ZAMBRANO, B.; DAYAN, G. H. Economic impact of dengue illness in the Americas. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 84, n. 2, p. 200-207, 2011. doi:10.4269/ajtmh.2011.10-0503

SCHLIESSMAN, D. J.; CALHEIRO, L. B. Review of status of yellow fever and *Aedes aegypti* eradication programs in Americas. **Mosquito News**, v. 34, n. 1-9, 1974.

SENG, C. M.; SETHA, T.; NEALON, J.; SOCHEAT, D.; CHANTHA, N.; NATHAN, M. B. Community-based use of the larvivorous fish *Poecilia reticulata* to control the dengue vector *Aedes aegypti* in domestic water storage containers in rural Cambodia. **Journal of Vector Ecology**, v. 33, n. 1, p. 139-144, 2008.

SILVA, G. M.; OLIVEIRA-JR, J. N.; DINIZ, M. B. Condicionantes socioeconômicos e ambientais dos clubes de convergência da renda na Amazônia Legal 1985 a 2007. **Estudos Econômicos**, v. 41, n. 4, p. 841-874, 2011.

SILVA, H. H. G.; SILVA, I. G.; OLIVEIRA, C. L. N. S.; ELIAS, C. N. Adaptação do *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) em criadouros artificiais com água poluída. **Entomologia y Vectores**, v. 6, p. 383-391, 1999.

SILVA, J. S.; IBIAPINA, S. S.; BEZERRA, J. M. T.; TADEI, W. P.; PINHEIRO, V. C. S. Variation in *Aedes aegypti* (Linnaeus) (Diptera, Culicidae) infestation in artificial containers in Caxias, State of Maranhão, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 2, p. 174-179, 2012.

SILVA, W. G. **Atividade larvicida do óleo essencial de plantas existentes no Estado de Sergipe contra *Aedes aegypti* Linn.** 86 f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento e Ambiente) Universidade Federal de Sergipe, Sergipe, 2006.

SIMAS, N. K.; LIMA, E. C.; CONCEIÇÃO, S. R.; KUSTER, R. M.; OLIVEIRA-FILHO, A. M. Produtos naturais para o controle da transmissão da dengue – atividade larvicida de *Myroxylon balsamum* (óleo vermelho) e de terpenóides e fenilpropanóides **Química Nova**, v. 27, p. 46-49, 2004.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Florianópolis: Editora da UFSC, 2005. 821 p.

SINGHASIVANON, P.; JACOBSON, J. Dengue is a major global health problem: Foreword. **Journal of Clinical Virology**, v. 46, n. S2, S1–S2, 2009.

SINGHI, S.; KISSOON, N.; BANSAL, A. Dengue and dengue hemorrhagic fever: management issues in an intensive care unit. **Jornal de Pediatria**, v. 83, n. 2 Suppl, p. S22–35, 2007. doi:10.2223/JPED.1622

SIQUEIRA-JR, J. B.; MARTELLI, C. M. T.; COELHO, G. E.; SIMPLÍCIO, A. C. R.; HATCH, D. L. Dengue and dengue hemorrhagic fever, Brazil, 1981–2002. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 1, p. 48–53, 2005.

SMITH, G. S.; ELIASON, D. A.; MOORE, C. G.; IHENACHO, E. N. Use of elevated temperatures to kill *Aedes albopictus* and *Ae. aegypti*. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 4, p. 557–558, 1988.

SOUZA, T. M.; CUNHA, A. P.; FARIAS, D. F.; MACHADO, L. K.; MORAIS, S. M.; RICARDO, N. M. P. S.; CARVALHO, A. F. U. Insecticidal activity against *Aedes aegypti* of *m*-pentadecadienyl-phenol isolated from *Myracrodruon urundeuva* seeds. **Pest Management Science**, v. 68, p. 1380–1384, 2012.

SVOBODA, K. P.; SVOBODA, T. G.; SYRED, A. D. **Secretory structures of aromatic and medicinal plants: a review and micrographs**. Beguildy: Microscopix publications, 2000. 60 p.

TAPIA-CONYER, R.; MÉNDEZ-GALVÁN, J. F.; GALLARDO-RINCÓN, H. The growing burden of dengue in Latin America. **Journal of Clinical Virology**, v. 46, n. S2, p. S3–S6, 2009.

TAUIL, P. L. Perspectivas de controle de doenças transmitidas por vetores no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n.3, p. 275–277, 2006.

TEIXEIRA, M. G.; BARRETO, M. L.; GUERRA, Z. Epidemiologia e medidas de prevenção do dengue. **Informe Epidemiológico do SUS**, v. 8, n. 4, p. 5–33, 1999.

TEIXEIRA, M. G.; BARRETO, M. L.; COSTA, M. C. N.; FERREIRA, L. D. A.; VASCONCELOS, P. F. C.; CAIRNCROSS, S. Dynamics of dengue virus circulation: a silent epidemic in a complex urban area. **Tropical Medicine and International Health**, v. 7, n. 9, p. 757-762, 2002.

TEMPORÃO, J. G.; PENNA, G. O.; CARMO, E. H.; COELHO, G. E.; AZEVEDO, R. S. S.; NUNES, M. R. T.; VASCONCELOS, P. F. C. Dengue virus serotype 4, Roraima State, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 5, p. 938-940, 2011. doi:10.3201/eid1705.101681

TANDON, S. Distillation technology for essential oils. In: HANDA, S. S.; KHANUJA, S. P. S.; LONGO, G.; RAKESH, D. D. (Org.) **Extraction technologies for medicinal and aromatic plants**. Trieste: ICS Unido, 2008. pp. 115-127.

VASCONCELOS, P. F. C.; LIMA, J. W. O.; RAPOSO, M. L.; RODRIGUES, S. G.; ROSA, J. S. T.; AMORIM, S. M. C. Inquérito soro-epidemiológico na Ilha de São Luís durante epidemia de dengue no Maranhão. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 3, p. 171-179, 1999.

VIEIRA, I. C. G.; TOLEDO, P. M.; SILVA, J. M. C.; HIGUCHI, H. Deforestation and threats to the biodiversity of Amazonia. **Brazilian Journal of Biology**, v. 68, n. 4(Suppl.), p. 949-956, 2008.

VILA, R.; SANTANA, A. I.; PÉREZ-ROSÉS, R. et al. Composition and biological activity of the essential oil from leaves of *Plinia cerrocampaensis*, a new source of α -bisabolol. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 7, p. 2510-2514, 2010. doi:10.1016/j.biortech.2009.11.021

WILSON, M. E.; CHEN, L. H. Dengue in the Americas. **Dengue Bulletin**, v. 26, p. 44-61, 2002.

XAUD, H. A. M.; MARTINS, F. S. R. V.; SANTOS, J. R. Tropical forest degradation by mega-fires in the northern Brazilian Amazon. **Forest Ecology and Management**, v. 294, p. 97-106, 2013.

YUNES, R. A.; CHECHINEL-FILHO, V. **Química de Produtos Naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**. 1 ed. Itajaí: Univali, 2007. 299 p.

CAPÍTULO 1. ESSENTIAL OILS AND THEIR COMPOUNDS AS *Aedes aegypti* L. (Diptera, Culicidae) LARVICIDES: REVIEW

Este capítulo será submetido à Revista “Parasitology Research”, na forma de artigo de revisão e está normatizado de acordo com as normas para a publicação nesta revista (ANEXO 1).

ABSTRACT The aim of this review is to describe the essential oils and their compounds that are bioactive against *Aedes aegypti* L. (Diptera, Culicidae) larvae, the immature stage of the primary vector of dengue. This review is based on original articles obtained by searching on major databases. Our literature review revealed that 210 essential oils from 159 plant species have been tested for their larvicidal potential. More than 75% of these essential oils were considered active ($LC_{50} < 100$ mg/l). The majority of the active oils are from species belonging to Myrtaceae (13%), Cupressaceae (10%), and Piperaceae (8%). Approximately 40% of the plants studied for their larvicidal activity against *A. aegypti* were collected in Brazil. Essential oils rich in phenylpropanoids, oxygenated sesquiterpenes, and monoterpene hydrocarbons were the most active. The plant parts used and the major constituents of the essential oils are presented. In addition, factors affecting the activity, structure-activity relationships, and mechanisms of action of the essential oils and their compounds are discussed. Essential oils have been widely investigated and demonstrate high larvicidal activity against *A. aegypti*. This review reveals that the essential oils are effective alternatives for the production of larvicides to be used in vector-borne disease control programs.

Key words: Aromatic plants. Sesquiterpenes. Monoterpenes. Phenylpropanoids. Larvicidal activity. Dengue.

Introduction

The incidence of dengue has increased worldwide 30-fold in recent decades. In 2012, dengue was considered the most important mosquito-borne viral disease in the world, being endemic in over 100 countries of the tropical and subtropical regions where over 2.5 billion people live. About 40% of the world's population is now at risk to be infected by dengue virus; it is estimated that among this population, 50-100 million are infected per year, with 500,000 cases of severe dengue. About 2.5% of those affected die and most of them are children in some Asian and Latin American countries (WHO 2009a, 2012a, b).

According to the World Health Organization (WHO) (2012c), *Aedes (Stegomyia) aegypti* L. (Diptera, Culicidae) is the primary vector of dengue. This mosquito is a highly anthropophilic species; being adapted to the urban human environment and use man-made artificial containers for oviposition and development of the aquatic stages. The virus transmission to humans occurs through the bites of infected female mosquitoes that are daytime feeder (Eldridge 2005; Klowden 2007).

Whereas there are no specific drug available to prevent the propagation of serotypes of the dengue virus and neither effective vaccines against the virus, because the vaccine needs to provide protection against all four serotypes of virus (Konishi 2011), the control of dengue is based on the combat of the mosquitoes (Gubler 2011).

The organophosphate temephos is the most appropriate larvicide to be used in public health programs (WHO 2009b). However, the continued and repeated use of temephos has contributed to the development of resistant strains of vector-borne diseases (WHO 1992; Braga and Valle 2007; Polson et al. 2011).

To overcome these problems it is interesting to find out new larvicides with different modes of action in view of the few available choices of pesticides for use in public health control. The ideal insecticide has to be effective, ecologically sound, sustainable, low mammalian toxicity and cost-effective. Besides, the larvicides should not change the characteristics of the water significantly (WHO 2006).

WHO (2012d) reported four categories of vector control in the Handbook for Integrated Vector Management. Among them, the botanicals preparations are cited as a biological method of control.

The plant-insect relationships are a reason for interest in the search for herbal products. For thousands of years, plants and insects have evolved in parallel. This coevolution

has led to the development in many plants of chemical and physical mechanisms of defense against insects (Ryan and Byrne 1988). In addition, there is the traditional use of plant parts and plant derivatives by human communities to control pest species of insects (Dharmagadda et al. 2005; Shaalan et al. 2005). Azadirachtin, anabasine, quassia, nicotine, pyrethrins, D-limonene, and carvacrol were important botanical insecticides used before the advent of synthetic chemicals (Wood 2012). As well as citronella oil has been used extensively as an insect repellent (EPA 1999; Kongkaew et al. 2011).

All these factors mentioned have attracted the attention of researchers to find out new plant-based insecticides (Shaalan et al. 2005), especially for the control of *A. aegypti* propagation by larvicidal agents (Geris et al. 2012). Some studies have focused on the use of essential oils from plants as potential bioactive agents against *A. aegypti* larvae (Magalhães et al. 2010; Vila et al. 2010; Park et al. 2011; Govindarajan et al. 2012). Essential oils can be considered the best alternative for the control of disease vectors (Bilal and Hassan 2012). They are complex mixtures of volatile secondary metabolites belonging mainly to phenylpropanoids, mono- sesquiterpenes classes. Diterpenes can also be found, although there are few oils with them (Baser and Buchbauer 2010).

Literature reviews regarding plant-base products with biological activity have shown significant contribution to the development of new alternatives for use on human health (Amaral et al. 2006; Krishnaiah et al. 2011; Lang and Buchbauer, 2011; Kumar et al. 2012; Unnati et al. 2013).

Due to the available literature reviews about plant extracts against insects (Sukumar et al. 1991; Shaalan et al. 2005; Koul et al. 2008; Zoubiri and Baaliouamer, 2011) we focused this review to studies of larvicidal activity against *A. aegypti* on essential oils, exploring the relationships between oil constituents and larvicidal activity, with the aim of contributing to the search for new alternatives for the dengue control. We present a review based on original articles that were chosen by searching on major databases, such as Biological Abstracts, Chemical Abstracts, Web of Science, Pubmed, Scopus, ScienceDirect, and Scielo. The patents were found by searching on the database of European Patent Office. The key words employed in the literature review were “essential oils”, “larvicidal activity”, “larvicide”, and “*Aedes aegypti*”.

Essential oils and their compounds as larvicides against *Aedes aegypti*

The WHO published in 2005 the Guidelines for Laboratory and Field Testing of Mosquito Larvicides aiming to standardize the procedures for testing larvicides action. This document defines the sequential phases for evaluating a larvicide preparation or compound. It is recommended that the studies begin at the laboratory to determine the potential of tested samples. Then small- and large-scale field trials should be performed to analyze the effects on non-target organisms, the efficacy and residual under different ecological settings. The Guidelines shows that the potency of a chemical against particular specie of mosquito larvae must be compared with other insecticides (WHO 2005).

Several authors determined their own forms to characterize the potency of natural products as mosquito larvicides (Chantraine et al. 1998; Massebo et al. 2009; Magalhães et al. 2010). Komalamisra et al. (2005) considered products showing $LC_{50} < 50$ mg/l active, 50 mg/l $< LC_{50} < 100$ mg/l moderately active, 100 mg/l $< LC_{50} < 750$ mg/l effective, and $LC_{50} > 750$ mg/l inactive. For Kiran et al. (2006), compounds with $LC_{50} < 100$ mg/l show significant larvicidal effect.

As the WHO does not show a standard criterion for determining the larvicidal activity of natural products, in this review we used the classification established by Cheng et al. (2003) in which the compounds with $LC_{50} > 100$ mg/l were considered not active, with $LC_{50} < 100$ mg/l were active and $LC_{50} < 50$ mg/l were highly active.

Our literature review showed that 210 essential oils from 159 plant species have been tested by their larvicidal potential against *A. aegypti*. According to the classification of Cheng et al. (2003), more than 75% of these essential oils were considered active ($LC_{50} < 100$ mg/l) in our review. This result confirms the ecological role of essential oil in nature; many essential oils serve to protect plants by defense mechanisms against pathogens and predators (Grodnitzky and Coats 2002; Bakkali et al. 2008). Hence it shows the great potential of plant essential oils in dengue control. In table 1 were listed these species as well as their essential oil characteristics.

These studies about essential oil as *A. aegypti* larvicide used species distributed among 27 (twenty-seven) families, mainly from Myrtaceae (13%), Lamiaceae (11%), Lauraceae (10%), and Zingiberaceae (7.8%). The majority of the active oils are from species that belong to Myrtaceae (13%), Cupressaceae (9.8%) and Piperaceae (7.9%). According to Sukumar et al. (1991), Regnault-Roger (1997), Magalhães et al. (2010), and Park et al.

(2011), species belong to Myrtaceae, Apiaceae, Piperaceae, Lamiaceae, Rutaceae, Asteraceae, Meliaceae, and Zingiberaceae have the potential to be used as insecticide.

The most active essential oils were from woods of *Callitris glaucophylla* Joy (LC₅₀ 0.69 mg/l), *Juniperus virginiana* L. (LC₅₀ 1 mg/l), *Thymus serpyllum* L. (LC₅₀ 1 mg/l), and *Amyris balsamifera* L. (LC₅₀ 1 mg/l) (Shalan et al. 2006; Amer and Mehlhorn 2006). Their LC₅₀ values can be comparable with the dosage recommended for the use of temephos (1 mg/l) in container-breeding (WHO 2012e).

The essential oils were extracted from the whole or from specific parts of the plant; from the analyzed studies, leaves were the most used part of the plant (55%). Although among these studies with oils from leaves only 50% of them showed a high activity (LC₅₀ < 50 mg/l) (Cheng et al. 2003), whereas almost 80% of essential oils from seeds were shown to be highly active.

About 40% and 27% of the plants studied for the larvicidal activity against *A. aegypti* were collected in Brazil and Northeast of Brazil, respectively; essential oils from these plants have been the most studied. These data support the importance of Brazilian biodiversity. According to Oliveira et al. (2012), 20% of the plants species of the world were native from Brazilian flora; however, these plants are not optimally used and should be further studied.

The essential oils rich in phenylpropanoids, oxygenated sesquiterpenes, and monoterpene hydrocarbons were the most active; all phenylpropanoid-rich essential oils showed larvicidal activity. The essential oils that were not active according to the criterion established by Cheng et al. (2003) were listed in table 2. Euphorbiaceae and Zingiberaceae were the botanical families that have showed the highest ratio of inactive species.

To further understand the relationship between essential oils and their larvicidal activity, some authors have isolated and tested the major compounds of these oils. In most of these studies, it was observed that the whole essential oil was as active as their isolated compounds. Phenylpropanoids and monoterpene hydrocarbons were the most active compound classes. In table 3 were listed the isolated compounds that were considered active (LC₅₀ < 100 mg/l) according to Cheng et al. (2003).

On the other hand, the oxygenated sesquiterpenes β -eudesmol and caryophyllene oxide which are major compounds of the active essential oils from *Guatteria friesiana* Erkens & Maas and *Guatteria blepharophylla* Mart., respectively (Aciole et al. 2011), were not active when tested isolated, although the whole oil showed high activity (Cheng et al. 2009a, b); this

can be explained by the interactions between the constituents present in oils. Other compounds that were considered inactive ($LC_{50} > 100$ mg/l) according to Cheng et al. (2003) were listed in table 4.

On the studies performed by Magalhães et al. (2010), Aciole et al. (2011), and Lima et al. (2011) they achieved results which demonstrated the high potential larvicidal of oxygenated sesquiterpene-rich essential oil. Lima et al. (2011) correlated the activity of *Spondias purpurea* L. essential oil with high concentration of these compounds in blend. Simas et al. (2004) noted that oxygenated sesquiterpenes were more effective than monoterpenes and phenylpropanoids. For these authors, these results led to the hypothesis that lipophilicity is an important tool for the larvicidal activity on *A. aegypti*.

Essential oils are complex chemical mixtures of major and minor compounds. In general the bioactivity of essential oils is correlated to the major compounds. However is important to note that among these secondary metabolites can have interactions; these relations increase, decrease or no change the larvicidal activity of tested oils compared with that from their isolated constituents (Waliwitiya et al. 2009). The synergistic phenomenon exists in botanical preparations by the interaction between major and minor molecules. In some cases the bioactivity of the blend is higher than those on purified compounds (Lahlou 2004a; Shaalan et al. 2005).

Cheng et al. (2009c) found that the leaf essential oil from *Cryptomeria japonica* (Thunb. ex L. f.) D. Don (LC_{50} 28.4 mg/l) was more toxic to *A. Aegypti* larvae than its major constituents, 16-kaurene (LC_{50} 57.0 mg/l) and elemol ($LC_{50} > 100.0$ mg/l) that are both present on the samples at concentrations near to 20%. The authors suggest that the minor compounds as 3-carene (LC_{50} 25.3 mg/l), terpinolene (LC_{50} 32.1 mg/l), α -terpinene (LC_{50} 28.1 mg/l), and γ -terpinene (LC_{50} 26.8 mg/l) also contribute to the larvicidal activity, since they exhibited great larvicidal potential.

In a study performed by Silva et al. (2008), β -caryophyllene and caryophyllene oxide were found to be the major compounds of the leaf essential oil of *Hyptis pectinata* (L.) Poit. This oil exhibited a LC_{50} value of 366 mg/l against *A. aegypti* larvae; whereas LC_{50} value of β -caryophyllene was 1202 mg/l and of caryophyllene oxide 125 mg/l.

With this review, we observed that the lowest LC_{50} values on essential oils were lower than that on their isolated compounds. For example, among the oils tested, the wood essential oil from *Callitris glaucophylla* (LC_{50} 0.69 mg/l) showed the highest larvicidal

potential; whereas the lowest LC₅₀ values showed for an isolated compound from essential oil were 6.8 mg/l to the phenylpropanoids benzyl benzoate and benzyl salicylate.

The ecological role of essential oils on the plant defense occurs due the blends of compounds and not because the individual ones. This shows us the importance of the complexity of chemical composition of the natural products. Understand the mechanisms involved in synergistic phenomenon are meaningful for the improvement of essential oil-based larvicidal products.

These results support the idea of using complex natural product, without the isolation of active compound. The production and marketing of essential oil can be much cheaper than that for larvicide compounds, since the necessary process for the isolation or synthesis of them are more expensive. So it is possible obtain an essential oil-based larvicidal product economically viable, obtained from renewable resource and with greater acceptance by the population. Thus, scientific research in this segment should be encouraged in order to contribute to the development of these kinds of products.

Another further way to develop more effective natural products for use in mosquito control is adding the synthetic compound piperonyl butoxide (PBO) to natural compounds. PBO is an inhibitor of microsomal mono-oxygenases, which is involved in the metabolism and detoxification of insecticides (Kumar et al. 2002). Waliwitiya et al. (2009) reported the synergistic effect of PBO with phytochemicals. This study showed that plant-based products containing PBO became more active, such that their required concentrations can be compared to those of conventional larvicides.

Table 1. Plant essential oils that have been considered active ($LC_{50} < 100$ mg/l) against *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) larvae, according to the criterion established by Cheng et al. (2003)

Family and Species	Part Used	Plant Origin	Major Constituents	LC_{50} (mg/l)	Reference
Amaranthaceae					
<i>Chenopodium ambrosioides</i> L.	Aerial	Cuba	α -terpineol	35	Leyva et al. 2009a
	Aerial	Ethiopia	NI	9.1	Massebo et al. 2009
Anacardiaceae					
<i>Anacardium humile</i> A. St.-Hil.	Leaves	Brazilian Savanna	NI	20.9	Porto et al. 2008
<i>Schinus molle</i> L.	Leaves	Ethiopia	NI	9.6	Massebo et al. 2009
	Seeds	Ethiopia	NI	14.5	Massebo et al. 2009
<i>Spondias purpurea</i> L.	Leaves	Northeast of Brazil	Caryophyllene oxide and α -cadinol	39.7	Lima et al. 2011
Annonaceae					
<i>Guatteria blepharophylla</i> Mart.	Leaves	Brazilian Amazon	Caryophyllene oxide	58.72	Aciole et al. 2011
<i>Guatteria friesiana</i> Erkens & Maas	Leaves	Brazilian Amazon	β -eudesmol	52.6	Aciole et al. 2011
<i>Guatteria hispida</i> (R.E.Fr.) Erkens & Maas	Leaves	Brazilian Amazon	α -pinene and β -pinene	85.74	Aciole et al. 2011
<i>Rollinia leptopetala</i> R.E. Fr.	Stems	Northeast of Brazil	Spathulenol	34.7	Feitosa et al. 2009
Apiaceae					
<i>Anethum graveolens</i> L.	Aerial	Germany	NI	50	Amer and Mehlhorn 2006
<i>Apium graveolens</i> L.	Seeds	Thailand	(R)-(+)-limonene	42.1	Pitasawat et al. 2007
<i>Carum carvi</i> L.	Seeds	Thailand	Carvone	54.62	Pitasawat et al. 2007
<i>Daucus carota</i> L.	Root	South Korea	NI	NI*	Lee 2006
<i>Foeniculum vulgare</i> Mill.	Fruits	Thailand	<i>trans</i> -anethole	49.3	Pitasawat et al. 2007
	Seeds	Bolivia	NI	24.3	Chantraine et al. 1998
Araliaceae					
<i>Dendropanax morbifera</i>	Flower	South Korea	γ -elemene	62.32	Chung et al. 2009
Aristolochiaceae					
<i>Asarum heterotropoides</i> Leveille	Root	Korea	Methyleugenol and safrole	23.8	Perumalsamy et al. 2009, 2010
Asteraceae					
<i>Baccharis</i> sp. L.	Aerial	Bolivia	NI	14.7	Chantraine et al. 1998
<i>Coreopsis fasciculata</i> Wedd.	Aerial	Bolivia	NI	26.5	Chantraine et al. 1998
<i>Eupatorium betonicaeforme</i> (DC.) Baker	Root	Northeast of Brazil	β -caryophyllene	NI*	Albuquerque et al. 2004
<i>Helichrysum italicum</i> G. Don f.	NI	France	NI	100	Amer and Mehlhorn 2006
<i>Senecio adenophylloides</i> Sch. Bip.	Leaves	Bolivia	NI	43.4	Chantraine et al. 1998
<i>Tagetes erecta</i> L.	Leaves and Stem	Northeast of Brazil	Piperitone	79.78	Marques et al. 2011

Cont.

Continuation Table 1

Familly and Species	Part Used	Plant Origin	Major Constituents	LC ₅₀ (mg/l)	Reference
Asteraceae					
<i>Tagetes patula</i> L.	Leaves	India	Limonene and terpinolene	13.57	Dharmagadda et al. 2005
<i>Tagetes pusilla</i> Kunth	Seeds	Bolivia	NI	14.1	Chantraine et al. 1998
Boraginaceae					
<i>Cordia curassavica</i> (Jacq.) Roem. & Schult.	Leaves	Southeast of Brazil	<i>cis</i> -isolongifolone	87.70	Aciole 2009
	Leaves	Northeast of Brazil	α -pinene	97.7	Santos et al. 2006
<i>Cordia leucomalloides</i> Taroda	Leaves	Northeast of Brazil	δ -cadinene and (<i>E</i>)- caryophyllene	63.1	Santos et al. 2006
Burseraceae					
<i>Boswellia carteri</i> Birdw.	Resins	Somalia	NI	10	Amer and Mehlhorn 2006
<i>Commiphora myrrha</i> (T. Nees) Engl.	Stem bark	South Korea	NI	NI*	Lee 2006
Convolvulaceae					
<i>Ipomoea cairica</i> (L.) Sweet	Leaves	India	NI	22	Thomas et al. 2004
Cupressaceae					
<i>Cryptomeria japonica</i> (Thunb. ex L. f.) D. Don	Leaves	Taiwan	16-kaurene and elemol	28.4 – 56.7	Cheng et al. 2009c
	Leaves	Taiwan	NI	37.6	Cheng et al. 2003
	Bark	Taiwan	NI	48.1	Cheng et al. 2003
	Heartwood	Taiwan	NI	72	Cheng et al. 2003
	Sapwood	Taiwan	NI	82.7	Cheng et al. 2003
<i>Chamaecyparis formosensis</i> Matsum.	Wood	Taiwan	Myrtenol	38.6	Kuo et al. 2007
<i>Callitris glaucophylla</i> Joy Thomps. & L.P. Johnson	Wood	Australia	Guaiol and citronellic acid	0.69	Shalan et al. 2006
<i>Calocedrus formosana</i> (Florin) Florin	Heartwood	Taiwan	NI	75.2	Cheng et al. 2003
	Bark	Taiwan	NI	51.8	Cheng et al. 2003
	Leaves	Taiwan	NI	56.3	Cheng et al. 2003
<i>Juniperus virginiana</i> L.	Wood	USA	NI	1	Amer and Mehlhorn 2006
<i>Juniperus communis</i> L.	NI	Austria	NI	50	Amer and Mehlhorn 2006
<i>Taiwania cryptomerioides</i> Hayata	Heartwood	Taiwan	NI	79.8	Cheng et al. 2003
Euphorbiaceae					
<i>Croton nepetaefolius</i> Baill.	Leaves	Northeast of Brazil	Methyleugenol	84	Morais et al. 2006
<i>Croton regelianus</i> Müll. Arg.	Leaves	Northeast of Brazil	Ascaridole, <i>p</i> -cymene, and camphor	24.2	Torres et al. 2008
<i>Croton zehntneri</i> Pax & K. Hoffm.	Leaves	Northeast of Brazil	(<i>E</i>)-anethole	28	Morais et al. 2006
	Leaves	Northeast of Brazil	(<i>E</i>)-anethole	56.2	Santos et al. 2007
	Stalkes	Northeast of Brazil	(<i>E</i>)-anethole and <i>p</i> -anisaldehyde	51.3	Santos et al. 2007
	Inflorescence	Northeast of Brazil	(<i>E</i>)-anethole	57.5	Santos et al. 2007

Cont.

Continuation Table 1

Familly and Species	Part Used	Plant Origin	Major Constituents	LC ₅₀ (mg/l)	Reference
Euphorbiaceae					
<i>Phyllanthus amarus</i> Sch. Et Thonn	Aerial	Nigeria	Linalool	25	Oyewole et al. 2010
Fabaceae					
<i>Bauhinia acuruana</i> Moric	Leaves	Northeast of Brazil	epi- α -cadinol	56.22	Gois 2010
<i>Hymenaea courbaril</i> L.	Ripe fruit peels	Northeast of Brazil	α -copaene and spathulenol	14.8	Aguiar et al. 2010
	Unripe fruit peels	Northeast of Brazil	Germacrene D and β -caryophyllene	28.4	Aguiar et al. 2010
Lamiaceae					
<i>Hyptis martiusii</i> Benth.	Leaves	Northeast of Brazil	δ -3-carene and 1,8-cineol	18.5	Costa et al. 2005
<i>Lavandula gibsoni</i> J. Graham	Aerial	India	α -terpinolen and thymol	48.32	Kulkarni et al. 2013
<i>Mentha spicata</i> L.	Leaves	India	Carvone	56.08	Govindarajan et al. 2012
	Leaves	Ethiopia	NI	67.8	Massebo et al. 2008
<i>Nepeta cataria</i> L.	NI	NI	(<i>E</i>),(<i>Z</i>)-nepetalactone and (<i>Z</i>),(<i>E</i>)-nepetalactone	70	Zhu et al. 2006
<i>Ocimum americanum</i> L.	Leaves and branches	Northeast of Brazil	(<i>E</i>)-methyl-cinnamate	67	Cavalcanti et al. 2004
<i>Ocimum gratissimum</i> L.	Aerial	Northeast of Brazil	Eugenol	60	Cavalcanti et al. 2004
<i>Ocimum lamiifolium</i> Hochst. Ex Benth.	Leaves	Ethiopia	NI	8.6	Massebo et al. 2009
<i>Ocimum suave</i> Willd.	Leaves	Ethiopia	NI	29.8	Massebo et al. 2009
<i>Origanum marjorana</i> L.	Leaves	South Korea	NI	NI*	Lee 2006
<i>Plectranthus amboinicus</i> (Lour.) Spreng.	Leaves	Northeast of Brazil	Carvacrol	51.8	Lima et al. 2011
<i>Plectranthus mollis</i> Spreng.	Aerial	India	Piperitone oxide and fenchone	25.39	Kulkarni et al. 2013
<i>Thymus serpyllum</i> L.	NI	Turkey	NI	1	Amer and Mehlhorn 2006
<i>Thymus vulgaris</i> L.	Leaves	Ethiopia	NI	17	Massebo et al. 2009
Lauraceae					
<i>Cinnamomum camphora</i> (L.) J. Presl	NI	Taiwan	NI	10	Amer and Mehlhorn 2006
<i>Cinnamomum cassia</i> (L.) C. Presl	NI	NI	Cinnamaldehyde	80	Zhu et al. 2006
<i>Cinnamomum impressicostatum</i> Kosterm.	Leaves	Malaysia	Benzyl benzoate and α -phellandrene	10.7	Jantan et al. 2005
	Leaves	Malaysia	NI	13.7	Jantan et al. 2003
<i>Cinnamomum microphyllum</i> Ridl.	Leaves	Malaysia	Benzyl benzoate	6.7	Jantan et al. 2005
	Leaves	Malaysia	NI	20.6	Jantan et al. 2003
<i>Cinnamomum mollissimum</i> Hook. F.	Leaves	Malaysia	Benzyl benzoate	10.2	Jantan et al. 2005

Cont.

Continuation Table 1

Famlily and Species	Part Used	Plant Origin	Major Constituents	LC ₅₀ (mg/l)	Reference
Lauraceae					
<i>Cinnamomum osmophloeum</i> Kaneh.	Leaves	Taiwan	NI	86.8	Cheng et al. 2003
	Leaves	Taiwan	<i>trans</i> -cinnamaldehyde	36	Cheng et al. 2004
	Leaves	Taiwan	<i>trans</i> -cinnamaldehyde and cinnamyl acetate	44	Cheng et al. 2004
<i>Cinnamomum pubescens</i> Kochummen	Leaves	Malaysia	Benzyl benzoate	12.8	Jantan et al. 2005
<i>Cinnamomum rhyncophyllum</i> Miq.	Leaves	Malaysia	Benzyl benzoate	6.2	Jantan et al. 2005
<i>Cinnamomum scortechinii</i> Gamble	Leaves	Malaysia	β-phellandrene and linalool	21	Jantan et al. 2005
<i>Cinnamomum sintoc</i> Blume	Leaves	Malaysia	Safrole	41	Jantan et al. 2005
Meliaceae					
<i>Guarea humaitensis</i> T.D. Penn.	Branches	Brazilian Amazon	Caryophyllene epoxide	48.6	Magalhães et al. 2010
<i>Guarea scabra</i> A. Juss.	Leaves	Brazilian Amazon	<i>cis</i> -caryophyllene	98.6	Magalhães et al. 2010
Myrtaceae					
<i>Eucalyptus camaldulensis</i> Dehnh.	Leaves	Taiwan	α-pinene, α-phellandrene, and <i>p</i> -cymene	31	Cheng et al. 2009b
<i>Eucalyptus citriodora</i> Hook.	Leaves	Ethiopia	NI	38.7	Massebo et al. 2009
	NI	NI	<i>p</i> -menthane-3,8-diol	58	Zhu et al. 2006
<i>Eucalyptus dunnii</i> Maiden	Leaves	Argentina	1,8-cineol and γ-terpinene	25.23	Lucia et al. 2008
<i>Eucalyptus globulus</i> Labill.	Leaves	Ethiopia	1,8-cineol	52	Massebo et al. 2009
<i>Eucalyptus grandis</i> W. Hill	Leaves	Argentina	α-pinene	32.4	Lucia et al. 2007
<i>Eucalyptus gunnii</i> Hook. F.	Leaves	Argentina	1,8-cineol and <i>p</i> -cymene	21.13	Lucia et al. 2008
<i>Eucalyptus saligna</i> Sm.	Leaves	Argentina	1,8-cineol and <i>p</i> -cymene	22.16	Lucia et al. 2008
<i>Eucalyptus tereticornis</i> Sm.	Leaves	Argentina	β-phellandrene and 1,8-cineol	22.14	Lucia et al. 2008
<i>Eucalyptus urophylla</i> S.T. Blake	Leaves	Taiwan	1,8-cineol	95.5	Cheng et al. 2009b
<i>Eugenia melanadenia</i> Krug & Urb.	Leaves	Pinar del Río, Cuba	1,8-cineol	85	Aguilera et al. 2003
<i>Melaleuca leucadendron</i> (L.) L.	NI	Cuba	1,8-cineol, α-pinene and α-terpineol	41	Leyva et al. 2008
<i>Myrtus communis</i> L.	Leaves and Twigs	France	NI	50	Amer and Mehlhorn 2006
<i>Pimenta dioica</i> (L.) Merr.	Leaves	Southeast of Brazil	Eugenol	38.8	Marinho 2010
<i>Pimenta pseudocaryophyllus</i> (Gomes) Landrum	Leaves	Southeast of Brazil	Chavibetol (m-eugenol)	44.1	Aciole 2009
<i>Pimenta racemosa</i> (Mill.) J.W. Moore	Leaves	Cuba	Terpinem-4-ol and 1,8-cineol	27	Leyva et al. 2009a
<i>Psidium guajava</i> L.	Leaves	Northeast of Brazil	1,8-cineol and β-caryophyllene	24	Lima et al. 2011
<i>Psidium rotundatum</i> Griseb.	Leaves	Cuba	1,8-cineol	63	Aguilera et al. 2003
<i>Syzygium aromaticum</i> (L.) Merr. & L.M. Perry	Flowers	Northeast of Brazil	Eugenol	21.4	Costa et al. 2005
	NI	NI	Eugenol	62.3	Barbosa et al. 2012a

Cont.

Continuation Table 1

Famlily and Species	Part Used	Plant Origin	Major Constituents	LC ₅₀ (mg/l)	Reference
Pinaceae					
<i>Pinus caribaea</i> Morelet	Leaves	Cuba	NI	51	Leyva et al. 2009b
<i>Pinus longifolia</i> Salisb.	NI	India	K-terpineole	82.1	Ansari et al. 2005
<i>Pinus tropicalis</i> Morelet	Leaves	Cuba	NI	42	Leyva et al. 2009b
<i>Pinus</i> sp. L. (Turpentine)	Resin	Argentina	α -pinene and β -pinene	14.7	Lucia et al. 2007
Piperaceae					
<i>Piper aduncum</i> L.	NI	Cuba	Dillapiole	57	Leyva et al. 2009a
	Aerial	Brazilian Amazon	Dillapiole	54.5	Almeida et al. 2009
<i>Piper auritum</i> Kunth.	Leaves	Cuba	Safrrole	17	Leyva et al. 2009a
<i>Piper betle</i> L.	NI	Indonesia	Citronellal	13.1	Wahyuni 2012
<i>Piper hostmanianum</i> (Miq.) C. DC.	Leaves	Brazilian Amazon	Asaricin and myristicin	54	Morais et al. 2007
<i>Piper klotzschianum</i> (Kunth) C. DC.	Seeds	Southeast of Brazil	1-butyl-3,4-methylenedioxybenzene, limonene, and α -phellandrene	13.27	Nascimento et al. 2013
	Root	Southeast of Brazil	1-butyl-3,4-methylenedioxybenzene	10.0	Nascimento et al. 2013
<i>Piper marginatum</i> Jacq.	Leaves	Northeast of Brazil	Isoelemecin and apiole	8.29	Costa et al. 2010a
	Leaves	Northeast of Brazil	(Z)-asarone	23.8	Autran et al. 2009
	Stem	Northeast of Brazil	(E)-asarone	19.9	Autran et al. 2009
	Inflorescence	Northeast of Brazil	Patchouli alcohol and (E)-asarone	19.9	Autran et al. 2009
<i>Piper nigrum</i> L.	Seeds	Ethiopia	NI	9	Massebo et al. 2009
	Seeds	Sri Lanka	(E)-caryophyllene and caryophyllene oxide	50	Amer and Mehlhorn 2006
<i>Piper permucronatum</i> Yunk.	Leaves	Brazilian Amazon	Dillapiole and myristicin	36	Morais et al. 2007
Poaceae					
<i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) Stapf	Leaves	Northeast of Brazil	Geranial	69	Cavalcanti et al. 2004
<i>Cymbopogon winterianus</i> Jowitt ex Bor	Leaves	Northeast of Brazil	NI	98	Mendonça et al. 2005
<i>Vetiveria zizanioides</i> (L.) Nash	Root	Bolivia	NI	31.5	Chantraine et al. 1998
Ranunculaceae					
<i>Nigella sativa</i> L.	Leaves	Ethiopia	NI	32	Massebo et al. 2009
Rutaceae					
<i>Amyris balsamifera</i> L.	Wood	Haiti	NI	1	Amer and Mehlhorn 2006
	Wood	Haiti	Elemol and eudesmol	52	Zhu et al. 2006
<i>Chloroxylon swietenia</i> DC.	Leaves	India	Geijerene	16.5	Kiran et al. 2006
	Stems	India	Geijerene and limonene	20.2	Kiran et al. 2006
<i>Citrus bergamia</i> Risso	Fruit peels	South Korea	NI	NI*	Lee 2006
<i>Citrus limon</i> (L.) Osbeck	Fruit peels	Italy	NI	10	Amer and Mehlhorn 2006

Cont.

Continuation Table 1

Familly and Species	Part Used	Plant Origin	Major Constituents	LC ₅₀ (mg/l)	Reference
Rutaceae					
<i>Clausena excavata</i> Burm. f.	Leaves	Taiwan	Safrole and terpinolene	37.1	Cheng et al. 2009a
	Twigs	Taiwan	Safrole	40.1	Cheng et al. 2009a
<i>Feronia limonia</i> (L.) Swingle	Leaves	India	Estragole and β -pinene	11.59	Senthilkumar et al. 2013
<i>Zanthoxylum armatum</i> DC.	Seeds	New Delhi, India	Linalool	54	Tiwary et al. 2007
<i>Zanthoxylum limonella</i> Alston	Fruits	Thailand	(R)-(+)-limonene	24.6	Pitasawat et al. 2007
Santalaceae					
<i>Santalum album</i> L.	Wood	India	Guaiol, elemol and eudesmol	10	Amer and Mehlhorn 2006
Scrophulariaceae					
<i>Capraria biflora</i> L.	Leaves	Northeast of Brazil	α -humulene	73.39	Souza et al. 2012a
<i>Stemodia maritima</i> L.	Stem	Northeast of Brazil	β -caryophyllene and caryophyllene oxide	22.9	Arriaga et al. 2007
	Leaves		β -caryophyllene	55.4	Arriaga et al. 2007
Verbenaceae					
<i>Lantana camara</i> L.	Leaves	Northeast of Brazil	Bicyclogermacrene and (<i>E</i>)-caryophyllene	42.3	Costa et al. 2010b
<i>Lippia adoensis</i> Hochst.	Leaves	Ethiopia	NI	47	Massebo et al. 2009
<i>Lippia citriodora</i> Kunth.	NI	France	NI	100	Amer and Mehlhorn 2006
<i>Lippia gracilis</i> Schauer	Leaves	Northeast of Brazil	Carvacrol	26	Santiago et al. 2006
	Leaves	Northeast of Brazil	Carvacrol	98	Silva et al. 2008
<i>Lippia sidoides</i> Cham.	Leaves	Northeast of Brazil	Thymol	19.5	Costa et al. 2005
	Leaves	Northeast of Brazil	Thymol	56	Morais et al. 2006
	Leaves	Northeast of Brazil	Thymol	63	Cavalcanti et al. 2004
Zingiberaceae					
<i>Alpinia purpurata</i> (Viell.) K. Schum.	Red flower	Northeast of Brazil	β -caryophyllene and β -pinene	80.7	Santos et al. 2012
	Pink flower	Northeast of Brazil	β -pinene and β -caryophyllene	71.5	Santos et al. 2012
<i>Curcuma aromatica</i> Salisb.	Rhizomes	Thailand	1H-3a,7-methanoazulene and curcumene	36.3	Choochote et al. 2005
<i>Curcuma domestica</i> Valetton	Rhizomes	Malaysia	NI	20.9	Jantan et al. 2003
<i>Curcuma longa</i> L.	Rhizomes	Cuba	Turmerone, curcumene, and zingiberene	25	Leyva et al. 2008
<i>Curcuma xanthorrhiza</i> Roxb.	Rhizomes	Malaysia	NI	74.2	Jantan et al. 2003
<i>Curcuma zedoaria</i> Roxb.	Rhizomes	Thailand	1,8-cineol and <i>p</i> -cymene	31.87	Pitasawat et al. 2007
<i>Zingiber officinale</i> Roscoe	Rhizome	India	NI	100	Prajapati et al. 2005

NI Information is not available.

* Results expressed as percentage of larval mortality

Table 2. Plant essential oils that have been considered not active ($LC_{50} > 100$ mg/l) against *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) larvae, according to the criterion established by Cheng et al. (2003)

Family and Species	Part Used	Plant Origin	Major Constituents	LC_{50} (mg/l)	Reference
Amaranthaceae					
<i>Achyranthes aspera</i> L.	Leaves	India	NI	761	Khandagle et al. 2011
	Stems	India	NI	668	Khandagle et al. 2011
Anacardiaceae					
<i>Schinus terebenthifolia</i> Raddi	Fruits	Southeast of Brazil	δ -3-carene	117.34	Silva et al. 2010
Annonaceae					
<i>Rollinia leptopetala</i> R.E. Fr.	Leaves	Northeast of Brazil	Linalool and 1,8-cineol	104.7	Feitosa et al. 2009
Apiaceae					
<i>Cuminum cyminum</i> L.	Seed	India	NI	>150	Prajapati et al. 2005
Asteraceae					
<i>Ageratum conyzoides</i> L.	Leaves	Northeast of Brazil	NI	148	Mendonça et al. 2005
<i>Artemisia abrotanum</i> L.	NI	Cuba	NI	193	Leyva et al. 2008
Cupressaceae					
<i>Calocedrus formosana</i> (Florin) Florin	Sapwood	Taiwan	NI	104.8	Cheng et al. 2003
<i>Cunninghamia lanceolata</i> (Lamb.) Hook.	Heartwood	Taiwan	NI	106.4	Cheng et al. 2003
	Sapwood	Taiwan	NI	172.2	Cheng et al. 2003
<i>Taiwania cryptomerioides</i> Hayata	Sapwood	Taiwan	NI	240	Cheng et al. 2003
Cyperaceae					
<i>Cyperus scariosus</i> R. Br.	Flower	India	NI	>250	Prajapati et al. 2005
Euphorbiaceae					
<i>Croton argyrophylloides</i> Müll. Arg.	Leaves	Northeast of Brazil	α -pinene	102	Morais et al. 2006
<i>Croton heliotropiifolius</i> Kunth	Leaves	Northeast of Brazil	β -caryophyllene	550.68	Silva 2006
<i>Croton pulegioides</i> Baill.	Leaves	Northeast of Brazil	β -caryophyllene	158.81	Silva 2006
<i>Croton sonderianus</i> Müll. Arg.	Leaves	Northeast of Brazil	β -phelandrene and β -trans-guaiene	104	Morais et al. 2006
Fabaceae					
<i>Pterodon polygalaeiflorus</i> Benth.	Dried fruits	Northeast of Brazil	β -caryophyllene	134.9	Pimenta et al. 2006
Lamiaceae					
<i>Hyptis fruticosa</i> Salzm. Ex Benth.	Leaves	Northeast of Brazil	1,8-cineol	502.68	Silva 2006
<i>Hyptis pectinata</i> (L.) Poit.	Leaves	Northeast of Brazil	β -caryophyllene and caryophyllene oxide	366.35	Silva 2006
<i>Hyptis suaveolens</i> (L.) Poit.	Leaves and branches	Northeast of Brazil	1,8-cineol and trans-caryophyllene	261	Cavalcanti et al. 2004
<i>Mentha piperita</i> L.	Leaves	India	Menthol	111.9	Kumar et al. 2011
<i>Ocimum basilicum</i> L.	Leaves	India	NI	200	Prajapati et al. 2005

Cont.

Continuation Table 2

Family and Species	Part Used	Plant Origin	Major Constituents	LC ₅₀ (mg/l)	Reference
Lamiaceae					
<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	Shoot	India	NI	250	Prajapati et al. 2005
	NI	NI	NI	> 500	Waliwitiya et al. 2009
Lauraceae					
<i>Aniba duckei</i> Kosterm.	Leaves	Brazilian Amazon	Linalool	250.61	Teles 2009
<i>Cinnamomum cordatum</i> Kosterm.	Leaves	Malaysia	Linalool and methyl cinnamate	183.6	Jantan et al. 2005
<i>Cinnamomum osmophleum</i> Kaneh.	Leaves	Taiwan	T-cadinol and α -cadinol	108	Cheng et al. 2004
	Leaves	Taiwan	Camphor	115	Cheng et al. 2004
	Leaves	Taiwan	NI	120	Cheng et al. 2003
	Leaves	Taiwan	Linalool	177	Cheng et al. 2004
<i>Cinnamomum zeylanicum</i> Blume.	Bark	India	NI	> 150	Prajapati et al. 2005
<i>Guarea convergens</i> T.D. Penn.	Branches	Brazilian Amazon	α -santalene and α -copaene	145	Magalhães et al. 2010
<i>Guarea silvatica</i> C. DC.	Leaves	Brazilian Amazon	Caryophyllene oxide	117.8	Magalhães et al. 2010
	Branches	Brazilian Amazon	Spathulenol	273.6	Magalhães et al. 2010
Myrtaceae					
<i>Myrcia ovata</i> Cambess.	Leaves	Northeast of Brazil	Neral and geranial	192	Lima et al. 2011
<i>Syzygium jambolana</i> (Lam.) DC.	Leaves and branches	Northeast of Brazil	(Z)-ocimene and (E)-ocimene	433	Cavalcanti et al. 2004
Piperaceae					
<i>Piper gaudichaudianum</i> Kunth	Leaves	Brazilian Amazon	Viridiflorol and aromadendrene	121	Morais et al. 2007
<i>Piper humaytanum</i> Yunck.	Leaves	Brazilian Amazon	Caryophyllene oxide and β -selinene	156	Morais et al. 2007
Rutaceae					
<i>Clausena anisata</i> (Willd.) Hook. f. ex Benth	Leaves	India	β -pinene and sabinene	130.19	Govindarajan 2010
<i>Clausena dentata</i> (Willd.) Roem.	Leaves	India	Sabinene, biofloratriene, and borneol	140.2	Rajkumar and Jebanesan 2010
<i>Citrus limonia</i> (L.) Osbeck	Fruit peels	Northeast of Brazil	Limonene	519	Cavalcanti et al. 2004
<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck	Fruit peels	Northeast of Brazil	Limonene	538	Cavalcanti et al. 2004
Verbenaceae					
<i>Lantana montevidensis</i> (Spreng.) Briq.	Leaves	Northeast of Brazil	(Z)-caryophyllene and valencene	117	Costa et al. 2010
Zingiberaceae					
<i>Alpinia zerumbet</i> (Pers.) B.L. Burt & R.M. Sm.	Leaves and branches	Northeast of Brazil	1,8-cineol and terpinen-4-ol	313	Cavalcanti et al. 2004
<i>Boesenbergia pandurata</i> (Roxb.) Schltr.	Rhizome	Malaysia	NI	149.2	Jantan et al. 2003
<i>Curcuma aeruginosa</i> Roxb.	Rhizome	Malaysia	NI	103.1	Jantan et al. 2003
<i>Hedychium bousigonianum</i> Pierre ex Gagnep.	Rhizome	USA	1,8-cineol and β -pinene	NI*	Sakhanokho et al. 2013
<i>Hedychium elatum</i> Horan.	Rhizome	USA	β -pinene and linalool	NI*	Sakhanokho et al. 2013

Cont.

Continuation Table 2

Family and Species	Part Used	Plant Origin	Major Constituents	LC ₅₀ (mg/l)	Reference
Zingiberaceae					
<i>Hedychium flavescens</i> Carey ex Roscoe	Rhizome	USA	Linalool and β -pinene	NI*	Sakhanokho et al. 2013
<i>Hedychium flavum</i> Roxb.	Rhizome	USA	1,8-cineol and β -pinene	NI*	Sakhanokho et al. 2013
<i>Hedychium forrestii</i> Diels	Rhizome	USA	Linalool	NI*	Sakhanokho et al. 2013
<i>Hedychium thyrsiforme</i> Sm.	Rhizome	USA	1,8-cineol and β -pinene	NI*	Sakhanokho et al. 2013
<i>Zingiber officinalis</i> Roscoe	Rhizome	Malaysia	NI	197.2	Jantan et al. 2003
	Rhizome	India	NI	154	Khandagle et al. 2011
<i>Zingiber zerumbet</i> (L.) Roscoe ex Sm.	Rhizome	Malaysia	NI	102.6	Jantan et al. 2003

NI Information is not available.

* Results expressed as percentage of larval mortality

Table 3. Metabolites from essential oils that have been considered active (LC₅₀ < 100 mg/l) against *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) larvae, according to the criterion established by Cheng et al. (2003)

Classes	Constituents	LC ₅₀ (mg/l)	Reference
Monoterpene hydrocarbons	Δ^3 -carene	25.3	Cheng et al.2009a
		19.2	Perumalsamy et al. 2009
		60	Kim et al. 2008
	(-)-camphene <i>p</i> -cymene	67	Perumalsamy et al. 2009
		19.2	Cheng et al. 2009b
		37.1	Cheng et al. 2009c
		43.3	Cheng et al. 2009a
		51	Santos et al. 2010
	Fenchene	69.3	Perumalsamy et al. 2009
	Limonene	18.1	Cheng et al. 2009b
		19.4	Cheng et al. 2009a
		12.01	Govindarajan et al. 2012
	R-(+)-limonene	27	Santos et al. 2011
		24.47	Perumalsamy et al. 2009
		37	Silva et al. 2008
	S-(-)-limonene	30	Santos et al. 2011
		27.9	Cheng et al. 2009a
	β -myrcene	35.8	Cheng et al. 2009c
		66.42	Perumalsamy et al. 2009
		16.6	Cheng et al. 2009b
	α -phellandrene	23.1	Perumalsamy et al. 2009
		15.4	Lucia et al. 2007
	α -pinene	79.1	Cheng et al. 2009c
		50.92	Perumalsamy et al. 2009
	(+)– α -pinene	74.3	Simas et al. 2004
		64.80	Perumalsamy et al. 2009
	(-)- α -pinene	27	Govindarajan 2010
		12.1	Lucia et al. 2007
	(+)– β -pinene	22.39	Perumalsamy et al. 2009
		42.5	Simas et al. 2004
	(-)- β -pinene	15.40	Perumalsamy et al. 2009
		21	Govindarajan 2010
	Sabinene	27.3	Rajkumar and Jebanesan 2010
		14.7	Cheng et al. 2009b
	α -terpinene	28.1	Cheng et al. 2009c
		17.1	Perumalsamy et al. 2009
	γ -terpinene	26.8	Cheng et al. 2009a; 2009b
		30.7	Cheng et al. 2009c
	Terpinolene	56	Santos et al. 2011
		95	Silva et al. 2008
		28.4	Cheng et al. 2009c
		32.1	Cheng et al. 2009a; 2009b
		15.3	Perumalsamy et al. 2009
Oxygenated monoterpenes	Ascaridole	9.6	Torres et al. 2008
	Borneol	43.5	Rajkumar and Jebanesan 2010
		94.9	Perumalsamy et al. 2009
	Camphene	67.02	Perumalsamy et al. 2009
	Carvacrol	58.9	Lima et al. 2011
		69	Santos et al. 2010
		70	Silva et al. 2008
	<i>cis</i> -carveol	32.88	Govindarajan et al. 2012

Cont.

Continuation Table 3

Classes	Constituents	LC ₅₀ (mg/l)	Reference
Oxygenated monoterpenes	RS-carvone	23.69	Govindarajan et al. 2012
		118	Santos et al. 2011
	R-(-)-carvone	152	Santos et al. 2011
		43.8	Simas et al. 2004
	S-(+)-carvone	124	Santos et al. 2011
	1,8-cineol	48	Lima et al. 2011
		57	Lucia et al. 2007
		75	Perumalsamy et al. 2009
	Citronellol	49.9	Ali et al. 2013
	Geraniol	49.3	Ali et al. 2013
		69	Santos et al. 2010
		70	Silva et al. 2008
		81.6	Simas et al. 2004
	Geranyl formate	58.5	Ali et al. 2013
	Linalool	38.64	Govindarajan 2010
		96.6	Perumalsamy et al. 2009
	Pulegone	39.6	Waliwitiya et al. 2009
	Terpinen-4-ol	64.76	Perumalsamy et al. 2009
	Thymol	53.5	Waliwitiya et al. 2009
		79	Silva et al. 2008
		81	Santos et al. 2010
	3,5-dimethoxytoluene	64.05	Perumalsamy et al. 2009
	3,4,5-trimethoxytoluene	67.13	Perumalsamy et al. 2009
	Verbenone	93.16	Perumalsamy et al. 2009
Sesquiterpene hydrocarbons	Germacrene D	18	Govindarajan 2010
		63	Kiran et al. 2006
	Geijerene	43	Kiran et al. 2006
Oxygenated Sesquiterpenes	β-caryophyllene	88.3	Perumalsamy et al. 2009
	β-bisabolol	33.2	Rajkumar and Jebanesan 2010
	(E),(E)-farnesol	13	Simas et al. 2004
	(E)-nerolidol	9.0	Chantraine et al. 1998
		13.4	Ali et al. 2013
		17.0	Simas et al. 2004
Diterpenes	16-kaurene	57	Cheng et al. 2009c
Phenylpropanoids	(E)-anethole	14.8	Chantraine et al. 1998
		42	Cheng et al. 2004
		67	Waliwitiya et al. 2009
		69.2	Santos et al. 2007
	(E)-asarone	27	Perumalsamy et al. 2010
	(Z)-asarone	16**	Ciccia et al. 2000
	Benzyl benzoate	6.8	Jantan et al. 2005
	Benzyl salicylate	6.8	Jantan et al. 2005
	(E)-cinnamaldehyde	24.4	Simas et al. 2004
		29	Cheng et al. 2004
		51.3	Kim et al. 2008
	Cinnamyl acetate	33	Cheng et al. 2004
	Methyl cinnamate	16.8	Jantan et al. 2005
		26	Cheng et al. 2004
	Ethyl cinnamate	39.5	Kim et al. 2008
		33	Cheng et al. 2004
	Ethyl- <i>p</i> -methoxycinnamate	18.9	Kim et al. 2008
	<i>p</i> -methoxycinnamic acid	61	Kim et al. 2008

Cont.

Continuation Table 3

Classes	Constituents	LC ₅₀ (mg/l)	Reference
Phenylpropanoids	Eugenol	33	Cheng et al. 2004
		44.5	Simas et al. 2004
		82.8	Pandey et al. 2013
		88	Santos et al. 2010
		89.9	Jantan et al. 2005
	Methyleugenol	57.6	Perumalsamy et al. 2009, 2010
	Estragole	12.7	Govindarajan 2010
		46.4	Perumalsamy et al. 2009
	Myristicin	72.98	Perumalsamy et al. 2009
	Safrole	49	Simas et al. 2004
		32.1	Jantan et al. 2005
		9.88	Perumalsamy et al. 2009
	2,2-dimethyl-6-vinylchroman-4-one	NI*	Albuquerque et al. 2004

NI Information is not available.

* Results expressed as percentage of larval mortality

** Result expressed as LC₉₀ (mg/l)

Table 4. Metabolites from essential oils that have been considered not active (LC₅₀ > 100 mg/l) against *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) larvae, according to the criterion established by Cheng et al. (2003)

Classes	Constituents	LC ₅₀ (mg/l)	Reference
Monoterpene hydrocarbons	3-carene	150	Santos et al. 2011
	Myrcene	> 500	Waliwitiya et al. 2009
	α -pinene	> 500	Waliwitiya et al. 2009
	β -pinene	> 500	Waliwitiya et al. 2009
Oxygenated monoterpenes	(+)-borneol	> 100	Kim et al. 2008
	(-)-borneol	> 100	Kim et al. 2008
	Borneol	610	Santos et al. 2010
	Borneol acetate	> 500	Waliwitiya et al. 2009
	Isoborneol	598	Santos et al. 2010
	(-)-camphene	> 100	Kim et al. 2008
		220	Santos et al. 2010
	(+)-camphene	406	Santos et al. 2010
	Camphor	271.5	Jantan et al. 2005
		> 500	Waliwitiya et al. 2009
		657	Santos et al. 2010
	1,4-cineol	751	Santos et al. 2010
	1,8-cineol	> 100	Kim et al. 2008
		642.4	Jantan et al. 2005
		1381	Silva et al. 2008
		1419	Santos et al. 2010
	Citronellal	174	Waliwitiya et al. 2009
		> 100	Simas et al. 2004
	Citronellyl formate	> 100	Ali et al. 2013
	Eucarvone	130.35	Perumalsamy et al. 2009
	Geranic acid	> 100	Ali et al. 2013
	Geraniol	415	Pandey et al. 2013
	Limonene oxide	517	Santos et al. 2011
	Linalool	>100	Simas et al. 2004; Ali et al. 2013
		157.4	Jantan et al. 2005
		242.6	Pandey et al. 2013
		> 500	Waliwitiya et al. 2009
	Menthol	> 100	Simas et al. 2004
		365.8	Pandey et al. 2013
		404	Santos et al. 2011
	Menthone	508	Santos et al. 2011
	Isomenthone	NI	Ali et al. 2013
	Isopulegol	297	Santos et al. 2011
	Neoisopulegol	554	Santos et al. 2011
	Terpineol	331.7	Pandey et al. 2013
	α -terpineol	111.78	Perumalsamy et al. 2009
	(+)- α -terpineol	> 100	Kim et al. 2008
	(-)- α -terpineol	> 100	Kim et al. 2008
	(-)-terpinen-4-ol	> 100	Cheng et al. 2009c
Sesquiterpene hydrocarbons	β -caryophyllene	1202	Silva et al. 2008
Oxygenated Sesquiterpenes	Caryophyllene oxide	125	Silva et al. 2008
	Elemol	> 100	Cheng et al. 2009c
	β -eudesmol	> 100	Cheng et al. 2009c
Phenylpropanoids	Bornyl Acetate	> 500	Waliwitiya et al. 2009
	Eugenol	142.9	Waliwitiya et al. 2009
	Methyleugenol	350.9	Jantan et al. 2005

NI Information is not available.

Factors affecting the larvicidal activity of essential oils and their compounds

The toxic potential of essential oils and their compounds against *A. aegypti* larvae may vary significantly according to intrinsic and extrinsic factors. Plant species, plant parts, age of the plant, chemotypes, and geographic conditions (such as season, rainfall, humidity percentage, temperature, sunlight, and altitude) in which the plant was collected, larval source, and methods used, in general, induce different responses on the larvae (Morais 2009; Barbosa et al. 2012b).

Cheng et al. (2003) related quite different results for the essential oils from heartwood, bark, leaves, and sapwood of *Calocedrus formosana* (Florin) Florin. Similar results were observed in the same study for heartwood and sapwood oil of *Taiwania cryptomerioides* Hayata; the first plant part provided an essential oil that was active against *A. aegypti* larvae (LC₅₀ 79.8 mg/l) and the second one provided inactive oil (LC₅₀ 240 mg/l).

Arriaga et al. (2007) revealed that the essential oil from stem of *Stemodia maritima* L. showed LC₅₀ of 22.9 mg/l, whereas the leaf essential oil from this species was less active (LC₅₀ 55.4 mg/l). The essential oil from *Rollinia leptopetala* R.E. Fr. stem (LC₅₀ 34.7 mg/l) was also more active than that from its leaves (LC₅₀ 104.7 mg/l) (Feitosa et al. 2009). These results can be explained by the differences on the chemical composition of essential oils from these plant parts.

Cheng et al. (2009c) compared the larvicidal potential of leaf essential oils from *Cryptomeria japonica* at different ages (58, 42, and 26 years old). Although the percentage of the two major compounds (16-kaurene and elemol) in the oils have not been changed significantly among the three samples, their toxicity against *A. aegypti* larvae varied; the 58-years old tree was most active, showing a LC₅₀ of 28.4 mg/l, than the 42-years old (LC₅₀ 39.2 mg/l) and the 26-years old tree (LC₅₀ 56.7 mg/l). These results indicated that essential oils obtained from tree with different ages have significant influence on *A. aegypti* larvicidal activity.

Five chemotypes of indigenous *Cinnamomum osmophloeum* Kaneh. showed different larvicidal potential; the linalool type, camphor type, and mixed type (T-cadinol and α -cadinol) were considered inactive (LC₅₀ > 100 mg/l), whereas the cinnamaldehyde type, cinnamaldehyde/cinnamyl acetate type were highly active (LC₅₀ < 50 mg/l) (Cheng et al. 2004).

Additionally, the different ecological niche of mosquito larvae can influence on their susceptibility to toxic compounds. There is the hypothesis that the field collected larvae are more resistant to chemicals than those reared in laboratory, because the first ones are better adapted to adjust to environmental variations and have a higher genetic variability (George and Vincent 2005; Sun et al. 2006). Simas et al. (2004) tested (*R*)-(-)-carvone against larvae reared in laboratory for more than ten years and showed a good potential of this compound (LC₅₀ 43.8 mg/l); however (*R*)-(-)-carvone was not active (LC₅₀ 158 mg/l) when tested against larvae collected in field where it is known that has larvae strain resistant to temephos (Santos et al. 2011).

Barbosa et al. (2012a) tested some compounds and *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. essential oil against field collected strain which is resistant to temephos and also tested against Rockefeller strain, susceptible to temephos. It was possible to observe different results for both strains, such as in case of eugenol which exhibited LC₅₀ values of 93 and 71 mg/l on field collected and Rockefeller larvae, respectively. However, the results against both strains did not show statistically significant difference. This indicates that *S. aromaticum* essential oil and the analyzed compounds as eugenol do not exhibit cross-resistance with temephos.

Another factor that can change the potential of compounds is the larval instar. There are four mosquito larval stages (Consoli and Oliveira 1994). Waliwitiya et al. (2009), investigating the toxicity of several monoterpenes, *trans*-anethole and *Rosmarinus officinalis* L. essential oil against *A. aegypti* larvae of first to fourth instars, observed that the activity of the samples decreased according to larval growth. During larval growth, the larvae acquire higher capacity of detoxification and development alterations in cuticle thickness. These larval features may contribute to decrease compounds potential.

Different methodologies and analysis used in the experiments can also lead to contradictory results (Santos et al. 2010; Barbosa et al. 2012a). For example, methyleugenol was active (LC₅₀ 57.6 mg/l) when tested by Perumalsamy et al. (2010) and inactive (LC₅₀ 350.9 mg/l) when tested by Jantan et al. (2005). Silva et al. (2008) showed that LC₅₀ value of β -caryophyllene was 1202 mg/L, whereas for Perumalsamy et al. (2009) this value was 88.3 mg/l. Other compounds, as 1,8-cineol, α -pinene, β -pinene, (-)-camphene, and linalool, showed different potential against *A. aegypti* larvae,

when tested by different authors, probably due to differences in the methodology performed to achieve the larvicidal activity (Table 3 and 4).

According to Lahlou (2004a), the biological tests results are dependent of laboratory conditions (temperature, photoperiod), materials, and models used for the experimentation. Standardization of the testing procedures is desirable in order to provide data from scientific researches carried out in different laboratories and institutions that can be compared and utilized by national authorities (WHO 2005).

Structure–activity relationships of essential oils compounds

The relation between larvicidal effect and essential oil chemical composition is difficult to be determined, because the interactions among the compounds may influence the activity of the mixture. Thus, some authors have identified chemical structural characteristics on major compounds of essential oils which may contribute to the understanding on larvicidal effect (Santos et al. 2010, 2011; Barbosa et al. 2012a).

The lipophilicity plays a key role in modulating the larvicidal activity; the association between lipophilic compounds and protein deactivation/enzyme inhibition can be a reasonable explanation for this fact (Ryan and Byrne 1988). We will show below in more detail the important structural characteristics for effective larvicidal activity of monoterpenes, sesquiterpenes and phenylpropanoids, and their derivatives.

Phenol (**1**) exhibited LC₅₀ value of 194 mg/l for *A. aegypti* larvae, whereas compounds that have lipophilic groups as CH chain outside the ring of phenol such as thymol (**2**) (LC₅₀ 81 mg/l) and carvacrol (**3**) (LC₅₀ 69 mg/l) showed larvicidal activity higher than phenol (Santos et al. 2010).

The double bonds are important in the larvicidal activity of natural molecules, because hydrogenation of them decreases the lipophilic character of these compounds, restricting their passage through the larvae cuticle (Lomonaco et al. 2009). It is interesting to note the importance of exocyclic double bonds, for instance, in the comparison between α -pinene (**4**) and β -pinene (**5**). According to Simas et al. (2004), Lucia et al. (2007), and Peumalsamy et al. (2009), β -pinene, that possesses exocyclic double bond, is more toxic to *A. aegypti* larvae than α -pinene which has endocyclic double bond (Table 2). Similar data were found by Santos et al. (2011) who showed that LC₅₀ value of R-limonene (**6**) (with endo and exocyclic double bonds) was 27 mg/l;

whereas for γ -terpinene (**8**), compound in which exhibits two endocyclic double bond, the LC₅₀ was 56 mg/l to larvicide action.

The phenylpropanoids benzyl benzoate and benzyl salicylate were the most active compounds; this high larvicidal potential can be contributed by the higher number of conjugated double bonds in the aromatic ring. In general, aromatic molecules are more toxic to *A. aegypti* larvae than aliphatic ones. The electronic density and aromatic ring planarity seems to influence the potentiality of these substances (Santos et al. 2010).

Following the same sight, a high number of hydroxyl groups decrease potency. López et al. (2005) reported that this structural characteristic prevents molecule penetration through mosquito cuticle then it does not reach its specific targets. Although carvacrol (**3**) and thymol (**4**) have conjugated double bonds in their aromatic rings they also have a hydroxyl group each one, thus they do not exhibited high larvicidal active against *A. aegypti* (Santos et al. 2010). The same chemical structure, but without the hydroxyl group, represented by *p*-cymene (**9**) was more potent to this action (LC₅₀ 51 mg/l).

Barbosa et al. (2012a) evaluated structure–activity relationships of derivatives of eugenol (**10**). The lowest potency was observed for the compound in which the double bond on the side chain was removed to add a hydroxyl (**11**) (LC₅₀ 1415.1 mg/l). Among the derivatives, the one which was more potent than eugenol (LC₅₀ 93.3 mg/l) was 1-ethoxy-2-methoxy-4-(2-propen-1-yl)-benzene (**12**) (LC₅₀ 67.2 mg/l). This compound is different of eugenol, because the phenolic proton of eugenol was removed and then added an ethyl group.

In general, the acetylation of the hydroxyl group in oxygenated monoterpenes increases the activity of them; e. g. eugenyl acetate (LC₅₀ 50.2 mg/l) was more potent than eugenol (LC₅₀ 82.8 mg/l). Some structural features, such as shape, degree of unsaturation, and functional groups influence on the larvicidal activity (Pandey et al. 2013).

A compound having an aliphatic aldehyde conjugated with an aromatic ring is quite potent. This fact is reinforced by comparing the larvicidal activity of (*E*)-cinnamaldehyde (**13**) (LC₅₀ 24.4 mg/l) with that of citronellal (**14**) which is not aromatic and was inactive for larvae of *A. aegypti* (Simas et al. 2004). The studies by Cheng (2004) and Santos et al. (2010) have also confirmed this data. The first study showed

that the LC₅₀ of benzaldehyde (**15**) after 48 hours was 33 mg/l. The second study compared the bioactivity of phenol (**1**) (LC₅₀ 194 mg/l) and salicylaldehyde (**16**) (LC₅₀ 136 mg/l).

Some essential oils compounds have stereoisomers. The chiral compounds are recognized by receptors and enzymes in different ways. This influences their mode of action and lead to different biological potential (Lahlou 2004b). In table 2 we show different larvicidal potential for α -pinene and β -pinene enantiomers. In addition, the larvicidal potential of enantiomers (*S*)-(+)-carvone (**17**) (LC₅₀ 124 mg/l) and (*R*)-(-)-carvone (**18**) (LC₅₀ 152 mg/l); (+)-camphene (**19**) (LC₅₀ 406 mg/l) and (-)-camphene (**20**) (LC₅₀ 220 mg/l) were significantly different. In contrast, (*R*)-(+)-limonene (**6**) (LC₅₀ 27 mg/l) and (*S*)-(-)-limonene (**7**) (LC₅₀ 30 mg/l) exhibited similar potential profiles (Santos et al. 2010, 2011).

According to Santos et al. (2011), neoisopulegol (**21**) exhibited a LC₅₀ value of 554 mg/l. It was less potent than its diastereoisomer isopulegol (**22**) (LC₅₀ 297 mg/l). However, this difference was not observed between borneol (**23**) (LC₅₀ 610 mg/l) and isoborneol (**24**) (LC₅₀ 598 mg/l) (Santos et al. 2010).

The evaluation of structure-eactivity relationships of larvicidal compounds may contribute to the search for further compounds with similarly high or even higher activity. This knowledge may indicate synthesis pathways for the production of insecticides more effective and less toxic and, in addition, can promote the understanding of the mode of action of these larvicidal compounds.

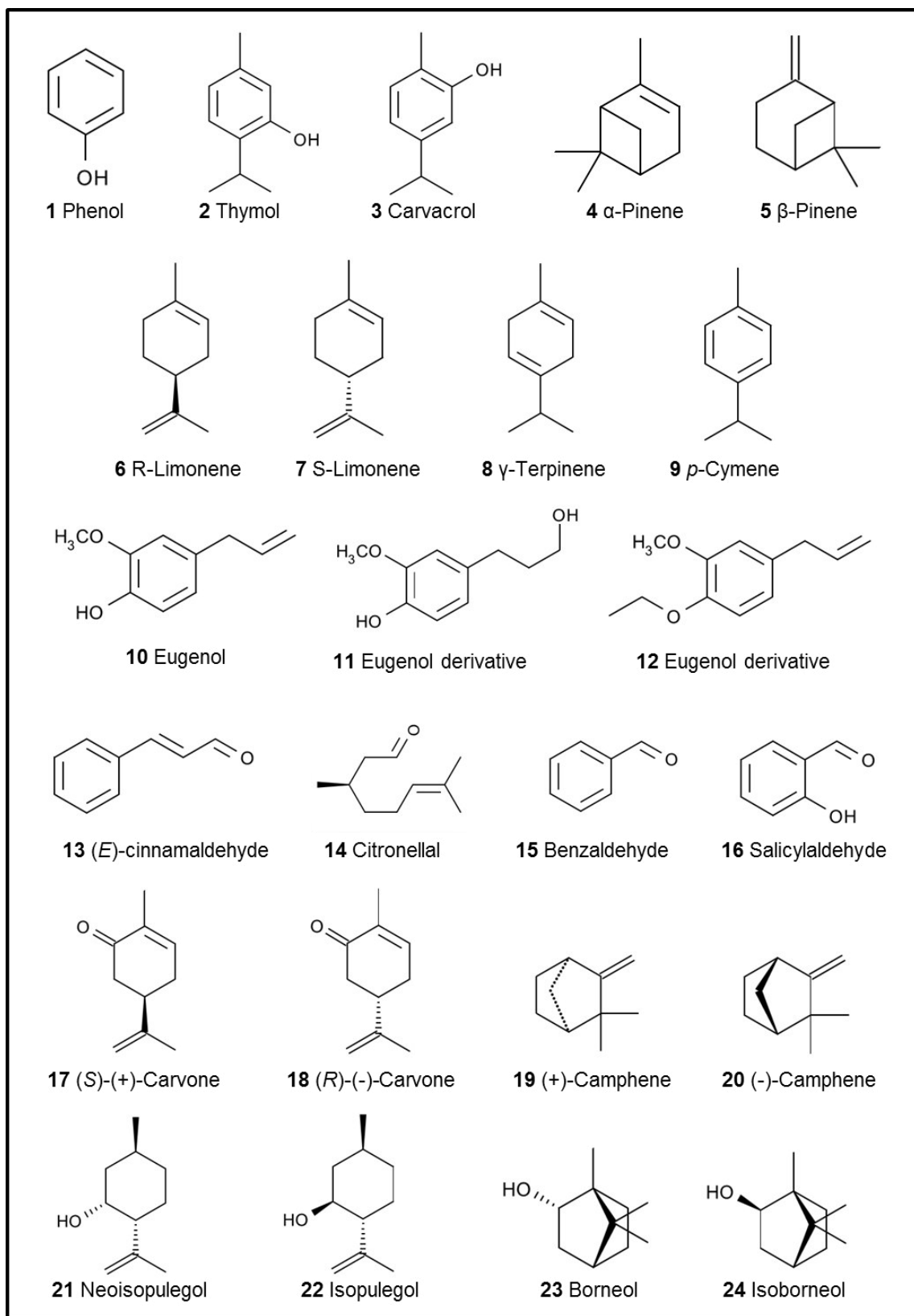


Fig. 1 Chemical structures of compounds that were studied for their larvicidal activity against *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae)

Mode of action

Few studies have been conducted on determining the larvicidal mechanisms of action of essential oils and their compounds against *A. aegypti* larvae. Essential oils are complex mixture of chemical compounds. Hence several mechanisms of toxicity on insects could be involved. Protein denaturalization, enzymatic inhibition and membrane disintegration are some of the suggested modes (Regnault-Roger 1997; Cavalca et al. 2010).

Insecticides can affect the insects by various modes of action. They may be ingested and absorbed through the digestive tract. The respiratory system and the body may be the target by fumigants, suffocants, and desiccants actions. Some compounds may act as hormones inhibiting the growth and development of the insect (Hemingway and Ranson 2005).

According to Cantrell et al. (2010), larvicide compounds act by absorption through the cuticle, via the respiratory tract, and/or enter by ingestion via the gastrointestinal. Then in the interior of the larva the substances can reach the site of action or can cause systemic effects by diffusion in different tissues (Souza et al. 2012b).

In addition, the lipophilicity of the essential oils constituents enables disruption and penetration through the lipoprotein matrix of the insect cell membrane (Satyan et al. 2009). Franzios et al. (1997) indicate that many of essential oils deter insects feeding, while some others are insect growth regulators through analogs or antagonistic effects to the endogenous hormones.

Some authors suggest that the rapid effect on some natural larvicides is an indicative of their neurotoxic mode of action. The symptoms of most larvae treated with essential oils are caused by toxicity on the neuromuscular system. These symptoms are excitation, convulsions, hyperactivity, hyperextension of the legs and abdomen, followed by paralysis (fast knock-down) and death (Enan 2001; Isman 2006). According to Kostyukovsky et al. (2002), these effects are similar to those produced by conventional insecticides as temephos which is an organophosphate cholinesterase inhibitor used in vector-borne disease control programmes (WHO 2009b).

Ryan and Byrne (1988) reported that five oxygenated monoterpenes were reversible competitive inhibitors of acetylcholinesterase (AChE) isolated from electric eels; this was evidenced by both *in vitro* and *in vivo* experiments. Nevertheless in the

studies of Kostyukovsky et al. (2002); López and Pascual-Villalobos (2010), natural terpenes, such as fenchone, γ -terpinene, geraniol, linalool, (*S*)-carvone, inhibited AChE from *Electrophorus electricus* L. (Gymnotiformes, Gymnotidae) and from *Rhizopertha dominica* F. (Coleoptera, Bostrichidae) only at high concentrations. This indicated that the AChE inhibition is not the main mode of action of these essential oils compounds.

Another potential target for the larvicidal activity of essential oil constituents is the octopaminergic system of insects. Octopamine is a biogenic monoamine that occurs in neuronal and non-neuronal tissues of invertebrates. This compound acts as a neurotransmitter, a neurohormone and a neuromodulator; its physiological role is analogous to that of norepinephrine in vertebrates, influencing many features of animal physiology and behavior, such as flight, energy metabolism regulation and heart-rate (Roeder 1999; Pflüger and Stevenson 2005). The octopamine receptors (ORs) are membrane bound receptors that belong to the family of G-protein coupled receptors (GPCRs). Generally, the interactions with ligands modulate effects via changes in intracellular calcium concentrations $[Ca^{2+}]_i$ and via activation or inhibition of adenylyl cyclase (Evans 1984).

Enan (2001) suggested that the toxicity of eugenol and α -terpineol to *Periplaneta americana* L. (Blattaria, Blattidae) (American cockroaches) has the octopaminergic system as a primary target; the involvement of octopamine/octopamine receptor is indicated by toxicity signs as acceleration of heartbeat, effects on cyclic adenosine monophosphate (cAMP) production in the nervous system, and a decrease in binding octopamine receptors. Kostyukovsky et al. (2002), by *in vitro* studies using abdominal segments from *Helicoverpa armigera* Hübn (Lepidoptera, Noctuidae), the cotton bollworm moth, as a source of ORs, indicated that the mode of action of two essential oil terpenes on insects was a competitive activation of ORs. Enan (2005) proposed that ORs mediates the toxicity of cinnamic alcohol, eugenol, (*E*)-anethol, and 2-phenylethyl propionate against *Drosophila melanogaster* Meigen (Diptera, Drosophilidae) and *P. americana*, by the cellular changes as receptor binding, cAMP production and $[Ca^{2+}]_i$ mobilization.

In a recent protein-ligand docking study, eugenol, geraniol, 1,8-cineol e carvacrol as well as octopamine and acetylcholine were allowed to dock against OR and acetylcholinesterase protein models of *Aedes aegypti* and *Homo sapiens*. The study aim was to predict and rank the association between the ligands and the targets proteins on

two animal systems. The compounds docked with all the protein models, although they performed better against the protein models of *A. aegypti* than the human's protein models (Khanikor et al. 2013).

Another receptor may be involved on the essential oils mode of action; the insecticidal activity of the oxygenated monoterpene thymol was mediated by interferences on ionotropic GABA receptors. In addition, thymol was more potent on a recombinant insect GABA receptor than on mammalian GABA_A receptors. However, it is not evidenced the thymol-binding site on the GABA receptor, because thymol did not acted via site of action on the investigated allosteric modulators, such as benzodiazepines, β -carbolines, barbiturates, propofol, loreclezole and steroids (Priestley et al. 2003).

All the aforementioned facts indicate that these compounds may be considered safe to humans. Further studies should be carried out aiming to confirm the mosquito larvicidal modes of action of essential oil constituents. With these data it will be possible to find pharmacophore models that are necessary for molecular recognition by the receptors. Thereby this can serve as a means to develop products more effective and less toxic to non-target organisms than the conventional larvicides used in vector-borne disease control programmes.

Besides this, essential oils are complex mixture of constituents and their larvicidal activity seems to have no specific site of action. So it is too difficult for the insect develop adaptation that lead to particular resistance to the mixture (Wahyuni 2012).

Patents

From the data cited in this paper, it could be noted the higher potential of essential oils and their compounds as *A. aegypti* larvicides. Thus, some patent applications were published, with the purpose to regulate the production of formulations for use against *A. aegypti* larvae in the field.

One of them proposed a mosquito larvicide formulation in which the active principles are d-limonene present in orange oil and ethyl lactate (WO2005034631A2). United States Patent application No. US3954991 also relates to use of limonene; but on

this patent, limonene is condensed with sesamol to produce two novel compounds which are highly effective in killing mosquito larvae.

Two monoterpenes widely found in essential oils, *p*-cymene and thymol, were incorporated into a formulation that can be used as a larvicide and adulticide against mosquitoes of the genus *Aedes* and *Anopheles* (US2009036547A1). The inventors reported that this composition is also useful against strains resistant to conventional insecticides. Japanese patent application No. 2000026210A includes spathulenol as an active ingredient of a formula insecticide to be used against *A. aegypti* and *C. pipiens pallens* L. (Diptera, Culicidae).

French patent application No. FR2958500 relates to a process for the preparation and use of an insecticide, insect repellent, ovicide, larvicide, and nymphicide composition. This composition comprises at least one essential oil or a mixture of them; these essential oils may be from *Eucalyptus globulus* Labill., *Juniperus communis* L., *Santalum album* L., *Mentha piperita* L., *Eugenia caryophyllata* Thunb., *Pinus sylvestris* L., *Rosmarinus officinalis* L., *Eucalyptus citriodora* Hook., *Annona squamosa* L., among others.

International publication No. WO2011/032892A1 describes a synergistic combination for use as ascaricide, insecticide, pupicide and/or larvicide that comprises at least two active compounds. One of them may be fatty alcohols, simple oils as well as essential oils of peppermint, tangerine, grapefruit, lemon and basil.

Although this review has shown the high potential of Brazilian plants, just one Brazilian patent was found in the database. The cited patent reports the use of essential oil from bracts of *Alpinia purpurata* (Viell.) K. Schum. as larvicide and deterrent against *A. aegypti* (BRPI0805711-7A2).

Conclusion

In the search for alternative larvicides to be used in vector-borne disease control programmes, plant essential oils have demonstrated to be more active than their individual compounds against *A. aegypti*. This highest bioactivity of essential oils shows us the importance of to produce a low cost larvicide without the need to isolate active compound, as this is an expensive process. For this, selection of chemical markers is essential for the quality control of herbal products.

These natural products have been widely investigated; however, a low number of patents applications were published with the purpose to regulate the production of formulations for use against *A. aegypti* larvae in the field. From this review, it was possible to observe the need for standardization of methodologies for evaluation of larvicides against *A. aegypti*.

The research regarding the search for new larvicides should be performed in standard form; the features from plants (collection, extraction, chemical constitution) and from insects (collection, age) and the methodological procedures must be well defined in research. We need to overcome the barriers to commercialization of new botanical insecticide. The natural products research lines need to conduct the studies with this aim, to produce plant-based larvicides to be used in public health programs.

References

- Aciole SDG (2009) Avaliação da atividade inseticida dos óleos essenciais das plantas amazônicas Annonaceae, Boraginaceae e de mata atlântica Myrtaceae como alternativa de controle às larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae). Dissertation, University of Lisbon
- Aciole SDG, Piccoli CF, Duquel JE, Costa EV, Navarro-Silva MA, Marques FA, Maia BLNS, Pinheiro MLB, Rebelo MT (2011) Insecticidal activity of three species of *Guatteria* (Annonaceae) against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Rev Colomb Entomol* 37:262–268
- Aguiar JCD, Santiago GMP, Lavor PL et al (2010) Chemical constituents and larvicidal activity of *Hymenaea courbaril* Fruit Peel. *Nat Prod Commun* 5:1977–1980
- Aguilera L, Navarro A, Tacoronte JE, Leyva M, Marquetti MC (2003) Efecto letal de myrtaceas cubanas sobre *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Rev Cuba Med Trop* 55:100–104
- Albuquerque MRJR, Silveira ER, Uchoa DEA (2004) Chemical composition and larvicidal activity of the essential oils from *Eupatorium betonicaeforme* (D.C.) Baker (Asteraceae). *J Agric Food Chem*. doi:10.1021/jf0352881
- Almeida RRP, Souto RNP, Bastos CN, Silva MHL, Maia JGS (2009) Chemical variation in *Piper aduncum* and biological properties of its dillapiole-rich essential oil. *Chem Biodivers*. doi:10.1002/cbdv.200800212
- Amaral FMM, Ribeiro MNS, Barbosa-Filho JM, Reis AS, Nascimento FRF, Macedo RO (2006) Plants and chemical constituents with giardicidal activity. *Bras J Pharmacogn* 16:696–720
- Amer A, Mehlhorn H (2006) Larvicidal effects of various essential oils against *Aedes*, *Anopheles*, and *Culex* larvae (Diptera, Culicidae). *Parasitol Res*. doi:10.1007/s00436-006-0182-3

- Ansari MA, Mittal PK, Razdan RK, Sreehari U (2005) Larvicidal and mosquito repellent activities of Pine (*Pinus longifolia*, Family: Pinaceae) oil. J Vector Borne Dis 42: 95–99
- Arriaga AMC, Rodrigues FEA, Lemos TLG, Oliveira MCF, Lima JQ, Santiago GMP, Braz-Filho R, Mafezoli J (2007) Composition and larvicidal activity of essential oil from *Stemodia maritima* L. Nat Prod Commun 2:1237–1239
- Autran ES, Neves IA, Silva CSB, Santos GKN, Câmara CAG, Navarro DMAF (2009) Chemical composition, oviposition deterrent and larvicidal activities against *Aedes aegypti* of essential oils from *Piper marginatum* Jacq. (Piperaceae). Bioresour Technol. doi:10.1016/j.biortech.2008.10.055
- Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M (2008) Biological effects of essential oils – a review. Food Chem Toxicol. doi:10.1016/j.fct.2007.09.106
- Barbosa JDF, Silva VB, Alves PB, Gumina G, Santos RLC, Sousa DP, Cavalcanti SCH (2012a) Structure–activity relationships of eugenol derivatives against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae. Pest Manag Sci. doi:10.1002/ps.3331
- Barbosa PCS, Medeiros RS, Sampaio PTB, Vieira G, Wiedemann LSM, Veiga-Junior VF (2012b) Influence of abiotic factors on the chemical composition of Copaiba Oil (*Copaifera multijuga* Hayne): soil composition, seasonality and diameter at breast Height. J Braz Chem Soc 23:1823–1833
- Baser KHC, Buchbauer G (2010) Handbook of essential oils: science, technology, and applications. CRC Press, Boca Raton
- Bilal H, Hassan SA (2012) Plants secondary metabolites for mosquito control. Asian Pacific J Trop Dis 168–168
- Braga IA, Valle D (2007) *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. Epidemiol Serv Saúde 16:279–293
- Cantrell CL, Pridgeon JW, Fronczek FR, Becnel JJ (2010) Structure–activity relationship studies on derivatives of Eudesmanolides from *Inula helenium* toxicants against *Aedes aegypti* larvae and adults. Chem Biodivers 7:1681–1697
- Cavalca PAM, Lolis MIGA, Reis B, Bonato CM (2010) Homeopathic and larvicide effect of *Eucalyptus cinerea* essential oil against *Aedes aegypti*. Braz Arch Biol Techn 53:835–843
- Cavalcanti ESB, Moraes SM, Lima MAA, Santana EWP. 2004. Larvicidal activity of essential oils from Brazilian plants against *Aedes aegypti* L. Mem Inst Oswaldo Cruz 99: 541–544
- Chantraine JM, Laurent D, Ballivian C, Saavedra G, Ibañez R, Vilaseca LA (1998) Insecticidal activity of essential oils on *Aedes aegypti* larvae. Phytoterap Res 12:350–354
- Cheng SS, Chang HT, Chang ST, Tsai KH, Chen WJ (2003) Bioactivity of selected plant essential oils against the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* larvae. Bioresour Technol. doi:10.1016/S0960-8524(03)00008-7
- Cheng SS, Liu JY, Tsai KH, Chen WJ, Chang ST (2004) Chemical composition and mosquito larvicidal activity of essential oils from leaves of different *Cinnamomum osmophloeum* Provenances. J Agric Food Chem. doi:10.1021/jf0497152
- Cheng SS, Chang HT, Lin CY, Chen PS, Huang CG, Chend WJ, Chang ST (2009a) Insecticidal activities of leaf and twig essential oils from *Clausena excavata* against *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* larvae. Pest Manag Sci. doi:10.1002/ps.1693

- Cheng SS, Huang CG, Chen YJ, Yu JJ, Chen WJ, Chang ST (2009b) Chemical compositions and larvicidal activities of leaf essential oils from two eucalyptus species. *Bioresour Technol*. doi:10.1016/j.biortech.2008.02.038
- Cheng SS, Chua MT, Chang EH, Huang CG, Chen WJ, Chang ST (2009c) Variations in insecticidal activity and chemical compositions of leaf essential oils from *Cryptomeria japonica* at different ages. *Bioresour Technol*. doi:10.1016/j.biortech.2007.11.060
- Choochote W, Chaivasit D, Kanjanapothi D, Rattanachanpichai E, Jitpakdi A, Tuetun B, Pitasawat B (2005) Chemical composition and anti-mosquito potential of rhizome extract and volatile oil derived from *Curcuma aromatica* against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J Vector Ecol* 30:302–309
- Chung IM, Seo SH, Kang EY, Park SD, Park WH, Moon HI (2009) Chemical composition and larvicidal effects of essential oil of *Dendropanax morbifera* against *Aedes aegypti* L. *Biochem Syst Ecol*. doi:10.1016/j.bse.2009.06.004
- Ciccia G, Coussio J, Mongelli E (2000) Insecticidal activity against *Aedes aegypti* larvae of some medicinal South American plants. *J Ethnopharmacol* 72:185–189
- Consoli RAGB, Oliveira RL (1994) Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Editora Fiocruz, Rio de Janeiro
- Costa JGM, Rodrigues FFG, Angélico EC et al (2005) Chemical-biological study of the essential oils of *Hyptis martiusii*, *Lippia sidoides* and *Syzigium aromaticum* against larvae of *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. *Braz J Pharmacogn* 15:304–309
- Costa JGM, Santos PF, Brito SA, Rodrigues FFG, Coutinho HDM, Botelho MA, Lima SG (2010a) Composição química e toxicidade de óleos essenciais de espécies de *Piper* frente a larvas de *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). *Latin Am J Pharm* 29:463–467
- Costa JGM, Rodrigues FFG, Sousa EO, Junior DMS, Campos AR, Coutinho HDM, Lima SG (2010b) Composition and larvicidal activity of the essential oils of *Lantana camara* and *Lantana montevidensis*. *Chem Nat Comp* 46: 313–315
- Dharmagadda VSS, Naik SN, Mittal PK, Vasudevan P (2005) Larvicidal activity of *Tagetes patula* essential oil against three mosquito species. *Bioresour Technol*. doi:10.1016/j.biortech.2004.10.020
- Eldridge BF (2005) Mosquitoes, the Culicidae. In: Marquardt WC (ed) *Biology of disease vectors*. 2 ed. Elsevier, Amsterdam, pp 95–111
- Enan EE (2001) Insecticidal activity of essential oils: octopaminergic sites of action. *Comp Biochem Physiol Part C* 130:325–337
- Enan EE (2005) Molecular and pharmacological analysis of an octopamine receptor from American cockroach and fruit fly in response to plant essential oils. *Arch Insect Biochem Physiol* 59:161–171
- Evans PD (1984) A modulatory octopaminergic neurone increases cyclic nucleotide levels in locust skeletal muscle. *J Physiol* 348:307–324
- Feitosa EMA, Arriaga AMC, Santiago GMP, Lemos TLG, Oliveira MCF, Vasconcelos JN, Lima JQ, Malcher GT, Nascimento RF, Braz-Filho R (2009) Chemical composition and larvicidal activity of *Rollinia leptopetala* (Annonaceae). *J Braz Chem Soc* 20:375–378
- Franzios G, Mirotsou M, Hatziapostolou E, Kral J, Scouras ZG, Mavragani-Tsipidou P (1997) Insecticidal and genotoxic activities of mint essential oils. *J Agric Food Chem* 45:2690–2694

- George S, Vincent S (2005) Comparative efficacy of *Annona squamosa* Linn. and *Pongamia glabra* Vent. to *Azadirachta indica* A. Juss against mosquitoes. J Vector Borne Dis 42:159–163
- Geris R, Ribeiro PR, Brandão MS, Silva HHG, Silva IG (2012) Bioactive natural products as potential candidates to control *Aedes aegypti*, the vector of dengue. In: Atta-ur-Rahman FRS (ed) Studies in natural products chemistry, v 37. Elsevier, Amsterdam, pp 277-376
- Gois RWS (2010) Estudo fitoquímico e biológico de *Bauhinia acuruana* Moric. Dissertation, Federal University of Ceará
- Govindarajan M (2010) Chemical composition and larvicidal activity of leaf essential oil from *Clausena anisata* (Willd.) Hook. f. ex Benth (Rutaceae) against three mosquito species. Asian Pacific J Trop Med. doi:10.1016/S1995-7645(10)60210-6
- Govindarajan M, Sivakumar R, Rajeswari M, Yogalakshmi K (2012) Chemical composition and larvicidal activity of essential oil from *Mentha spicata* (Linn.) against three mosquito species. Parasitol Res. doi:10.1007/s00436-011-2731-7
- Grodnitzky J, Coats J (2002) QSAR evaluation of monoterpenoids' insecticidal activity. J Agric Food Chem. doi: 10.1021/jf0201475
- Gubler DJ (2011) Dengue, urbanization and globalization: the unholy trinity of the 21st Century. Trop Med Health. doi:10.2149/tmh.2011-S05
- Hemingway J, Ranson H (2005) Chemical control of vectors and mechanisms of resistance. In: Marquardt WC (ed) Biology of disease vectors, 2nd edn. Elsevier, Amsterdam, pp 627-637
- Isman MB (2006) Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. Annu Rev Entomol. doi:10.1146/annurev.ento.51.110104.151146
- Jantan I, Ping WO, Visuvalingam SD, Ahmad NW (2003) Larvicidal activity of essential oils and methanol extracts of Malaysian plants on *Aedes aegypti*. Pharm Biol 41:234–236
- Jantan I, Yalvema MF, Ahmad NW, Jamal JA (2005) Insecticidal activities of the leaf oils of eight *Cinnamomum* species against *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* Pharm Biol. doi:10.1080/13880200500220771
- Khandagle AJ, Tare VS, Raut KD, Morey RA (2011) Bioactivity of essential oils of *Zingiber officinalis* and *Achyranthes aspera* against mosquitoes. Parasitol Res. doi:10.1007/s00436-011-2261-3
- Khanikor B, Parida P, Yadav RNS, Bora D (2013) Comparative mode of action of some terpene compounds against octopamine receptor and acetyl cholinesterase of mosquito and human system by the help of homology modeling and Docking studies. J Appl Pharm Sci. doi:10.7324/JAPS.2013.30202
- Kim NJ, Byun SG, Cho JE, Chung K, Ahn YJ (2008) Larvicidal activity of *Kaempferia galanga* rhizome phenylpropanoids towards three mosquito species. Pest Manag Sci 64:857–862
- Kiran SR, Bhavani K, Devi PS, Rao BRR, Reddy KJ (2006) Composition and larvicidal activity of leaves and stem essential oils of *Chloroxylon swietenia* DC against *Aedes aegypti* and *Anopheles stephensi*. Bioresour Technol. doi:10.1016/j.biortech.2005.10.003
- Klowden MJ (2007) Making generalizations about vectors: Is there a physiology of “the mosquito”? Entomol Res. doi:10.1111/j.1748-5967.2007.00044.x

- Komalamisra N, Trongtokit Y, Rongsriyam Y, Apiwathnasorn C (2005) Screening for larvicidal activity in some Thai plants against four mosquito vector species. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 36:1412–1422
- Kongkaew C, Sakunrag I, Chaikunapruk N, Tawatsin A (2011) Effectiveness of citronella preparations in preventing mosquito bites: systematic review of controlled laboratory experimental studies. *Trop Med Int Health*. doi:10.1111/j.1365-3156.2011.02781.x
- Konishi E (2011) Issues related to recent dengue vaccine development. *Trop Med Health*. doi:10.2149/tmh.2011-S01
- Kostyukovsky M, Rafaeli A, Gileadi C, Demchenko N, Shaaya Eli (2002) Activation of octopaminergic receptors by essential oil constituents isolated from aromatic plants: possible mode of action against insect pests. *Pest Manag Sci*. doi:10.1002/ps.548
- Koul O, Walia S, Dhaliwal GS (2008) Essential oils as green pesticides: potential and constraints. *Biopestic Int* 4:63–84
- Krishnaiah D, Sarbatly R, Nithyanandam R (2011) A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food Bioprod Processing*. doi:10.1016/j.fbp.2010.04.008
- Kulkarni RR, Pawar PV, Joseph MP, Akulwad AK, Sen A, Joshi SP (2013) *Lavandula gibsoni* and *Plectranthus mollis* essential oils: chemical analysis and insect control activities against *Aedes aegypti*, *Anopheles stephensi* and *Culex quinquefasciatus*. *J Pest Sci*. doi:10.1007/s10340-013-0502-1
- Kumar D, Kumar A, Prakash O (2012) Potential antifertility agents from plants: A comprehensive review. *J Ethnopharmacol*. doi:10.1016/j.jep.2011.12.039
- Kumar S, Thomas A, Sahgal A, Verma A, Samuel T, Pillai MKK (2002) Effect of the synergist, Piperonyl Butoxide, on the development of deltamethrin resistance in yellow fever mosquito, *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). *Arch Insect Biochem Physiol*. doi:10.1002/arch.10021
- Kumar S, Wahab N, Warikoo R (2011) Bioefficacy of *Mentha piperita* essential oil against dengue fever mosquito *Aedes aegypti* L. *Asian Pacific J Trop Biomed* 2:85–88
- Kuo PM, Chu FH, Chang ST, Hsiao WF, Wang SY (2007) Insecticidal activity of essential oil from *Chamaecyparis formosensis* Matsum. *Holzforschung*. doi:10.1515/HF.2007.087
- Lahlou M (2004a) Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytoterap Res*. doi:10.1002/ptr.1465
- Lahlou M (2004b) Essential oils and fragrance compounds: bioactivity and mechanisms of action. *Flavour Fragr J*. doi:10.1002/ffj.1288
- Lang G, Buchbauer G (2011) A review on recent research results (2008–2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. A review. *Flavour Fragr J*. doi:10.1002/ffj.2082
- Lee HS (2006) Mosquito larvicidal activity of aromatic medicinal plant oils against *Aedes aegypti* and *Culex pipiens pallens*. *J Am Mosq Control Assoc*. doi:10.2987/8756-971X%282006%2922%5B292%3AMLAOAM%5D2.0.CO%3B2
- Leyva M, Tacoronte JE, Marquetti MC, Scull R, Montada D, Rodriguez Y, Bruzón RY (2008) Actividad insecticida de aceites esenciales de plantas en larvas de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Rev Cubana Med Trop* 60:78–82

- Leyva M, Marquetti MC, Tacoronte JE, Scull R, Tiomno O, Mesa A, Montada D (2009a) Actividad larvica de aceites esenciales de plantas contra *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) Rev Biomed 20:5–13
- Leyva M, Tacoronte JE, Marquetti MC, Scull R, Tiomno O, Mesa A, Montada D (2009b) Utilización de aceites esenciales de pinaceas endémicas como una alternativa en el control del *Aedes aegypti*. Ver Cubana Med Trop 61:239–43
- Lima MAA, Oliveira FFM, Gomes GA et al (2011) Evaluation of larvicidal activity of the essential oils of plants species from Brazil against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). African J Biotechnol 10:11716–11720
- Lomonaco D, Santiago GMP, Ferreira YS, Arriaga AMC, Mazzetto SE, Melec G, Vasapollo G (2009) Study of technical CNSL and its main components as new green larvicides. Green Chem. doi:10.1039/b811504d
- López O, Fernández-Bolaños JG, Gil MV (2005) New trends in pest control: the search for greener insecticides. Green Chem. doi:10.1039/b500733j
- López MD, Pascual-Villalobos MJ (2010) Mode of inhibition of acetylcholinesterase by monoterpenoids and implications for pest control. Ind Crops Prod. doi:10.1016/j.indcrop.2009.11.005
- Lucia A, Audino PG, Seccacini E, Licastro S, Zerba E, Masuh H (2007) Larvicidal effect of *Eucalyptus grandis* essential oil and Turpentine and their major components on *Aedes aegypti* larvae. J Am Mosq Control Assoc. doi:10.2987/8756-971X%282007%2923%5B299%3ALEOE%5D2.0.CO%3B2
- Lucia A, Licastro S, Zerba E, Masuh H (2008) Yield, chemical composition, and bioactivity of essential oils from 12 species of *Eucalyptus* on *Aedes aegypti* larvae. Entomol Exp Appl. doi:10.1111/j.1570-7458.2008.00757.x
- Magalhães LAM, Lima MP, Marques MOM, Facanali R, Pinto ACS, Tadei WP (2010) Chemical composition and larvicidal activity against *Aedes aegypti* larvae of essential oils from four *Guarea* species. Molecules. doi:10.3390/molecules15085734
- Marinho SC (2010) Chemical study, electrochemical evaluation and larvicidal activity of essential oil from leaves of *Pimenta dioica* Lindl front of *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762). Dissertation, Federal University of Paraíba
- Marques MMM, Morais SM, Vieira ÍGP, Vieira MGS, Silva ARA, Almeida RR, Guedes MIF (2011) Larvicidal activity of *Tagetes erecta* against *Aedes aegypti*. J Am Mosq Control Assoc. doi:10.2987/10-6056.1
- Massebo F, Tadesse M, Bekele T, Balkew M, Gebre-Michael T (2009) Evaluation on larvicidal effects of essential oils of some local plants against *Anopheles arabiensis* Patton and *Aedes aegypti* Linnaeus (Diptera, Culicidae) in Ethiopia. African J Biotechnol 8:4183–4188
- Mendonça FAC, Silva KFS, Santos KK, Ribeiro-Jr KAL, Sant'Ana AEG (2005) Activities of some Brazilian plants against larvae of the mosquito *Aedes aegypti*. Fitoterapia. doi:10.1016/j.fitote.2005.06.013
- Morais SM, Cavalcanti ESB, Bertini LM, Oliveira CLL, Rodrigues JRB, Cardoso JHL (2006) Larvicidal activity of essential oils from Brazilian croton species against *Aedes aegypti* L. J Am Mosq Control Assoc. doi:10.2987/8756-971X%282006%2922%5B161%3ALAOE%5D2.0.CO%3B2
- Morais SM, Facundo VA, Bertini LM et al (2007) Chemical composition and larvicidal activity of essential oils from *Piper* species. Biochem Syst Ecol. doi:10.1016/j.bse.2007.05.002

- Morais LAS (2009) Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. *Hortic Bras* 27:S4050–S4063.
- Nascimento JC, David JM, Barbosa LCA, Paula VF, Demuner AJ, David JP, Conserva LM, Ferreira-Jr JC, Guimarães EF (2013) Larvicidal activities and chemical composition of essential oils from *Piper klotzschianum* (Kunth) C. DC. (Piperaceae) *Pest Manag Sci*. doi:10.1002/ps.3495
- Oliveira VB, Yamada LT, Fagg CW, Brandão MGL (2012) Native foods from Brazilian biodiversity as a source of bioactive compounds. *Food Res Intern*. doi:10.1016/j.foodres.2012.03.011
- Oyewole IO, Moronkola DO, Ogunwande IA, Okoh H, Ibidapo CA, Denloye AAB, Ogunnowo AA, Adedayo M (2010) Larvicidal activity of the essential oil from *Phyllanthus amarus* Sch. et Thonn (Euphorbiaceae) against three species of mosquitoes. *Der Pharm Lett* 2:136–141
- Pandey SK, Tandon S, Ahmad A, Singh AK, Tripathi AK (2013) Structure–activity relationships of monoterpenes and acetyl derivatives against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae. *Pest Manag Sci*. doi:10.1002/ps.3488
- Park HM, Kim J, Chang KS, Kim BS, Yang YJ, Kim GH, Shin SC, Park IK (2011) Larvicidal activity of Myrtaceae essential oils and their components against *Aedes aegypti*, acute toxicity on *Daphnia magna*, and aqueous residue. *J Med Entomol*. doi:10.1603/ME10108
- Perumalsamy H, Chang KS, Park C, Ahn YJ (2010) Larvicidal activity of *Asarum heterotropoides* root constituents against insecticide-susceptible and –resistant *Culex pipiens pallens* and *Aedes aegypti* and *Ochlerotatus togoi*. *J Agric Food Chem*. doi:10.1021/jf102193k
- Perumalsamy H, Kim NJ, Ahn AJ (2009) Larvicidal activity of compounds isolated from *Asarum heterotropoides* against *Culex pipiens pallens*, *Aedes aegypti*, and *Ochlerotatus togoi* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 46:1420–1423
- Pflüger HJ, Stevenson PA (2005) Evolutionary aspects of octopaminergic systems with emphasis on arthropods. *Arthropod Struct Dev* 34:379–396
- Pimenta ATA, Santiago GMP, Arriaga AMC, Menezes GHA, Bezerra SB (2006) Phytotochemical study and evaluation of larvicidal activity of *Pterodon polygalaeflorus* Benth (Leguminosae) against *Aedes aegypti*. *Braz J Pharmacogn* 16:501–505
- Pitasawat B, Champakaew D, Choochote W (2007) Aromatic plant-derived essential oil: an alternative larvicide for mosquito control. *Fitoterapia*. doi:10.1016/j.fitote.2007.01.003
- Polson KA, Brogdon WG, Rawlins SC, Chadee DD (2011) Characterization of insecticide resistance in Trinidadian strains of *Aedes aegypti* mosquitoes. *Acta Tropica*. doi:10.1016/j.actatropica.2010.09.005
- Porto KRA, Roel AR, Silva MM, Coelho RM, Scheleder EJD, Jeller AH (2008) Atividade larvica do óleo de *Anacardium humile* Saint Hill sobre *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae). *Rev Soc Bras Med Trop* 41:586–589
- Prajapati V, Tripathi AK, Aggarwal KK, Khanuja SPS (2005) Insecticidal, repellent and oviposition-deterrent activity of selected essential oils against *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. doi:10.1016/j.biortech.2005.01.007
- Priestley CM, Williamson EM, Wafford KA, Sattelle DB (2003) Thymol, a constituent of thyme essential oil, is a positive allosteric modulator of human GABA_A

- receptors and a homo-oligomeric GABA receptor from *Drosophila melanogaster*. British J Pharmacol 140:1363–1372
- Rajkumar S, Jebanesan A (2010) Chemical composition and larvicidal activity of leaf essential oil from *Clausena dentata* (Willd) M. Roam. (Rutaceae) against the chikungunya vector, *Aedes aegypti* Linn. (Diptera: Culicidae). J Asia-Pacific Entomol. doi:10.1016/j.aspen.2010.02.001
- Regnault-Roger C (1997) The potential of botanical essential oils for insect pest control. Integr Pest Manag Rev 2:25–34
- Roeder T (1999) Octopamine in invertebrates. Progr Neurobiol 59:533–561
- Ryan MF, Byrne O (1988) Plant-insect coevolution and inhibition of acetylcholinesterase. J Chem Ecol 14:1965–1975
- Sakhanokho HF, Sampson BJ, Tabanca N, Wedge DE, Demirci B, Baser KHC, Bernier UR, Tsikolia M, Agramonte NM, Becnel JJ, Chen J, Rajasekaran K, Spiers JM (2013) Chemical composition, antifungal and insecticidal activities of *Hedychium* essential oils. Molecules. doi:10.3390/molecules18044308
- Santiago GMP, Lemos TLG, Pessoa ODL et al (2006) Larvicidal activity against *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) of essential oils of *Lippia* species from Brazil. Nat Prod Commun 1:573–576
- Santos RP, Nunes EP, Nascimento RF, Santiago GMP, Menezes GHA, Silveira ER, Pessoa ODL (2006) Chemical composition and larvicidal activity of the essential oils of *Cordia leucomalloides* and *Cordia curassavica* from the Northeast of Brazil. J Braz Chem Soc 17:1027–1030
- Santos HS, Santiago GMP, Oliveira JPP, Arriaga AMC, Marques DD, Lemos TLG (2007) Chemical composition and larvicidal activity against *Aedes aegypti* of essential oils from *Croton zehntneri*. Nat Prod Commun 2:1233–1236
- Santos SRL, Melo MA, Cardoso AV, Santos RLC, Sousa DP, Cavalcanti SCH (2011) Structure–activity relationships of larvicidal monoterpenes and derivatives against *Aedes aegypti* Linn. Chemosphere. doi:10.1016/j.chemosphere.2011.02.018
- Santos SRL, Silva VB, Melo MA, Barbosa JDF, Santos RLC, Sousa DP, Cavalcanti SCH (2010) Toxic effects on and structure-toxicity relationships of phenylpropanoids, terpenes, and related Compounds in *Aedes aegypti* larvae. Vector-Borne Zoonotic Dis. doi:10.1089/vbz.2009.0158
- Santos GKN, Dutra KA, Barros RA, Câmara CAG, Lira DD, Gusmão NB, Navarro DMAF (2012) Essential oils from *Alpinia purpurata* (Zingiberaceae): Chemical composition, oviposition deterrence, larvicidal and antibacterial activity. Ind Crops Prod. doi:10.1016/j.indcrop.2012.03.020
- Satyan RS, Malarvannan S, Eganathan P, Rajalakshmi S, Parida A (2009) Growth inhibitory activity of fatty acid methyl esters in the whole seed oil of Madagascar Periwinkle (Apocyanaceae) against *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). J Econ Entomol. doi:10.1603/029.102.0344
- Senthilkumar A, Jayaraman M, Venkatesalu V (2013) Chemical constituents and larvicidal potential of *Feronia limonia* leaf essential oil against *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. Parasitol Res. doi:10.1007/s00436-012-3188-z
- Shalan EAS, Canyon DV, Bowden B, Younes MWF, Abdel-Wahab H, Mansour AH (2006) Efficacy of botanical extracts from *Callitris glaucophylla*, against *Aedes aegypti* and *Culex annulirostris* mosquitoes. Trop Biomed 23:180–185

- Shaalán EAS, Canyon D, Younes MWF, Abdel-Wahab H, Mansour AH (2005) A review of botanical phytochemicals with mosquitocidal potential. *Environ Int.* doi:10.1016/j.envint.2005.03.003
- Silva AG, Almeida DL, Ronchi SN, Bento AC, Scherer R, Ramos AC, Cruz ZMA (2010) The essential oil of Brazilian pepper, *Schinus terebinthifolia* Raddi in larval control of *Stegomyia aegypti* (Linnaeus, 1762). *Parasites & Vectors.* doi:10.1186/1756-3305-3-79
- Silva WJ (2006) Atividade larvica do óleo essencial de plantas existentes no estado de Sergipe contra *Aedes aegypti* Linn. Dissertation, Federal University of Sergipe
- Silva WJ, Dória GAA, Maia RT, Nunes RS, Carvalho GA, Blank AF, Alves PB, Marçal RM, Cavalcanti SCH (2008) Effects of essential oils on *Aedes aegypti* larvae: alternatives to environmentally safe insecticides. *Bioresour Technol.* doi:10.1016/j.biortech.2007.05.064
- Simas NK, Lima EC, Conceição SR, Kuster RM, Oliveira-Filho AM (2004) Produtos naturais para o controle da transmissão da dengue – atividade larvica de *Myroxylon balsamum* (óleo vermelho) e de terpenóides e fenilpropanóides. *Quím Nova* 27:46-49
- Souza LGS, Almeida MCS, Monte FJQ, Santiago GMP, Braz-Filho R, Lemos TLG, Gomes CL, Nascimento RF (2012a) Chemical constituents of *Capraria biflora* (Scrophulariaceae) and larvicidal activity of essential oil. *Quím Nova* 35:2258–2262
- Souza TM, Cunha AP, Farias DF, Machado LK, Morais SM, Ricardo NMPS, Carvalho AFU (2012b) Insecticidal activity against *Aedes aegypti* of *m*-pentadecadienyl-phenol isolated from *Myracrodruon urundeuva* seeds. *Pest Manag Sci.* doi:10.1002/ps.3316
- Sukumar K, Perich MJ, Boobar LW (1991) Botanical derivatives in mosquito control: a review. *J Am Mosq Control Assoc* 7:210–237
- Sun L, Dong H, Guo C, Qian J, Sun J, Ma L, Zhu C (2006) Larvicidal activity of extracts of *Ginkgo biloba* exocarp for three different strains of *Culex pipiens pallens*. *J Med Entomol.* doi:10.1603/0022-2585(2006)043[0258:LAOEOG]2.0.CO;2
- Teles RM (2009) Caracterização química, avaliação térmica e atividade larvica frente ao *Aedes aegypti* do óleo essencial da *Aniba duckei* Kostermans. Dissertation, Federal University of Paraíba
- Thomas TG, Rao S, Lal S (2004) Mosquito larvicidal properties of essential oil of an Indigenous plant, *Ipomoea cairica* Linn. *Jpn J Infect Dis* 57:176–177
- Tiwary M, Naik SN, Tewary DK, Mittal PK, Yadav S (2007) Chemical composition and larvicidal activities of the essential oil of *Zanthoxylum armatum* DC (Rutaceae) against three mosquito vectors. *J Vect Borne Dis* 44:198–204
- Torres MCM, Assunção JC, Santiago GMP et al (2008) Larvicidal and nematicidal activities of the leaf essential oil of *Croton regelianus*. *Chem Biodivers* 5:2724–2728
- United States Environmental Protection Agency (EPA) (1999) Citronella (Oil of Citronella) (021901) Fact Sheet. http://www.epa.gov/opp00001/chem_search/reg_actions/registration/fs_PC-021901_01-Nov-99.pdf. Accessed 02 December 2012
- Unnati S, Ripal S, Sanjeev A, Niyati A (2013) Novel anticancer agents from plant sources. *Chin J Nat Med* 11:16–23

- Vila R, Santana AI, Pérez-Rosés R et al (2010) Composition and biological activity of the essential oil from leaves of *Plinia cerrocampanensis*, a new source of α -bisabolol. *Bioresour Technol*. doi:10.1016/j.biortech.2009.11.021
- Wahyuni D (2012) Larvicidal activity of essential oils of *Piper betle* from the Indonesian plants against *Aedes aegypti* L. *J Applied Environm Bio Sci* 2:249-254
- Waliwitiya R, Kennedy CJ, Lowenberger CA (2009) Larvicidal and oviposition-altering activity of monoterpenoids, *trans*-anethole and rosemary oil to the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Pest Manag Sci*. doi:10.1002/ps.1675
- WHO (1992) Vector resistance to pesticides: fifteenth report of the WHO expert committee on vector biology and control. WHO Technical Report Series 818, Geneva
- WHO (2005) Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides. WHO Press, Geneva
- WHO (2006) Pesticides and their application for the control of vectors and pests of public health importance, 6th edn. WHO Press, Geneva
- WHO (2009a) Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. WHO Press, Geneva
- WHO (2009b) Temephos in drinking-water: use for vector control in drinking-water sources and containers. WHO Press, Geneva
- WHO (2012a) Impact of Dengue. Global Alert and Response (GAR). <http://www.who.int/csr/disease/dengue/impact/en/index.html>. Accessed 14 April 2012
- WHO (2012b) Global strategy for dengue prevention and control 2012-2020. WHO Press, Geneva
- WHO (2012c) Dengue and severe dengue. Factsheet no. 117. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>. Accessed 15 April 2012
- WHO (2012d) Handbook for integrated vector management WHO Press, Geneva
- WHO (2012e) Recommended compounds and formulations for control of mosquito larvae. WHOPES. http://www.who.int/whopes/Mosquito_Larvicides_Sept_2012.pdf. Accessed 28 September 2012
- Wood A (2012) Compendium of Pesticide Common Names: Insecticides. <http://www.alanwood.net/pesticides/index.html>. Accessed 16 December 2012
- Zhu J, Zeng X, O'neal M, Schultz G, Tucker B, Coats J, Bartholomay L, Xue RD (2006) Mosquito larvicidal activity of botanical-based mosquito repellents. *J Am Mosq Control Assoc*. doi:10.2987/8756-971X%282008%2924%5B161%3AMLAOBM%5D2.0.CO%3B2
- Zoubiri S, Baaliouamer A (2011) Potentiality of plants as source of insecticide principles. *J Saudi Chem Soc*. doi:10.1016/j.jscs.2011.11.015

CAPÍTULO 2. Atividade larvícida de óleos essenciais de espécies vegetais da Amazônia Legal, Maranhão, Brasil, contra *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae)

Este capítulo será submetido à Revista “Acta Amazonica”, na forma de artigo e está normatizado de acordo com as normas para a publicação nesta revista (ANEXO 2).

Resumo: *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) é o principal vetor da dengue, arbovirose mais importante do mundo. Óleos essenciais extraídos de seis espécies vegetais de grande ocorrência no Parque Nacional da Chapada das Mesas (Amazônia Legal maranhense) foram testados contra as larvas de *A. aegypti* de 3º a 4º estágio de desenvolvimento, para avaliar os seus potenciais larvicidas, segundo metodologia preconizada pela Organização Mundial de Saúde. A composição química destes óleos foi determinada por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas. Os sesquiterpenos hidrocarbonados constituíram a maior fração dos óleos essenciais de *Eugenia patrisii* Vahl, *Eugenia piauiensis* Vellaff., *Myrcia erythroxylon* O. Berg, *Psidium myrsinites* DC. e *Siparuna camporum* (Tul.) A. DC.; enquanto que, *Lippia gracilis* Schauer apresentou como constituintes majoritários monoterpenos oxigenados. Cinco dos seis óleos testados demonstraram resultados promissores para o desenvolvimento de produtos larvicidas contra as larvas de *A. aegypti*, apresentando CL₅₀ entre 230 e 417 mg/L. Os resultados deste estudo incentivam o desenvolvimento de um efetivo larvícida baseado nesses óleos essenciais.

Palavras-chave: espécies aromáticas, Cerrado maranhense, Chapada das Mesas, inseticida botânico, dengue.

Abstract: *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) is the primary vector of dengue, the most important mosquito-borne viral disease in the world. Essential oils extracted from six endemic plants of “Parque Nacional da Chapada das Mesas” (Amazônia Legal maranhense) were tested against the *A. aegypti* larvae to evaluate their larvicidal potential, according to the guidelines from the World Health Organization. In addition, the oil chemical compositions were determined using gas chromatography coupled to mass spectrometry. The sesquiterpenes hydrocarbons were the major fraction of the essential oils from *Eugenia patrisii* Vahl, *Eugenia piauiensis* Vellaff., *Myrcia erythroxylon* O. Berg, *Psidium myrsinites* DC., and *Siparuna camporum* (Tul.) A. DC.; whereas, *Lippia gracilis* Schauer essential oil showed the oxygenated monoterpenes as major compounds. Five of the six tested oils showed promising results for the development of products larvicides against *A. aegypti* larvae, showing LC₅₀ value between 230 and 417 mg/L. The results of this study encourage the development of these effective essential oil-based larvicides.

Key words: aromatic herbs, Cerrado maranhense, Chapada das Mesas, botanical insecticide, dengue.

1 Introdução

A dengue é considerada a arbovirose mais importante do mundo. Esta doença é endêmica em mais de 100 países, onde vivem aproximadamente 2,5 bilhões de pessoas. Estima-se que, anualmente, 50 a 100 milhões de pessoas são infectadas pelo vírus da dengue (OMS 2012a). A incidência da dengue no mundo nos últimos anos é maior do que em qualquer outro período da história (Morrison *et al.* 2008). A Organização Mundial de Saúde (OMS) (2012b) mostra que, comparada com a situação há 50 anos, a incidência de dengue aumentou 30 vezes.

A dengue pode causar, nos seres humanos, manifestações clínicas benignas, como a dengue clássica ou graves, como a febre hemorrágica da dengue. Em geral, estas manifestações causam um alto impacto na saúde, sociedade e economia das populações que vivem em áreas endêmicas (OMS 2009).

O principal vetor da dengue é *Aedes (Stegomyia) aegypti* L. (1762) (Diptera: Culicidae); este inseto é considerado cosmopolita e antropofílico, estando disperso em áreas tropicais e subtropicais, com boa adaptação em ambientes urbanos (Consoli e Oliveira 1994).

A alta incidência e a expansão geográfica da dengue são influenciadas por diversos fatores, que contribuem para a emergência e reemergência da doença em diversos países do mundo, especialmente a falta de infraestrutura dos sistemas públicos de saúde, o crescimento exponencial das populações, as mudanças nos estilos de vida das comunidades, os descuidos no controle do vetor, entre outros (Pinheiro e Nelson 1997; Ferreira 2012).

Apesar das diversas pesquisas realizadas, até o momento não existem drogas farmacológicas disponíveis para o tratamento da dengue e também não há uma vacina

eficaz e segura para a prevenção desta doença. Desta forma, a prevenção da propagação do vírus da dengue depende essencialmente do combate ao seu principal vetor, o mosquito *A. aegypti* (Gubler 2011).

A erradicação do mosquito vetor deve ser fundamentada em uma abordagem integrada (OMS 1995), como as melhorias no saneamento do meio ambiente, as ações de educação/comunicação para a população e as medidas de combate direto ao vetor (Teixeira *et al.* 1999).

O combate direto, químico, biológico e físico, ao vetor é considerado o fator prevalente na obtenção de sucesso nos programas de controle da dengue. O controle químico, através do uso de inseticidas nas diferentes fases de desenvolvimento do mosquito, é uma das intervenções mais utilizadas na saúde pública (Braga e Valle 2007). Estes inseticidas podem ser utilizados em tratamentos focais, perifocais e espaciais. O tratamento focal é o método mais eficiente e consiste na eliminação das formas imaturas de *A. aegypti* através da aplicação de larvicidas, como o organofosforado temefós, em focos onde as larvas estejam presentes (Brasil 2002; OMS 2006; Macoris 2011).

No entanto, uso contínuo e repetido de temefós e de outros inseticidas nos programas de saúde pública e na agricultura tem contribuído para o desenvolvimento de cepas resistentes de vetores transmissores de doenças (Vontas *et al.* 2012). Larvicidas naturais obtidos a partir de plantas são uma importante alternativa ao uso dos larvicidas sintéticos, pois são originários de recursos renováveis, são biodegradáveis e apresentam baixo custo (Simas *et al.* 2004).

Estas características dos produtos naturais têm atraído à atenção de muitos pesquisadores interessados em investigar novos compostos bioativos, especialmente para

o controle das larvas de *A. aegypti* (Santos *et al.* 2011; Barbosa *et al.* 2012). Muitas destas pesquisas têm focado no estudo da bioatividade dos óleos essenciais, pois eles são misturas complexas de metabólitos secundários (Magalhães *et al.* 2010; Vila *et al.* 2010; Park *et al.* 2011; Govindarajan *et al.* 2012).

A Amazônia e o Cerrado são os maiores biomas brasileiros; juntos eles ocupam 86% do território nacional. Apesar da importância da biodiversidade encontrada nestes biomas, 17% e 55% da vegetação da Amazônia e do Cerrado, respectivamente, foi desmatada devido ao dinamismo da ocupação humana (Vieira *et al.* 2008; Brasil 2011). Uma importante unidade de conservação destes biomas está localizada na região Centro-Sul do estado do Maranhão, que é o Parque Nacional da Chapada das Mesas (Brasil 2005).

Considerando a necessidade de viabilizar o uso sustentável de espécies vegetais aromáticas da Amazônia e do Cerrado e de pesquisar novos produtos para o controle da dengue, este estudo teve como objetivo avaliar a atividade larvicida contra *A. aegypti* de óleos essenciais de seis espécies vegetais de grande ocorrência na Amazônia Legal maranhense, bem como determinar a composição química destes óleos.

2 Materiais e Métodos

2.1 Material vegetal

As espécies vegetais aromáticas coletadas foram selecionadas a partir de critérios sensoriais e de observações das características morfológicas dos espécimes. Estas inspeções foram realizadas por botânicos colaboradores que acompanharam a coleta, para avaliar se a família, ao qual o espécime pertence, é considerada aromática. Além disso, privilegiou-se a seleção de espécies vegetais pouco estudadas.

As folhas das espécies vegetais foram coletadas de espécimes maduros, encontrados endemicamente em pontos de coleta, que se localizaram no interior do Parque Nacional da Chapada das Mesas, Maranhão, Brasil e nas suas zonas de amortecimento. Essa área se constitui como uma Unidade de Conservação Ambiental, que abriga flora da Amazônia e do Cerrado maranhense. Autorização de coleta das espécies vegetais foi emitida pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO), do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) – Ministério do Meio Ambiente (MMA) e está registrada sob o nº 28007-2.

As espécies foram identificadas por botânicos do Herbário "João Murça Pires" do Museu Paraense Emílio Goeldi, Belém, Pará, Brasil. A lista das espécies, as coordenadas geográficas, as datas das coletas e os registros no Herbário estão na tabela 1.

Tabela 1 - Espécies vegetais aromáticas coletadas no Parque Nacional da Chapada das Mesas, Centro-Sul do estado do Maranhão, Brasil

Família e Espécie vegetal	Local da coleta	Data da coleta	Registro Herbário
Myrtaceae			
<i>Eugenia patrisii</i> Vahl	07°15'64,6"S; 47°59'79,7"W	20 de julho de 2011	L-2910
<i>Eugenia piauiensis</i> Vellaff.	07°19'14,8"S; 47°19'14,8"W	28 de fevereiro de 2012	L-3146
<i>Myrcia erythroxylon</i> O. Berg	07°09'32,7"S; 47°24'05,1"W	20 de julho de 2011	L-2907
<i>Psidium myrsinites</i> DC.	07°06'3,65"S; 47°20'35,3"W	28 de fevereiro de 2012	L-3152
Siparunaceae			
<i>Siparuna camporum</i> (Tul.) A. DC.	07°03'04,6"S; 47°27'09,1"W	01 de março de 2012	L-3174
Verbenaceae			
<i>Lippia gracilis</i> Schauer	07°06'3,65"S; 47°20'35,3"W	28 de fevereiro de 2012	L-3151

2.2 Destilação dos óleos essenciais

O material vegetal foi seco por sete dias em um ambiente com temperatura controlada (25 ± 2 °C), fragmentado em pequenos pedaços e submetido à hidrodestilação em aparelho de Clevenger modificado. Os óleos essenciais obtidos foram coletados, secos com sulfato de sódio anidro e centrifugados. Foram medidos os volumes dos óleos puros, para o cálculo de seus rendimentos em porcentagem (v/p); este teor percentual foi estimado a partir da massa da planta, subtraindo-se o percentual de umidade medido em uma balança determinadora de umidade. Os óleos foram conservados em ampolas de vidro âmbar e mantidos em refrigeração (+5 °C) até a utilização.

2.3 Análise química dos óleos essenciais

Foi utilizado o cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas (CG-EM) THERMO modelo DSQ II (Thermo Fisher Scientific, Austin, TX, USA). As análises químicas dos óleos essenciais obtidos foram realizadas sob as seguintes condições: coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm d.i.) com fase estacionária DB-5ms (0,25 µm de espessura do filme); programa de temperaturas: 5 min a 60 °C, posteriormente 3 °C/min até 240 °C; temperatura do injetor: 250 °C; gás de arraste: hélio (alta pureza), ajustado para fornecer uma velocidade linear de 32 cm/s (medidos a 100°C); tipo de injeção: sem divisão de fluxo, 0,1 µL de uma solução 2:1000 de óleo:*n*-hexano. Todos os espectros de massa foram obtidos a partir da ionização obtida pela técnica de impacto eletrônico (IE), com energia de 70 eV; o filtro do quadrupolo varreu a faixa de 39 a 400 daltons a cada segundo. A temperatura da fonte de íons e das peças de ligação foi de 200 °C.

Cada constituinte químico foi identificado através da comparação de seu espectro de massas (massa molecular e o padrão de fragmentação) com espectros existentes na literatura e no banco de dados do equipamento e, também pela comparação dos índices de retenção com aqueles da literatura (NIST 2005; Adams 2007). Dados obtidos de compostos autênticos anteriormente analisados, em mesmas condições cromatográficas, foram armazenados na biblioteca desenvolvida pelo grupo “Plantas Aromáticas e Oleaginosas da Amazônia” como forma de auxiliar na identificação das substâncias (Maia *et al.* 1998). Os índices de retenção foram determinados através da curva de calibração de uma série de *n*-alcanos (C₈-C₂₄) injetados nas mesmas condições cromatográficas das amostras. A porcentagem (relativa) dos compostos identificados foi calculada a partir da área do pico no cromatograma.

2.4 Bioensaio larvicida

Os ovos de *A. aegypti* foram coletados com o uso de armadilhas tipo ovitrampas, que foram distribuídas por bairros da ilha de São Luís, Maranhão, Brasil e deixadas em campo por cinco dias. Após este período de exposição, as ovitrampas foram recolhidas e enviadas para o Laboratório de Farmacognosia II da Universidade Federal do Maranhão – UFMA. Neste local, as paletas foram analisadas em microscópio estereoscópico para o registro da presença ou ausência de ovos. A ovitrampa é constituída por um recipiente plástico de cor preta; no interior deste recipiente é fixado verticalmente um paleta de “eucatex”; esta paleta é parcialmente submersa em água de torneira.

As paletas contendo os ovos foram imersas em água de torneira desclorada, para a eclosão destes; adicionou-se ração Purina Cat Chow[®] triturada (0,3 g) à água para

auxiliar no crescimento das larvas. Após a eclosão, as larvas foram observadas durante 4 a 5 dias até que atingirem o 3º ao 4º estágio de desenvolvimento. As larvas foram utilizadas no bioensaio nestes estádios. Todo o processo de criação das larvas foi realizado em temperatura controlada ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$) e com fotoperíodo de 12 h. As larvas foram identificadas a partir da análise dos seus caracteres morfológicos, segundo as chaves de identificação de Consoli e Oliveira (1994).

O bioensaio de atividade larvicida foi desenvolvido de acordo com a metodologia proposta pela Organização Mundial de Saúde (OMS 2005). Para a realização do bioensaio, foram preparadas soluções estoques com os óleos essenciais, água mineral e solução de dimetilsulfóxido (DMSO) a 0,01%, de onde foram retiradas alíquotas para a preparação de soluções de 20 mL em seis concentrações, que variaram entre 50 e 1000 mg/L. Em cada solução foram adicionadas 10 larvas. A verificação de mortalidade foi feita 24 horas após o início do teste. O controle negativo consistiu em solução de DMSO a 0,01% e o controle positivo em solução de temefós a 1 mg/L; o bioensaio foi realizado em triplicata e foi repetido três vezes em dias diferentes.

2.5 Análise estatística

A avaliação da atividade larvicida dos óleos essenciais foi realizada através do cálculo da concentração média letal de 50% dos indivíduos testados (CL_{50}), determinada através da análise de probitos, usando programa SPSS 13.0.

3 Resultados

3.1 Análise química dos óleos essenciais

Os óleos essenciais das folhas de *Eugenia patrisii*, *Eugenia piauiensis*, *Myrcia erythroxylon*, *Psidium myrsinites*, *Siparuna camporum*, *Lippia gracilis* apresentaram rendimentos de 0,38; 0,43; 0,53; 0,39; 1,40 e 7,99% (v/p), respectivamente; todos os óleos foram menos densos que a água e apresentaram coloração amarelo claro. Cinquenta e oito constituintes, representando 91,94 a 99,64% dos óleos foram identificados (Tabela 2).

A Figura 1 mostra os cromatogramas dos óleos essenciais analisados. Os constituintes majoritários de *E. patrisii* foram: δ -cadineno e biciclogermacreno (Fig. 1A); de *E. piauiensis*: γ -elemeno e (*E*)- β -cariofileno (Fig. 1B); de *M. erythroxylon*: germacreno D (Fig. 1C); de *P. myrsinites*: (*E*)- β -cariofileno e α -humuleno (Fig. 1D); de *S. camporum*: γ -patchouleno (Fig. 1E).

Sesquiterpenos hidrocarbonados constituíram a maior fração dos óleos essenciais de *E. patrisii*, *E. piauiensis*, *M. erythroxylon*, *P. myrsinites* e *S. camporum*. Enquanto que o óleo essencial de *L. gracilis* apresentou como constituintes majoritários os monoterpenos oxigenados 1,8-cineol e α -terpineol (Fig. 1F).

3.2 Bioensaio larvicida

A OMS (2005) determina as diretrizes para a realização de testes larvicidas em mosquitos, no entanto não indica os critérios que devem ser usados no reconhecimento de atividade larvicida. Sendo assim, diversos autores criaram diferentes formas para classificar os produtos testados (Cheng *et al.* 2003; Kiran *et al.* 2006).

Neste trabalho, utilizou-se a classificação de Komalamisra *et al.* (2005) como critério de avaliação do potencial dos óleos testados. Estes autores consideram que produtos que apresentam CL_{50} maior que 50 mg/L são ativos, CL_{50} entre 50 e 100 mg/L são moderadamente ativos, CL_{50} entre 100 e 750 mg/L são efetivos e CL_{50} maior que 750 mg/L são inativos.

O óleo essencial de *M. erythroxylon* foi considerado inativo, pois até a maior concentração testada (1000 mg/L) não causou mortalidade às larvas; os demais óleos essenciais foram considerados efetivos, pois apresentaram CL_{50} entre 230 e 417 mg/L, após 24h de exposição. Os valores das CL_{50} , assim como os seus respectivos intervalos de confiança de 95%, estão listados na tabela 3.

Na maior concentração testada dos óleos essenciais efetivos (400 mg/L), as larvas se mostraram agitadas por algum tempo e depois ficaram lentas, movimentando-se de maneira anormal, com tremores e convulsões. Depois ficaram paralisadas no fundo dos recipientes até morrerem. A taxa de mortalidade foi diretamente proporcional às concentrações testadas.

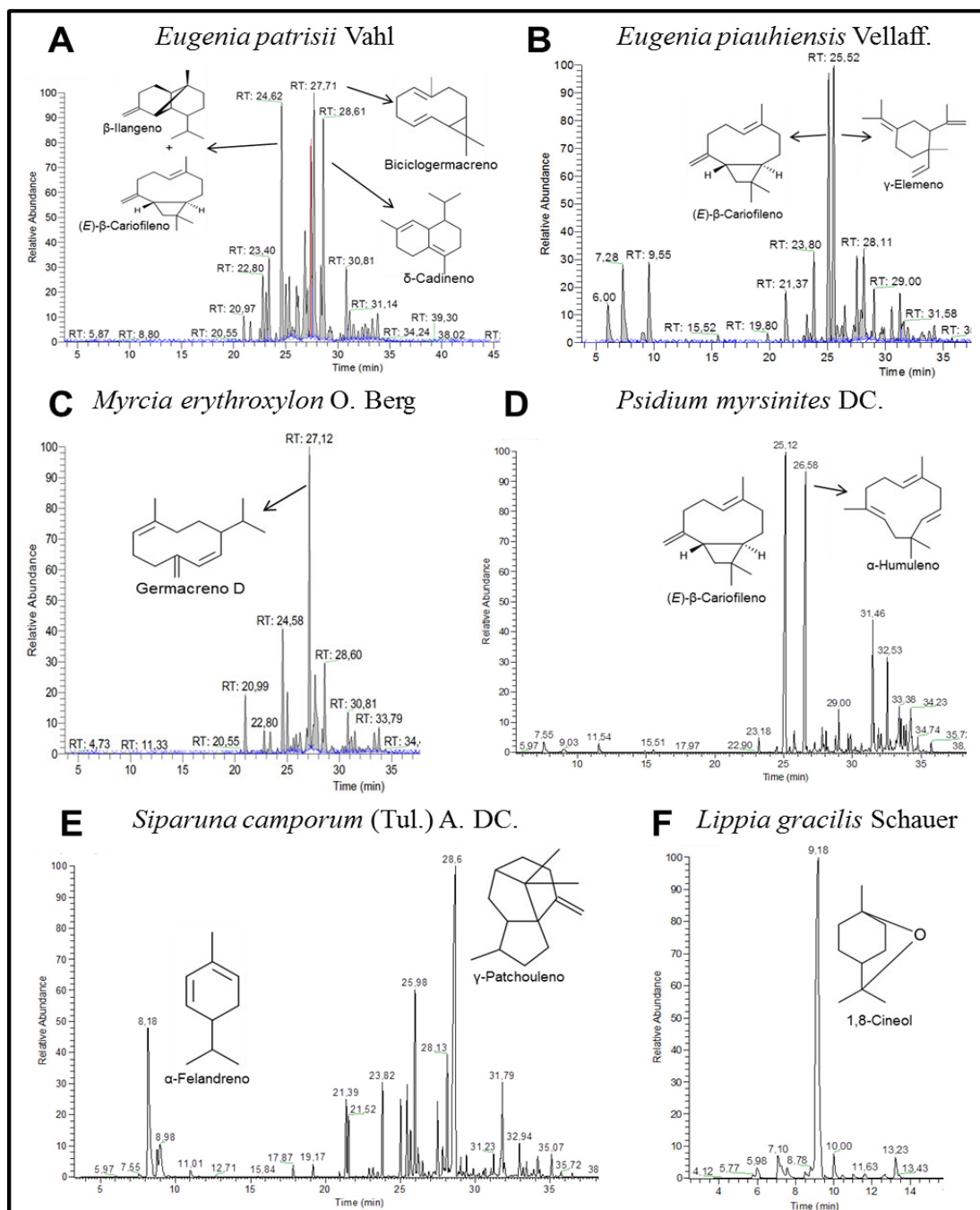


Figura 1 - Cromatogramas obtidos a partir da análise dos óleos essenciais de espécies vegetais da Amazônia Legal, Maranhão, Brasil, no cromatógrafo a gás Thermo modelo DSQ II; A – *Eugenia patrisii* Vahl; B – *Eugenia piauiensis* Vellaff.; C – *Myrcia erythroxylon* O. Berg; D - *Psidium myrsinites* DC.; E - *Siparuna camporum* (Tul.) A. DC.; F – *Lippia gracilis* Schauer

Tabela 2 - Principais constituintes dos óleos essenciais de espécies vegetais da Amazônia Legal, Maranhão, Brasil, testados contra as larvas de *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae)

Constituintes / Classes	IR	Espécies vegetais / %					
		Epa	Epi	Me	Pm	Sc	Lg
α -pineno	931	-	3,54	-	-	-	-
sabineno	977	-	-	-	-	-	2,72
β -pineno	977	-	7,08	-	-	-	6,22
myrceno	989	-	-	-	1,32	-	2,2
α -felandreno	1003	-	-	-	-	12,8	-
α -terpineno	1017	-	-	-	-	-	0,92
<i>p</i> -cimeno	1024	-	-	-	-	1,5	1,35
limoneno	1029	-	1,27	-	-	4,9	-
1,8-cineol	1034	0,1	-	-	0,66	-	56,16
(<i>E</i>)- β -ocimeno	1046	-	5,52	-	-	-	-
γ -terpineno	1059	-	-	-	-	-	3,55
α -terpinoleno	1085	-	-	-	-	0,41	-
linalol	1100	-	-	-	0,78	-	-
<i>trans</i> -pinocarveol	1140	-	-	-	-	-	3,42
δ -terpineol	1167	-	-	-	-	-	1,02
terpine-4-ol	1180	-	-	-	-	-	3,83
α -terpineol	1186	-	0,43	-	-	-	12,09
geraniol	1256	-	-	-	-	0,49	-
acetato do óxido de (<i>E</i>)-linalol	1286	-	-	-	-	0,46	-
δ -elemeno	1335	1,34	3,49	-	-	4,9	-
α -cubebeno	1349	0,98	-	-	-	-	-
α -copaeno	1378	3,77	1,5	1,85	-	0,38	-
β -bourboneno	1386	2,41	0,57	-	-	-	-
β -elemeno	1390	4,14	4,79	2,41	-	3,29	-
α -gurjuneno	1412	0,49	-	0,52	0,43	-	-
β -ilangeno e (<i>E</i>)- β -cariofileno	-	11,62	-	-	-	-	-
(<i>E</i>)- β -cariofileno	1419	-	16,46	10,55	26,05	3,17	1,12

Cont.

Continuação tabela 2

Constituintes / Classes	IR	Espécies vegetais / %					
		Epa	Epi	Me	Pm	Sc	Lg
β -gurjuneno	1432	2,51	-	4,71	-	3,36	-
γ -elemeno	1434	-	17,48	5,38	-	-	-
α -guaiano	1438	0,75	-	-	-	1,94	-
aromadendreno	1440	2,68	2,29	1,06	1,4	-	-
guaiadieno 6,9	1444	-	-	-	-	9,23	-
<i>trans</i> -muurola-3,5-dieno	1450	-	-	-	-	1,47	-
α -humuleno	1455	4,64	2,18	-	23,92	0,69	1,49
<i>allo</i> -aromadendreno	1462	-	-	2,64	-	-	-
biciclogermacreno	1470	13,78	8,11	13,26	-	5,11	-
γ -muuroleno	1480	9,46	0,91	-	0,63	-	-
germacreno D	1482	-	5,64	26,79	-	-	-
γ -patchouleno	1484	-	-	-	-	28,63	-
β -selineno	1487	11,11	1,23	-	1,95	1,6	-
α -selineno	1496	-	-	-	1,25	-	-
viridifloreno	1497	-	1,42	-	-	-	-
α -muuroleno	1501	-	-	-	-	3,76	-
δ -cadineno	1523	14,87	2,95	9,63	-	0,72	-
zonareno	1526	-	-	-	3,53	-	-
α -cadineno	1539	1,51	-	1,22	-	-	-
selina-3,7(11)-dieno	1542	-	-	-	2,05	0,57	-
germacreno B	1558	-	1,99	-	-	-	-
espatulenol	1578	3,46	2,5	3,25	-	1,33	-
óxido de cariofileno	1581	-	-	-	10,09	-	-
globulol	1585	-	-	4,16	-	-	-
viridiflorol	1590	2,92	2,33	-	2,19	5,02	-
epóxido de humuleno II	1601	-	-	-	6,37	-	-
epi-cubenol	1626	1,24	-	-	-	2,14	-
cariofiladienol II	1631	-	-	-	5,66	-	-
epi- α -cardinol	1639	-	-	-	2,73	-	-
τ -muurolol	1640	3,01	0,81	2,26	-	0,36	-
α -cadinol	1654	-	1,05	2,25	3,81	1,09	-

Cont.

Continuação tabela 2

Constituintes / Classes	IR	Espécies vegetais / %					
		Epa	Epi	Me	Pm	Sc	Lg
Monoterpenos hidrocarbonados	-	-	17,41	-	1,32	19,61	16,96
Monoterpenos oxigenados	0,1	0,43	-	-	1,44	0,95	81,07
Sesquiterpenos hidrocarbonados	86,06	71,01	80,02	61,21	68,87	2,61	
Sesquiterpenos oxigenados	10,63	6,69	11,92	30,85	9,94	-	
Total		96,79	95,54	91,94	94,82	99,37	99,64

Condições de análise: Cromatógrafo a gás acoplado a Espectrômetro de massas THERMO modelo DSQ II; constituintes químicos identificados a partir da comparação dos seus espectros de massas com espectros existentes na literatura (NIST 2005; Adams 2007). Legenda: IR: Índice de Retenção; Epa: *Eugenia patrisii* Vahl; Epi: *Eugenia piauiensis* Vellaff.; Me: *Myrcia erythroxylon* O. Berg; Pm: *Psidium myrsinites* DC.; Sc: *Siparuna camporum* (Tul.) A. DC.; Lg: *Lippia gracilis* Schauer.

Tabela 3 - Determinação das concentrações médias letais de 50% dos indivíduos (CL₅₀) apresentada pelos óleos essenciais de espécies vegetais da Amazônia Legal, Maranhão, Brasil, contra *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) (n = 10) após 24h de exposição

Espécie vegetal	CL ₅₀ ^a (mg/L)
<i>Eugenia patrisii</i> Vahl	417 (360 – 504) ^b
<i>Eugenia piauiensis</i> Vellaff.	230 (194 – 306) ^b
<i>Myrcia erythroxylon</i> O. Berg	- ^c
<i>Psidium myrsinites</i> DC.	292 (212 – 386) ^b
<i>Siparuna camporum</i> (Tul.) A. DC.	251 (207 – 312) ^b
<i>Lippia gracilis</i> Schauer	282 (259 – 306) ^b

^a CL₅₀ determinada através da análise de probitos, usando programa SPSS 13.0; ^b Intervalo de confiança de 95%; ^c O óleo essencial de *Myrcia erythroxylon* não causou mortalidade as larvas de *A. aegypti*. (Não houve mortalidade das larvas no controle negativo, que continha solução de DMSO a 0,01%; já o controle positivo, com temefós a 1 mg/L, induziu 100% de mortalidade das larvas).

4 Discussão

A composição dos óleos essenciais de uma mesma espécie vegetal pode variar com fatores genéticos, ambientais e fisiopatológicos, que influenciam no metabolismo do vegetal. O conteúdo total e as proporções relativas dos metabólitos secundários nas plantas podem ser regulados por fatores bióticos e abióticos, como a época, o local e o horário da coleta da planta (Sangwan *et al.* 2001; Gobbo-Neto e Lopes 2007; Pavarini *et al.* 2012).

Embora possa haver essa variação, Maia *et al.* (2010) demonstraram que o óleo das folhas de *P. myrsinites* apresenta como constituintes majoritários (*E*)- β -cariofileno (28,7%) e α -humuleno (19,4%), havendo uma concordância com nosso trabalho. No estudo Maia *et al.* (2010), a amostra foi coletada em Anapurus, município localizado na região do Cerrado maranhense; a similaridade entre o perfil químico deste espécime com o do analisado no presente trabalho pode ser explicada pelo fato de que ambos os espécimes foram coletados na flora do Cerrado, sofrendo condições climáticas semelhantes.

Por outro lado, o resultado referente ao óleo essencial de *L. gracilis* difere de outros trabalhos. O óleo essencial de *L. gracilis*, no presente estudo, apresentou o 1,8-cineol como constituinte majoritário; enquanto que, outros estudos relataram o carvacrol como componente principal deste óleo, quando este foi obtido de espécimes coletados em outros estados do nordeste brasileiro (Ceará e Pernambuco) (Albuquerque *et al.* 2006; Neto *et al.* 2010). Mendes *et al.* (2010) identificaram timol (24,1%), *p*-cimenol (15,9%) e 1,8-cineol (4,8%) entre os constituintes químicos do óleo essencial de *L. gracilis* cultivada no município de São Cristóvão, estado de Sergipe, nordeste brasileiro.

No presente trabalho, procurou-se, também, estabelecer o potencial larvicida contra *A. aegypti* dos óleos essenciais estudados, segundo critério estabelecido por Komalamisra *et al.* (2005). Diversos estudos têm demonstrado o alto potencial larvicida de óleos essenciais de plantas do Cerrado e do nordeste brasileiro (Santos *et al.* 2006; Porto *et al.* 2008; Lima *et al.* 2011).

Cinco dos seis óleos essenciais estudados em nosso trabalho teve o seu potencial larvicida contra *A. aegypti* descrito pela primeira vez na literatura; somente o óleo essencial de *L. gracilis* já havia sido avaliado frente a estas larvas. Santiago *et al.* (2006) e Silva *et al.* (2008) determinaram para o óleo desta espécie valores de CL₅₀ de 26 e 98 mg/L, respectivamente. Estes valores são bastante diferentes do encontrado para esta espécie em nosso trabalho (CL₅₀ 282 mg/L); esta diferença pode ser explicada pela variação na constituição química destes óleos. Nos estudos realizados pelos autores supracitados, o constituinte majoritário dos óleos foi o monoterpene oxigenado carvacrol, como já referido; enquanto que no presente trabalho, foi o 1,8-cineol. Constituições químicas diferentes podem justificar possíveis respostas biológicas diferentes.

Os óleos de *E. piauhiensis* e *S. camporum* foram considerados os mais promissores, dentre os testados, com CL₅₀ de 230 e 251 mg/L, respectivamente. Os óleos essenciais de espécies de Myrtaceae têm sido considerados ativos contra larvas de *A. aegypti* (Park *et al.* 2011). Espécies pertencentes ao gênero *Eugenia* L. e *Psidium* L. já tiveram seus óleos testados contra larvas de *A. aegypti* e foram consideradas ativas; *Eugenia melanadenia* Krug & Urb., *Psidium guajava* L. e *Psidium rotundatum* Griseb. apresentaram CL₅₀ de 85, 24 e 63 mg/L (Aguilera *et al.* 2003; Lima *et al.* 2011).

Entre os óleos testados, somente o de *M. erythroxylon* foi considerado inativo para a atividade larvicida. Entretanto, o óleo essencial das folhas de outra espécie desse gênero, *M. ovata* Cambess., apresentou CL₅₀ de 192 mg/L (Lima *et al.* 2011).

5 Conclusão

O uso de produtos obtidos de plantas, como os óleos essenciais, para a produção de larvicidas naturais é uma ferramenta promissora para o controle da dengue. Estes produtos são considerados fontes naturais de substâncias inseticidas para as várias fases de desenvolvimento de mosquitos, além de serem biodegradáveis e apresentarem baixa toxicidade para organismos não alvos.

As larvas de *A. aegypti* foram suscetíveis a cinco dos seis óleos essenciais testados neste trabalho; os resultados aqui apresentados incentivam o desenvolvimento de um efetivo larvicida baseado nesses óleos essenciais.

Estudos complementares serão realizados com o propósito de purificar, isolar e testar os constituintes ativos presentes nestes óleos. Assim será possível confirmar se a atividade larvicida deles é devido aos seus constituintes majoritários ou a um efeito sinérgico da mistura. Além disso, serão realizados estudos referentes à variabilidade sazonal dos constituintes destes óleos e à determinação da toxicidade destes (toxicidade aguda, mutagenicidade, carcinogenicidade), para determinar a segurança de seu uso.

Referências

- Adams, R.P. 2007. *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry*. 4th ed. Allured, Carol Stream, 2007, 804p.
- Aguilera, L.; Navarro, A.; Tacoronte, J.E.; Leyva, M.; Marquetti, M.C. 2003 Efecto letal de myrtaceas cubanas sobre *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Revista Cubana de Medicina Tropical* 55:100–104
- Albuquerque, C.C.; Camara, T.R.; Mariano, R.L.R.; Willadino, L.; Marcelino-Jr, C.; Ulisses, C. 2006. Antimicrobial action of the essential oil of *Lippia gracilis* Schauer. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 49(4): 527-535.
- Aragão, G.G.; Conceição, G.M. 2008. Myrtaceae: espécies das subtribos Eugeniinae, Myrciinae e Myrtinae registradas para o estado do Maranhão. *Revista Sinapse Ambiental* 5: 7-17.
- Barbosa, J.D.F.; Silva, V.B.; Alves, P.B.; Gumina, G.; Santos, R.L.C.; Sousa, D.P.; Cavalcanti, S.C.H. 2012. Structure–activity relationships of eugenol derivatives against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae. *Pest Management Science* 68(11): 1478-1483. doi: 10.1002/ps.3331
- Braga, I.A.; Valle, D. 2007. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. *Epidemiologia e Serviços de Saúde* 16(4): 279-293.
- Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. 2002. *Programa Nacional de Controle da Dengue*. Ministério da Saúde: Brasília, 2002.
- Brasil. 2005. Decreto s/nº de 12 de dezembro de 2005. *Cria o Parque Nacional da Chapada das Mesas*, nos Municípios de Carolina, Riachão e Estreito, no Estado

do Maranhão, e dá outras providências. Legislação Federal, DOU DE 13/12/2005 P2.

Brasil. Ministério do Meio Ambiente. 2011. *Monitoramento do desmatamento nos biomas brasileiros por satélite*. Acordo de cooperação técnica MMA/IBama. Monitoramento do bioma cerrado 2008-2009. MMA: Brasília.

Cheng, S.S.; Chang, H.T.; Chang, S.T.; Tsai, K.H.; Chen, W.J. 2003. Bioactivity of selected plant essential oils against the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* larvae. *Bioresource Technology* 89(1): 99-102. doi: 10.1016/S0960-8524(03)00008-7

Consoli, R.A.G.B.; Oliveira, R.L. 1994. *Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil*. Rio de Janeiro: Fiocruz. 228 p.

Ferreira, G.L.C. 2012. Global dengue epidemiology trends. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 54(Supl. 18): S5-S6.

Gobbo-Neto, L.; Lopes, N.P. 2007. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova* 30(2): 374-381.

Govindarajan, M. 2010. Chemical composition and larvicidal activity of leaf essential oil from *Clausena anisata* (Willd.) Hook. f. ex Benth (Rutaceae) against three mosquito species. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 3(11): 874-877. doi: 10.1016/S1995-7645(10)60210-6

Govindarajan, M.; Sivakumar, R.; Rajeswari, M.; Yogalakshmi, K. 2012. Chemical composition and larvicidal activity of essential oil from *Mentha spicata* (Linn.) against three mosquito species. *Parasitology Research* 110(5): 2023-2032. doi: 10.1007/s00436-011-2731-7

- Gubler, D.J. 2011. Dengue, urbanization and globalization: the unholy trinity of the 21st Century. *Tropical Medicine and Health* 39(4): 3-11. doi: 10.2149/tmh.2011-S05
- Kiran, S.R.; Bhavani, K.; Devi, P.S.; Rao, B.R.R.; Reddy, K.J. 2006. Composition and larvicidal activity of leaves and stem essential oils of *Chloroxylon swietenia* DC against *Aedes aegypti* and *Anopheles stephensi*. *Bioresource Technology* 97(18): 2481-2484. doi: 10.1016/j.biortech.2005.10.003
- Komalamisra, N.; Trongtokit, Y.; Rongsriyam, Y.; Apiwathnasorn, C. 2005. Screening for larvicidal activity in some Thai plants against four mosquito vector species. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 36:1412-1422.
- Lima, M.A.A.; Oliveira, F.F.M.; Gomes, G.A.; Lavor, P.L.; Santiago, G.M.P.; Nagao-Dias, A.T.; Arriaga, A.M.C.; Lemos, T.L.G.; Carvalho, M.G. 2011. Evaluation of larvicidal activity of the essential oils of plants species from Brazil against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *African Journal of Biotechnology* 10: 11716-11720.
- Macoris, M.L.G. 2011. *Mecanismos de resistência de Aedes aegypti L. (Diptera: Culicidae) a inseticidas*. Tese de Doutorado, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo. 82p.
- Magalhães, L.A.M.; Lima, M.P.; Marques, M.O.M.; Facanali, R.; Pinto, A.C.S.; Tadei, W.P. 2010. Chemical composition and larvicidal activity against *Aedes aegypti* larvae of essential oils from four *Guarea* species. *Molecules* 15(8): 5734-5741. doi: 10.3390/molecules15085734
- Maia, J.G.S.; Zoghbi, M.G.B.; Santos, A.S.; Ramos, L.S. 1998. Óleos Essenciais da Amazônia: Inventário da Flora Aromática. In: Faria, L.J.G.; Costa, C.M.L. (Ed.). *Tópicos Especiais em Tecnologia de Produtos Naturais*. UFPA/NUMA/POEMA, Belém, p.127-146.

- Maia, J.G.S.; Carreira, L.M.M.; Andrade, E.H.A. 2010. Óleos essenciais de Mirtáceas do cerrado do Maranhão. In: 33^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. *Anais...*, Águas de Lindóia. Disponível em: <http://sec.sbq.org.br/eventos/33rasbq/resumos/T1302-1.pdf>. Acessado em: 21 de março de 2011.
- Mendes, S.S.; Bomfim, R.R.; Jesus, H.C.R.; Alves, P.B.; Blank, A.F.; Estevam, C.S.; Antonioli, A.R.; Thomazzi, S.M. 2010. Evaluation of the analgesic and anti-inflammatory effects of the essential oil of *Lippia gracilis* leaves. *Journal of Ethnopharmacology* 129: 391-397. doi: 10.1016/j.jep.2010.04.005
- Morrison, A.C.; Zielinski-Gutierrez, E.; Scott, T.W.; Rosenberg, R. 2008. Defining challenges and proposing solutions for control of the virus vector *Aedes aegypti*. *PLoS Medicine* 5(3): 362-366.
- Neto, R.M.; Matos, F.J.A.; Andrade, V.S.; Melo, M.C.N.; Carvalho, C.B.M.; Guimarães, S.B.; Pessoa, O.D.L.; Silva, S.L.; Silva, S.F.R.; Vasconcelos, P.R.L. 2010. The essential oil from *Lippia gracilis* Schauer, Verbenaceae, in diabetic rats. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 20(2): 261-266.
- NIST 05. 2005. *Mass spectral library* (NIST/EPA/NIH). National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg.
- OMS. 1995. *Vector Control for Malaria and other Mosquito-Borne. Diseases Report of a WHO Study Group*. WHO/TRS/857, Geneva, 1995, 100p.
- OMS. 2005. *Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides*. WHO/CDS/WHOPES/GCDPP/2005/3. 41p.

- OMS. 2006. *Pesticides and their application: for the control of vectors and pests of public health importance*. 6th ed. World Health Organization, Geneva, 2006, 125p.
- OMS. 2009. *Dengue: Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control*. 2. ed. World Health Organization, Geneva, 2009, 147p.
- OMS. 2012a. *Handbook for integrated vector management*. World Health Organization, Geneva, 2012, 78p.
- OMS. 2012b. *Global strategy for dengue prevention and control 2012-2020*. WHO Press, Geneva, 2012, 43p.
- Park, H.M.; Kim, J.; Chang, K.S.; Kim, B.S.; Yang, Y.J.; Kim, G.H.; Shin, S.C.; Park, I.K. 2011. Larvicidal activity of Myrtaceae essential oils and their components against *Aedes aegypti*, acute toxicity on *Daphnia magna*, and aqueous residue. *Journal of Medical Entomology* 48(2): 405-410. doi: 10.1603/ME10108
- Pavarini, D.P.; Pavarini, S.P.; Niehues, M.; Lopes, N.P. 2012. Exogenous influences on plant secondary metabolite levels. *Animal Feed Science and Technology* 176: 5-16
- Perumalsamy, H.; Kim, N.J.; Ahn, A.J. 2009. Larvicidal activity of compounds isolated from *Asarum heterotropoides* against *Culex pipiens pallens*, *Aedes aegypti*, and *Ochlerotatus togoi* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology* 46: 1420-1423.
- Pinheiro, F.; Nelson, M. 1997. Re-Emergence of dengue and emergence of dengue haemorrhagic fever in the Americas. *Dengue Bulletin* 21: 16-24.
- Porto, K.R.A.; Roel, A.R.; Silva, M.M.; Coelho, R.M.; Scheleder, E.J.D.; Jeller, A.H. 2008. Atividade larvica do óleo de *Anacardium humile* Saint Hill sobre *Aedes*

- aegypti (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 41: 586-589.
- Sangwan, N.S.; Farooqi, A.H.A.; Shabih, F.; Sangwan, R.S. 2001. Regulation of essential oil production in plants. *Plant Growth Regulation* 34: 3-21.
- Santiago, G.M.P.; Lemos, T.L.G.; Pessoa, O.D.L.; Arriaga, A.M.C.; Matos, F.J.A.; Lima, M.A.S.; Santos, H.S.; Lima, M.C.L.; Barbosa, F.G.; Luciano, J.H.S.; Silveira, E.R.; Menezes, G.H.A. 2006. Larvicidal activity against *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) of essential oils of *Lippia* species from Brazil. *Natural Products Communications* 1: 573-576.
- Santos, R.P.; Nunes, E.P.; Nascimento, R.F.; Santiago, G.M.P.; Menezes, G.H.A.; Silveira, E.R.; Pessoa, O.D.L. 2006. Chemical composition and larvicidal activity of the essential oils of *Cordia leucomalloides* and *Cordia curassavica* from the Northeast of Brazil. *Journal of Brazilian Chemical Society* 17: 1027-1030.
- Santos, S.R.L.; Melo, M.A.; Cardoso, A.V.; Santos, R.L.C.; Sousa, D.P.; Cavalcanti, S.C.H. 2011. Structure–activity relationships of larvicidal monoterpenes and derivatives against *Aedes aegypti* Linn. *Chemosphere* 84:150-153. doi: 10.1016/j.chemosphere.2011.02.018
- Silva, W.J.; Dória, G.A.A.; Maia, R.T.; Nunes, R.S.; Carvalho, G.A.; Blank, A.F.; Alves, P.B.; Marçal, R.M.; Cavalcanti, S.C.H. 2008. Effects of essential oils on *Aedes aegypti* larvae: Alternatives to environmentally safe insecticides. *Bioresource Technology* 99: 3251-3255.
- Simas, N.K.; Lima, E.C.; Conceição, S.R.; Kuster, R.M.; Oliveira-Filho, A.M. 2004. Produtos *Obalsamum* (óleo vermelho) e de terpenóides e fenilpropanóides. *Química Nova* 27: 46-49.

- Teixeira, M.G.; Barreto, M.L.; Guerra, Z. 1999. Epidemiologia e medidas de prevenção do dengue. *Informe Epidemiológico do SUS* 8(4): 5-33.
- Vieira, I.C.G.; Toledo, P.M.; Silva, J.M.C.; Higuchi, H. 2008. Deforestation and threats to the biodiversity of Amazonia. *Brazilian Journal of Biology* 68: 949-956.
- Vila, R.; Santana, A.I.; Pérez-Rosés, R.; Valderrama, A.; Castelli, M.V.; Mendonca, S.; Zacchino, S.; Gupta, M.P.; Cañigüeral, S. 2010. Composition and biological activity of the essential oil from leaves of *Plinia cerrocampanensis*, a new source of α -bisabolol. *Bioresource Technology* 101(7): 2510-4. doi: 10.1016/j.biortech.2009.11.021
- Vontas, J.; Kioulos, E.; Pavlidi, N.; Morou, E.; della Torre, A.; Ranson, H. 2012. Insecticide resistance in the major dengue vectors *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 104: 126-131. doi: 10.1016/j.pestbp.2012.05.008

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir do trabalho de revisão de óleos essenciais e seus constituintes com atividade larvicida contra *A. aegypti*, disposto no capítulo 1 dessa dissertação, foi possível concluir que:

- Os óleos essenciais obtidos de algumas espécies vegetais apresentam alto potencial larvicida contra *A. aegypti*;
- A atividade larvicida pode ser influenciada por diversos fatores, dentre eles aqueles inerentes à espécie vegetal, à origem das larvas e ao método empregado no teste;
- Na maioria dos óleos essenciais, foi observado que o efeito sinérgico entre os seus constituintes químicos permite uma maior ação larvicida contra *A. aegypti* em comparação com seus constituintes isolados;
- A lipofilicidade e a aromaticidade são características estruturais dos constituintes dos óleos essenciais que melhoram a atividade larvicida destes, dessa forma constituintes como (*E*)-nerolidol, benzoato de benzila e salicilato de benzila apresentaram os resultados mais promissores entre os constituintes;
- O modo de ação dos óleos essenciais e dos seus constituintes pode ocorrer por desnaturalização proteica, inibição enzimática e/ou desintegração da membrana.

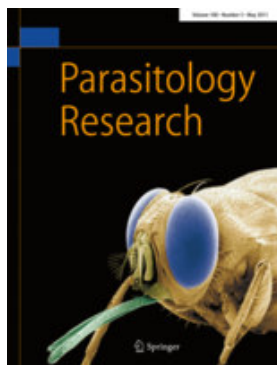
Na análise da composição química e avaliação da atividade larvicida contra *A. aegypti* de óleos extraídos de espécies da Amazônia Legal maranhense, exposto no capítulo 2 dessa dissertação, foi possível concluir que:

- Não foi observada uma relação entre rendimento e atividade larvicida, pois o óleo essencial com maior rendimento (*Lippia gracilis* Schauer – 7,99%) não foi considerado o mais ativo;
- Sesquiterpenos hidrocarbonados constituíram a maior fração dos óleos essenciais de espécies de Myrtaceae (*Eugenia patrisii* Vahl, *Eugenia piauiensis* Vellaff., *Myrcia erythroxylon* O. Berg, *Psidium myrsinites* DC.) e de Siparunaceae (*Siparuna camporum* (Tul.) A. DC.); enquanto que o óleo essencial da espécie de Verbenaceae (*L. gracilis*) apresentou monoterpenos oxigenados como constituintes majoritários;

- Dentre os seis óleos essenciais testados para atividade larvicida contra *A. aegypti*, um foi inativo (*M. erythroxylon*) e os outros foram considerados efetivos, com CL₅₀ entre 230 e 417 mg/L; este é um dado interessante, pois produção de larvicidas a base de óleos essenciais pode ser um processo de menor custo que o necessário para o isolamento ou síntese de compostos ativos;
- Os óleos de *E. piauhiensis* e *S. camporum* apresentaram os resultados mais promissores, podendo apresentar potencial para serem empregados na obtenção de produtos larvicidas para controle da dengue.

ANEXOS

ANEXO 1



Parasitology Research

Founded as Zeitschrift für Parasitenkunde

Editors: H. Mehlhorn; B. Chobotar

ISSN: 0932-0113 (print version)

ISSN: 1432-1955 (electronic version)

Journal no. 436

Instructions for Authors

Instructions for Authors

MANUSCRIPT SUBMISSION

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Authors should submit their manuscripts online. Electronic submission substantially reduces the editorial processing and reviewing times and shortens overall publication times. Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

Costs of Colour Illustrations

- Online publication of color illustrations is always free of charge.
- For color in the print version, authors will be expected to make a contribution towards the extra costs of EUR 950 / US\$ 1150 (+ local tax) per article, irrespective of the number of figures in it.

TITLE PAGE

Title Page

The title page should include:

- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
- The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

TEXT

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

- ✎ Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- ✎ Use italics for emphasis.
- ✎ Use the automatic page numbering function to number the pages.
- ✎ Do not use field functions.
- ✎ Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- ✎ Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- ✎ Use the equation editor or MathType for equations.
- ✎ Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Word template (zip, 154 kB)

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

LaTeX macro package (zip, 182 kB)

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section before the reference list. The names of funding organizations should be written in full.

SCIENTIFIC STYLE

Please always use internationally accepted signs and symbols for units, SI units.

REFERENCES

Citation

Cite references in the text by name and year in parentheses. Some examples:

- Negotiation research spans many disciplines (Thompson 1990).
- This result was later contradicted by Becker and Seligman (1996).
- This effect has been widely studied (Abbott 1991; Barakat et al. 1995; Kelso and Smith 1998; Medvec et al. 1999).

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

Reference list entries should be alphabetized by the last names of the first author of each work.

✚ Journal article

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long author lists will also be accepted:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 341:325–329

✚ Article by DOI

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. doi:10.1007/s001090000086

✚ Book

South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London

✚ Book chapter

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

✚ Online document

Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

✚ Dissertation

Trent JW (1975) *Experimental acute renal failure*. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see

www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

EndNote style (zip, 3 kB)

TABLES

- ⌘ All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- ⌘ Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- ⌘ For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- ⌘ Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
- ⌘ Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

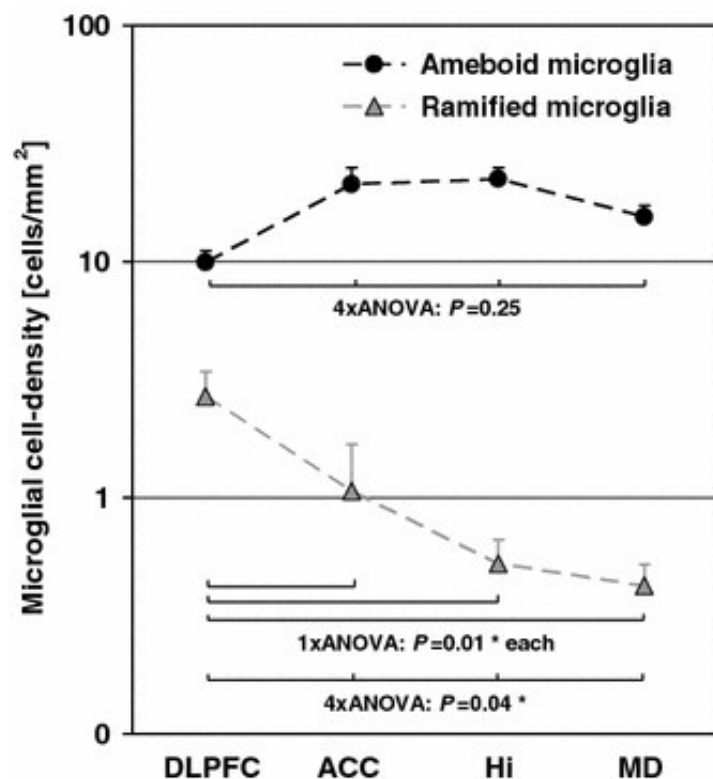
ARTWORK AND ILLUSTRATIONS GUIDELINES

For the best quality final product, it is highly recommended that you submit all of your artwork – photographs, line drawings, etc. – in an electronic format. Your art will then be produced to the highest standards with the greatest accuracy to detail. The published work will directly reflect the quality of the artwork provided.

Electronic Figure Submission

- ⌘ Supply all figures electronically.
- ⌘ Indicate what graphics program was used to create the artwork.
- ⌘ For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MS Office files are also acceptable.
- ⌘ Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.
- ⌘ Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

Line Art

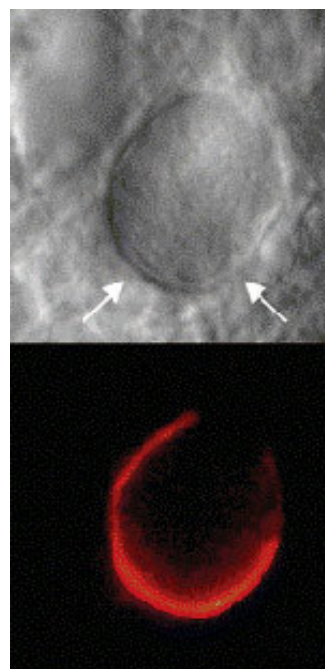


- ⌘ Definition: Black and white graphic with no shading.
- ⌘ Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.
- ⌘ All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.
- ⌘ Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.

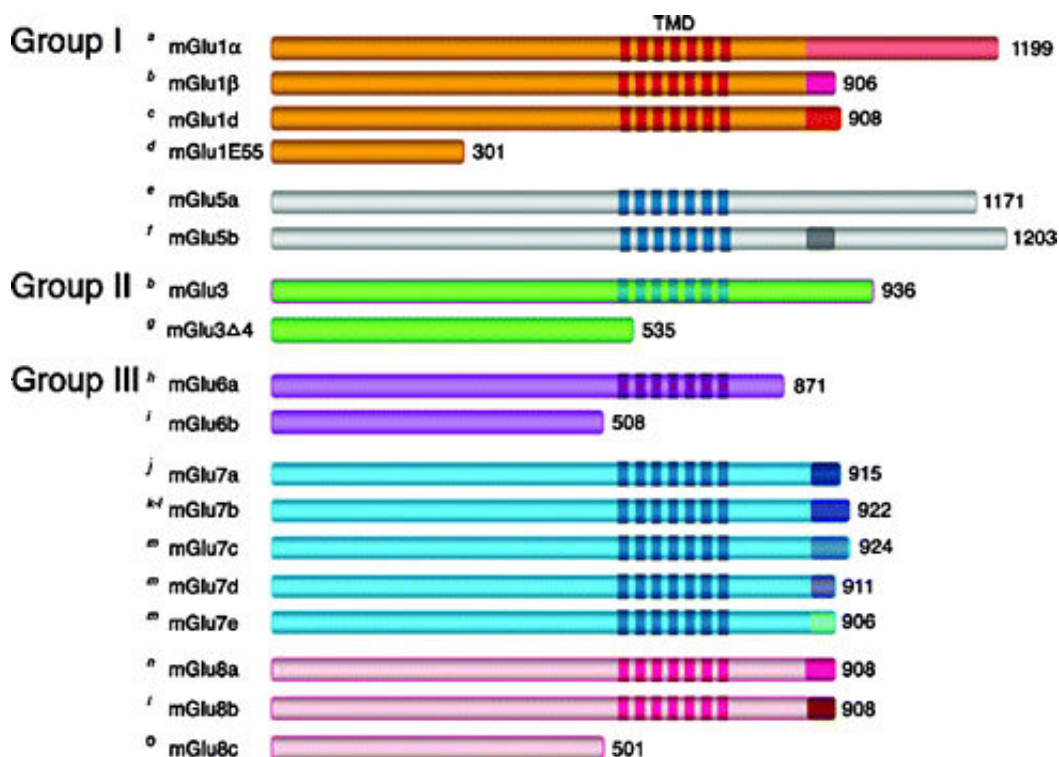
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Halftone Art

- Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.
- If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.
- Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.



Combination Art



- Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.
- Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

Color Art

- Color art is free of charge for online publication.
- If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the

necessary distinctions between the different colors are still apparent.

- If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.
- Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

Figure Lettering

- ✎ To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).
- ✎ Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).
- ✎ Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.
- ✎ Avoid effects such as shading, outline letters, etc.
- ✎ Do not include titles or captions within your illustrations.

Figure Numbering

- All figures are to be numbered using Arabic numerals.
- Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.
- Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).
- If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

Figure Captions

- ✎ Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.
- ✎ Figure captions begin with the term Fig. in bold type, followed by the figure number, also in bold type.
- ✎ No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.
- ✎ Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.
- ✎ Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

Figure Placement and Size

- When preparing your figures, size figures to fit in the column width.
- For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.
- For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.

Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

- All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software

or a text-to-Braille hardware)

- Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (color-blind users would then be able to distinguish the visual elements)
- Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

ELECTRONIC SUPPLEMENTARY MATERIAL

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

Submission

- Supply all supplementary material in standard file formats.
- Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.
- To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.

Audio, Video, and Animations

- Always use MPEG-1 (.mpg) format.

Text and Presentations

- Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability.
- A collection of figures may also be combined in a PDF file.

Spreadsheets

- Spreadsheets should be converted to PDF if no interaction with the data is intended.
- If the readers should be encouraged to make their own calculations, spreadsheets should be submitted as .xls files (MS Excel).

Specialized Formats

- Specialized format such as .pdb (chemical), .wrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

Collecting Multiple Files

- It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

Numbering

- If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.
- Refer to the supplementary files as "Online Resource", e.g., "... as shown in the animation (Online Resource 3)", "... additional data are given in Online Resource 4".
- Name the files consecutively, e.g. "ESM_3.mpg", "ESM_4.pdf".

Captions

- For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.

Processing of supplementary files

- Electronic supplementary material will be published as received from the author without

any conversion, editing, or reformatting.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that

- The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material
- Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk)

AFTER ACCEPTANCE

Upon acceptance of your article you will receive a link to the special Author Query Application at Springer's web page where you can sign the Copyright Transfer Statement online and indicate whether you wish to order OpenChoice, offprints, or printing of figures in color.

Once the Author Query Application has been completed, your article will be processed and you will receive the proofs.

Open Choice

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly through Springer's online platform SpringerLink.

Springer Open Choice

Copyright transfer

Authors will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher (or grant the Publisher exclusive publication and dissemination rights). This will ensure the widest possible protection and dissemination of information under copyright laws.

Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, the author(s) agree to publish the article under the Creative Commons Attribution License.

Offprints

Offprints can be ordered by the corresponding author.

Color illustrations

Online publication of color illustrations is free of charge. For color in the print version, authors will be expected to make a contribution towards the extra costs.

Proof reading

The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the completeness and accuracy of the text, tables and figures. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the Editor.

After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article.

Online First

The article will be published online after receipt of the corrected proofs. This is the official first publication citable with the DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.

DOES SPRINGER PROVIDE ENGLISH LANGUAGE SUPPORT?

Manuscripts that are accepted for publication will be checked by our copyeditors for spelling and

formal style. This may not be sufficient if English is not your native language and substantial editing would be required. In that case, you may want to have your manuscript edited by a native speaker prior to submission. A clear and concise language will help editors and reviewers concentrate on the scientific content of your paper and thus smooth the peer review process.

The following editing service provides language editing for scientific articles in:

Medicine, biomedical and life sciences, chemistry, physics, engineering, business/economics, and humanities

Edanz Editing Global

Use of an editing service is neither a requirement nor a guarantee of acceptance for publication.

Please contact the editing service directly to make arrangements for editing and payment.

For Authors from China

文章在投稿前进行专业的语言润色将对作者的投稿进程有所帮助。作者可自愿选择使用Springer推荐的编辑服务, 使用与否并不作为判断文章是否被录用的依据。提高文章的语言质量将有助于审稿人理解文章的内容, 通过对学术内容的判断来决定文章的取舍, 而不会因为语言问题导致直接退稿。作者需自行联系Springer推荐的编辑服务公司, 协商编辑事宜。

理文编辑

For Authors from Japan

ジャーナルに論文を投稿する前に、ネイティブ・スピーカーによる英文校閲を希望されている方には、Edanz社をご紹介します。サービス内容、料金および申込方法など、日本語による詳しい説明はエダンズグループジャパン株式会社の下記サイトをご覧ください。

エダンズ グループ ジャパン

For Authors from Korea

영어 논문 투고에 앞서 원어민에게 영문 교정을 받고자 하시는 분들께 Edanz 회사를 소개해 드립니다. 서비스 내용, 가격 및

신청 방법 등에 대한 자세한 사항은 저희 Edanz Editing Global 웹사이트를 참조해 주시면 감사하겠습니다.

Edanz Editing Global

INTEGRITY OF RESEARCH AND REPORTING

Ethical standards

Manuscripts submitted for publication must contain a declaration that the experiments comply with the current laws of the country in which they were performed. Please include this note in a separate section before the reference list.

Conflict of interest

All benefits in any form from a commercial party related directly or indirectly to the subject of this manuscript or any of the authors must be acknowledged. For each source of funds, both the research funder and the grant number should be given. This note should be added in a separate section before the reference list.

If no conflict exists, authors should state: The authors declare that they have no conflict of interest.

ANEXO 2



INSTRUCTIONS TO AUTHORS

ISSN 0044-5967 *printed
version*

Submission Preparation Checklist

It is expected that manuscripts submitted to Acta Amazonica are prepared according to the Author Guidelines. Thus, please be sure your manuscript follows these guidelines before uploading your submission. Manuscripts that do not adhere to Journal's instructions are returned to authors.

1. Maximum size of the file should be 3MB.
2. A letter submitting the manuscript (cover letter) should state that:
 - a) The research data are original and accurate; b) all the authors participated substantially and are prepared to assume public responsibility for its content; c) the contribution presented to this journal has not previously been published, nor it has been submitted for publication elsewhere, entirely or in part. The cover letter should be uploaded at the Journal's web site as a "supplementary document".
3. Manuscripts are accepted in Portuguese, Spanish, or English, but the Editorial Board encourages contributions in English. It should be noted that the veracity of the information contained in the manuscript is exclusive responsibility of authors.
4. Maximum length for articles and reviews is 30 pages (or 7500 words, keeping out the first page, see item 8), including bibliography, tables, figures and legends; ten pages (2500 words) for short communications; and five pages for other contributions. Tables and figures should be inserted at the end of the text, in this sequence. In addition, a copy of figures must be uploaded in the Journal Web site upon submission (see items 24-31).
5. Manuscripts properly formatted according to "Instruction to authors" are sent to Associate Editors for pre-evaluation. In this first judgment it is taken into consideration the scientific relevance and intelligibility of the manuscript, and its scope within the Amazonian context. In this phase, contributions out of the scope of the Journal or of little scientific relevance are declined by the editors. Manuscripts approved in the first judgment are sent to scientific referees for evaluation, at least two reviewers; experts of institutions other than those of the authors.
6. A contribution can be considered for publication if it has received at least two positive opinions in the evaluation process. Approval of manuscripts will be based on the scientific content and the adequate presentation according to the Journal format.

7. Manuscripts requiring corrections will be returned to the authors for revision. The revised version needs to be returned to the Associate Editor in TWO weeks' time. A response letter is expected to be uploaded in the Journal system detailing corrections that have been made. In this letter, recommendations not incorporated into the revised version, if any, need to be responded. The entire process is online, and can be followed at the Journal Web site, <http://sbmission.scielo.br/index.php/aa/login>.

8. The manuscript organization should follow this order; in the first pages: Title, authorship, and institutional and electronic address. In the following pages: Title, Abstract, Keywords; Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgements (including financial support), and References. Figures and tables (with legends) are to be inserted at the end of the manuscript. For submissions presented in Portuguese or Spanish it is also required: title, abstract and keywords in English. Likewise, for submission in English is also required: title, abstract and keywords in Portuguese.

9. Short communications are to be written separating the topics (Introduction, etc) in paragraphs, but without including their titles. They also have to include: Title, authorship, institutional and electronic address and all the topics of the full article. Three figures and two tables are permitted. The format of the first page and that of the References are the same as for the full article.

10. Full name(s) of the author(s), with the last name in capital letters, and complete address of authors and Institution(s), including telephone, fax, e-mail must be recorded on the Journal system when submitting the manuscript.

11. IMPORTANT NOTE: Manuscripts not properly formatted according to "Instructions to authors" are NOT accepted for publication.

FORMAT AND STYLE

12. The manuscript is to be prepared with a text editor (doc, docx or rtf extension), typed using "Times New Roman" 12-point font. It should be double-spaced with 3-cm margins; pages and lines consecutively numbered.

13. Title. Adjust to the left; capitalize first letter of sentence.

14. Abstract up to 250 words (150 for short communications) must contain succinctly, the objective, methodology; results and conclusions, emphasizing important aspects of the study. Scientific names of species and other Latin terms should be in italic.

15. Keywords. They must consist of three to five terms. Each keyword term may consist of two or more words. However, words used in the title cannot be repeated as keywords.

16. Introduction. Should emphasize the purpose of the study and supply a brief summary of previous relevant studies, as well as clearly state the objectives or hypotheses to be tested. Do not anticipate data or conclusions of the manuscript in this section.

17. Materials and Methods. Should contain enough information, chronologically organized to explain the procedures carried out, in such a way that other researches can be able to repeat the study. Statistical treatments of data should be described. Standard techniques need only be referenced. Measuring units and their

abbreviations should follow the International System and, when necessary, should include a list of the abbreviations utilized. Specific instruments used in the study should be described (model, manufacturer, city and country of manufacturing). Voucher material (sample for future reference) should be deposited in one or more scientific collections and informed in the manuscript.

18. Ethics and legal aspects: For studies that requires special permissions (e.g. Ethic Committee/National Commission of Ethic in Research-CONEP, IBAMA, CNTBio, INCRA/FUNAI, EIA/RIMA, others) the registration/approval number (and publishing date) must be informed.

19. Results. Should present a concise description of information obtained, with a minimum of personal judgment. Do not repeat in the text all the data contained in tables and illustrations. Numeral should be one space-separated from units. For example, 60 °C and NOT 60°C, except for percentages (for instance, 5% and NOT 5 %). Use units and symbols of the international system and exponential symbolism. For example: cmol kg⁻¹ instead of meq/100g. Do not present the same information (data) in tables and figures simultaneously.

20. Discussion. The discussion should focus on results obtained. Avoid mere speculation. However, well based hypotheses can be incorporated. Only relevant references should be included. Conclusions should contain a concise interpretation of main results and a final message, which should highlight the scientific implications of the study. Conclusions can be included at the end of the discussion or as a separated section.

21. Acknowledgements (including financial support) should be brief and concise.

22. References. At least 70% of references must be scientific journal articles. Citations should preferentially be from last 10 years. It is suggested not to exceed 40 references. They should be cited in alphabetic order of author names, and should be restricted to citation included in the text. In this section, the journal title is NOT abbreviated. Please see the examples below:

a) Articles from periodicals:

Walker, I. 2009. Omnivory and resource - sharing in nutrient - deficient Rio Negro waters: Stabilization of biodiversity? *Acta Amazonica*, 39: 617-626.

Alvarenga, L.D.P.; Lisboa, R.C.L. 2009. Contribuição para o conhecimento da taxonomia, ecologia e fitogeografia de briófitas da Amazônia Oriental. *Acta Amazonica*, 39: 495-504.

b) Dissertations and theses:

Ribeiro, M.C.L.B. 1983. *As migrações dos jaraquis (Pisces: Prochilodontidae) no rio Negro, Amazonas, Brasil*. Dissertação de Mestrado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Fundação Universidade do Amazonas, Manaus, Amazonas. 192p.

c) Books:

Steel, R.G.D.; Torrie, J.H. 1980. *Principles and procedures of statistics: a biometrical approach*. 2nd ed. McGraw-Hill, New York, 1980, 633p.

d) Books chapters:

Absy, M.L. 1993. Mudanças da vegetação e clima da Amazônia durante o Quaternário. In: Ferreira, E.J.G.; Santos, G.M.; Leão, E.L.M.; Oliveira, L.A. (Ed.). *Bases científicas para estratégias de preservação e desenvolvimento da Amazônia*. v.2. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas, p.3-10.

e) Citation of electronic Source:

CPTEC, 1999. Climanalise, 14: 1-2 (www.cptec.inpe.br/products/climanalise). Accessed on 19/05/1999.

23. In the text, citations of references follow a chronological order. For two or more references from the same year cite according to alphabetical order. Please see the following examples.

a) One author:

Pereira (1995) or (Pereira 1995).

b) Two authors:

Oliveira and Souza (2003) or (Oliveira and Souza 2003).

c) Three or more authors:

Rezende *et al.* (2002) or (Rezende *et al.* 2002).

d) Citations from different years (chronological order):

Silva (1991), Castro (1998) and Alves (2010) or (Silva 1991; Castro 1998; Alves 2010).

e) Citations in the same year (alphabetical order):

Ferreira *et al.* (2001) and Fonseca *et al.* (2001); or (Ferreira *et al.* 2001; Fonseca *et al.* 2001).

FIGURES

24. Photographs, drawings and graphics should have high definition, with high black and white contrast, numbered sequentially in Arabic numerals. The figure legend must be at the bottom of the figure. Do NOT use grey tones in scatter graphs or bar charts. In scatter graphs black and white (solid, dotted or dashed) lines and symbols open or solid (circle, square, triangle or diamond) can be used. For bar charts, black, white, striped or dotted bars can be used.

Border the plotting area with a thin solid line, but do NOT use a border line in the graphic area. Avoid unnecessary legends in the plotting area. Do NOT use letters too small (< size 10) in figures (either in title axes or within the plotting area). In axes (vertical, horizontal), use inward marks in scale divisions. Do NOT use horizontal or vertical grid lines, except in maps or similar illustrations. Meaning of acronyms used in figures must be described in the figure legend.

25. Figures should be limited to seven (7) in articles, and to three (3) in short communications, and should be of high quality.

26. Figures should be formatted to fit within the page dimensions of the Journal, namely, within a column (8 cm) or the width of the entire page (17 cm), and allowing space for the figure legend (caption). Illustrations can be resized during the production process in order to optimize Journal space. Scales should be indicated by a line or bar (horizontal) in the figure and, if necessary, referenced in the figure legend, for example, bar = 1 mm.

27. Figures in the text, with initial letter capitalized, can be cited directly or indirectly (in parenthesis). For example: Figure 1 or (Figure 1). In the caption, figure number should be followed by a period. For example: "Figure 1. Analysis..."

28. For figures that have been previously published, the authors should clearly state in the manuscript that a permission for reproduction has been granted. The document that conceded such authorization should be uploaded in the Journal system.

29. Photographs and illustrations (bitmap) should be in the tiff or jpeg format, with high resolution (at least 300 dpi). For scatter graphs use xls, xlsx, eps, cdr or ai format. Each figure included in the text should also be uploaded at the Journal's web site as an individual file, a "supplementary document".

30. Photographs are expected to be black and white, preferably. Color photographs can be accepted; however, there is a printing cost, which is charged to authors. Alternatively and without costs to authors, a color figure can be used in the Journal electronic version (if this is essential); whereas a black and white version of the same figure can be used in the printed version.

31. Authors can be invited to submit a color photograph to illustrate the Journal cover page. In this case, the printing cost will be afforded by the Journal.

TABLES

32. Tables should be well organized and numbered sequentially with Arabic numerals. A maximum of five tables is permitted for articles and two for short communication. The numbering and the title (self-explanatory) should be at top of the table. A table may have footnotes. Meaning of acronyms used in tables (head columns, etc) must be detailed in the table title.

33. Tables should be generated using a text editor (extension rtf, doc or docx), and should not be inserted in the manuscript as a figure (e.g. in jpg format).

34. Citations in the text can be made directly or indirectly (in parenthesis), with the initial letter capitalized. For example: Table 1 or (Table 1). In the table legend, the table number should be

followed by a period, for instance: "Table 1. Analysis..."

ADDITIONAL INFORMATION

1. Acta Amazonica can make minor formatting and grammar corrections in the manuscript to adjust to editorial and language standard. Finally, the proof is sent to authors for a last verification. In this phase only typographical or spelling mistakes can be corrected in the proof. NO major changes can be made on the manuscript at this stage, otherwise the entire manuscript could return to the evaluation process by the Editorial Board.

2. Acta Amazonica does not charge a fee for publication. Further information can be obtained by e-mail acta@inpa.gov.br. If your inquiry is about a submission please inform the submission number.

3. Subscriptions to Acta Amazonica can be paid by check or money order. Institutional subscriptions US\$ 100.00; individual subscription US\$ 75.00. Please contact by e-mail: valda@inpa.gov.br. Tel.: (55 92) 3643-3236 or fax: (55 92) 3643-3029

[[Home](#)] [[About this journal](#)] [[Editorial board](#)] [[Subscription](#)]



All the content of the journal, except where otherwise noted, is licensed under a [Creative Commons License](#)

**Av. André Araujo, 2936 Aleixo
CEP 69011-970 Manaus AM Brasil
Caixa Postal 478
Tel.: +55 92 3642-3438
Fax: +55 92 3643-3223**



acta@inpa.gov.br