

ADRIANA FARACO DE OLIVEIRA ARAUJO

ATIVIDADE LARVICIDA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Syzygium aromaticum* E *Citrus sinensis* EM POPULAÇÕES DE *Aedes aegypti*

**ASSIS
2014**

ADRIANA FARACO DE OLIVEIRA ARAUJO

ATIVIDADE LARVICIDA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Syzygium aromaticum* E *Citrus sinensis* EM POPULAÇÕES DE *Aedes aegypti*

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências e Letras de Assis – UNESP – Universidade Estadual Paulista para a obtenção do título de mestra em Biociências (Área de Conhecimento: Caracterização e Aplicação da Diversidade Biológica).

Orientador: Prof. Dr. João Tadeu Ribeiro Paes

ASSIS

2014

Araujo, Adriana Faraco de Oliveira
A663a Atividade larvicida dos óleos essenciais de *Syzygium aromaticum*
e *Citrus sinensis* em populações de *Aedes aegypti*. / Adriana Faraco
de Oliveira Araujo. – – Assis, 2014.
63 f.: il.; 29 cm

Dissertação (Mestrado em Biociências) - Faculdade de Ciências e
Letras, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,
Assis, 2014.
Orientador: João Tadeu Ribeiro Paes
Bibliografia

1. Óleos essenciais. 2. Controle de vetores. 3. *Aedes aegypti*. I.
Título

CDD:614.571

ADRIANA FARACO DE OLIVEIRA ARAUJO

ATIVIDADE LARVICIDA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE
Syzygium aromaticum E *Citrus sinensis* EM POPULAÇÕES
DE *Aedes aegypti*

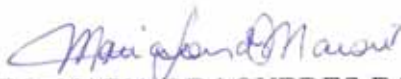
Dissertação apresentada à Faculdade
de Ciências e Letras – UNESP para a
obtenção do título de Mestra em
BIOCIÊNCIAS (Área de Conhecimento:
Caracterização e Aplicação da
Diversidade Biológica)

Data da Aprovação: 28/07/2014

COMISSÃO EXAMINADORA



Presidente: PROF. DR. JOÃO TADEU RIBEIRO PAES - UNESP/Assis



Membros: PROFA. DRA. MARIA DE LOURDES DA GRAÇA MACORIS -
SUCEN/Marília



PROF. DR. FRANCISCO ANARUMA FILHO - UNICAMP/Campinas

Dedico este trabalho à minha família, que incentivou e apoiou todas as minhas decisões, torcendo incondicionalmente pelo meu sucesso e minha felicidade.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que guiou minhas escolhas, me concedeu sabedoria e determinação para realização deste trabalho.

Ao meu esposo Henrique, pelo incentivo e compreensão.

Aos meus pais Carlos e Solange, que sempre priorizaram minha educação e que me apoiaram em todos os momentos.

À minha irmã Silvana, que desde o início torceu por mim.

Ao professor João Tadeu, que mesmo sem me conhecer previamente aceitou ser meu orientador e acreditou em meu potencial.

À Maria de Lourdes, que tornou possível a parceria com a SUCEN; pela oportunidade, incentivo, aprendizado e confiança.

Aos colaboradores da SUCEN de Marília, em especial à Juliana, minha orientadora de Aprimoramento Profissional, que me ajudou na elaboração da dissertação.

Ao professor Sócrates, que gentilmente forneceu os óleos essenciais utilizados no estudo.

Aos colegas de mestrado que compartilharam das mesmas experiências e angústias, valeu a pena!

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
1.1 DENGUE	9
1.2 VETOR	10
1.3 CONTROLE DO VETOR E RESISTÊNCIA AOS INSETICIDAS	12
1.4 ÓLEOS ESSENCIAIS	18
1.4.1 <i>Syzygium aromaticum</i>	19
1.4.2 <i>Citrus sinensis</i>	20
2. METODOLOGIA	21
2.1 PRODUTOS UTILIZADOS PARA A REALIZAÇÃO DE BIOENSAIOS DE DETECÇÃO DE ATIVIDADE LARVICIDA SOBRE <i>Aedes aegypti</i>	21
2.2 LINHAGENS DE <i>Aedes aegypti</i> UTILIZADAS PARA AVALIAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE	22
2.3 PREPARO DAS SOLUÇÕES PADRÕES	23
2.4 METODOLOGIA DOS BIOENSAIOS PARA ESTIMATIVA DAS CONCENTRAÇÕES LETAIS (CL)	23
2.5 AVALIAÇÃO DO EFEITO DE REPELÊNCIA DE LARVICIDAS NA OVIPOSIÇÃO DE <i>Aedes aegypti</i>	25
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28
3. RESULTADOS	34
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	55
<i>PLOS ONE</i> Manuscript Guidelines	56

LISTA DE ABREVIATÖES

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

Bti: *Bacillus thuringiensis*

CG: Cromatografia Gasosa

CL: Concentrações Letais

FUNASA: Fundação Nacional de Saúde

GST: Glutathion-S-Transferase

IAO: Índice de Atividade de Oviposição

IPCS: Programa Internacional de Segurança Química

MFO: Oxidase Multi-Função

MoReNAa: Rede Nacional de Monitoramento da Resistência de *Aedes aegypti* a Inseticidas

OE: Óleos Essenciais

OMS: Organização Mundial da Saúde

OP: Organofosforados

P: Piretróides

PNCD: Programa Nacional de Controle da Dengue

RR: Razão de Resistência

SUCEN: Superintendência de Controle de Endemias

SVS: Secretaria de Vigilância Em Saude

UBV: Ultra Baixo Volume

UFS: Universidade Federal de Sergipe

WHO: World Health Organization

WHOPES: Área de Pesticidas da Organização Mundial de Saúde

ARAUJO, Adriana. **Atividade larvica dos óleos essenciais de *Syzygium aromaticum* e *Citrus sinensis* em populações de *Aedes aegypti***. 2014. 63 f. Dissertação (Mestrado em Biociências). – Faculdade de Ciências e Letras, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Assis, 2014.

RESUMO

A dengue, doença infecciosa aguda, causada por um vírus da família Flaviviridae e transmitida aos humanos pela picada dos mosquitos do gênero *Aedes*, é considerada um dos principais problemas de saúde pública no mundo. O *Aedes aegypti* é o único vetor conhecido nas Américas e no Brasil está presente nos 26 estados e no distrito federal. A indisponibilidade de uma vacina que imunize a população contra os quatro sorotipos da dengue restringe a prevenção da doença ao controle do vetor. Isto é feito por aplicações de inseticidas químicos, porém o uso frequente em altas doses tem selecionado populações resistentes do mosquito. Diante dessa situação há necessidade de se buscar produtos alternativos que tenham efeito nestas populações. Diversos estudos demonstraram que os óleos essenciais de *Syzygium aromaticum* e *Citrus sinensis* apresentam pronunciada atividade larvica, assim, este trabalho teve por objetivo avaliar o potencial destes produtos como alternativa de controle larvica para populações de *A. aegypti* resistentes ao organofosforado temephos e verificar o efeito da associação deste inseticida aos óleos essenciais sobre a atividade larvica. Avaliou-se também, a influência dos óleos essenciais na oviposição do vetor quando presentes nos sítios de postura. A comparação da atividade larvica nas populações resistentes e suscetíveis foi realizada por meio das concentrações letais obtidas em ensaios de dose-resposta, seguindo metodologia proposta pela Organização Mundial da Saúde. Para avaliar o efeito da associação dos óleos essenciais ao temephos comparou-se a atividade larvica das associações com a do temephos e o efeito no comportamento de oviposição foi avaliado pela comparação do número de ovos colocados nos sítios de postura, contendo soluções dos óleos essenciais em relação aos contendo somente água. Os resultados revelaram que os óleos essenciais exerceram atividade larvica semelhante nas populações resistentes ao temephos e na suscetível sendo, portanto uma alternativa de manejo frente à resistência; quando associados ao temephos não potencializaram o efeito larvica do mesmo, agindo como antagonistas e sua presença nos sítios de postura levou a uma diminuição significativa no número de ovos em relação aos sítios contendo água. Sendo assim, concluiu-se que os óleos essenciais de *C. sinensis* e *S. aromaticum* apresentam um amplo potencial de uso como larvicidas, já que são eficientes em populações resistentes ao temephos, porém os aspectos de sua volatilidade devem ser considerados para o desenvolvimento de formulações visando à diminuição de sua ação repelente sobre a oviposição do vetor.

Palavras-chave: Temephos, resistência, oviposição, controle de vetores, larvica.

ARAUJO, Adriana. **Larvicidal activity of *Syzygium aromaticum* e *Citrus sinensis* essential oils in *Aedes aegypti* populations.** 2014. 63 p. Dissertation (Master in Biosciences). - Letters and Sciences College, São Paulo State University (UNESP), Assis, 2014.

ABSTRACT

Dengue fever an acute infectious disease caused by Flaviviridae family virus, transmitted to humans by the mosquitoes bite of *Aedes* genus. It is considered one of the most public health problems in the world. The *Aedes aegypti* is the only known vector in the Americas and in Brazil is present in 26 states and the federal district. The unavailability of a vaccine to immunize people against the four dengue serotypes restricted the disease prevention to the vector control. The control is done by chemical insecticides application, but the frequent use in high doses, have selected resistant mosquito populations. In front of this situation, it is necessary to seek for alternative products that have effect on these populations. Several studies demonstrated that *Syzygium aromaticum* and *Citrus sinensis* essential oils have larvicidal activity, so the aim of this study was to evaluate the potential of the essential oils as an alternative to control *A. aegypti* larvae resistant to the organophosphate temephos and analyze the effect of this insecticide and essential oils association on the larvicidal activity. It was evaluated too the influence of essential oils on vector oviposition, when present on the posture sites. The larvicidal activity was assessed by dose-response tests, according to the methodology proposed by the World Health Organization. To evaluate the effect of essential oils associate with temephos, the larvicidal activity was compared with the temephos. The effect on oviposition behavior was evaluated comparing the number of eggs in laying sites containing essential oils in relation to the number of eggs in laying sites containing only water. The results demonstrated that essential oils had larvicidal activity in resistant and susceptible to temephos populations, being an alternative to resistance management. The association of temephos and essential oils had an antagonist effect on larvicidal activity. The number of eggs in oviposition sites containing the essential oils were significantly lower than at sites containing only water, so they had repellency effect on mosquitoes oviposition. Considering the results, it was concluded that the essential oils of *C. sinensis* and *S. aromaticum* have potential for use as larvicides, because they were efficient for temephos resistant populations, but the aspects of volatility should be considered for product development, aiming to decreased repellent action on the vector oviposition.

Keywords: Temephos, resistance, oviposition, vector control, larvicide.

1. INTRODUÇÃO

1.1 DENGUE

A dengue é considerada um problema de saúde pública nos países tropicais subdesenvolvidos e em desenvolvimento, afetando de 50-100 milhões de pessoas anualmente em todo o mundo, sendo a doença viral transmitida por mosquitos que apresenta a propagação mais rápida no mundo (GUZMÁN e KOURÍ, 2003, WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO, 2006, WHO, 2009, FERREIRA, 2012). O aumento da incidência nas últimas décadas está relacionado ao intenso crescimento populacional humano e a urbanização desordenada, especialmente nos países em desenvolvimento, aliados à ineficiência da gestão de recursos e práticas de controle de vetores (GLUBER, 1998; LAMBRECHTS et al., 2009). Nos últimos dez anos foram notificados 82.039 casos graves e 2.931 óbitos no Brasil, o que representa um aumento de 705% e 974%, respectivamente, se comparado com a década anterior (BRASIL, 2013).

A partir do estabelecimento da transmissão de dengue no Estado de São Paulo, em 1990, o padrão epidemiológico da doença tem apresentado períodos de baixa transmissão intercalados com a ocorrência de epidemias, estas geralmente associadas à introdução de novos sorotipos ou à alteração do sorotipo predominante. A distribuição da infestação pelo vetor em 602 municípios coloca sob risco de transmissão quase a totalidade da população do Estado. No período compreendido entre as semanas epidemiológicas 27 de 2012 e 26 de 2013, houve transmissão da doença em 84% dos municípios, sendo que a letalidade neste período foi de 13,7% (SÃO PAULO, 2013).

1.2 VETOR

O mosquito *Aedes aegypti* (Diptera-Culicidae), procedente da África, trazido para a América durante o processo de colonização é o vetor responsável pela transmissão do vírus da família Flaviviridae, gênero *Flavivirus* (FURTADO et al., 2005; WHO, 2004), que inclui quatro tipos imunológicos: DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4 (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE - FUNASA, 2001; INSTITUTO OSVALDO CRUZ – IOC, 2014). É um inseto holometábolo, apresentando duas fases no seu ciclo de vida: a aquática, que inclui três estádios de desenvolvimento: ovo, larva e pupa e a terrestre que corresponde ao mosquito adulto.

A oviposição ocorre predominantemente durante o dia, dado que a iluminação diurna promove papel importante no seu mecanismo regulador. Os ovos são depositados pelas fêmeas, individualmente, nas paredes internas dos depósitos que servem como criadouros, próximos a superfície da água. Dentre os mais variados tipos de criadouros encontram-se latas, embalagens plásticas, pratos de vasos de planta, caixa d'água, pneus, oco de árvores e na região do litoral, as bromélias, (FORATTINI, 2002).

A larva eclode após alguns minutos de submersão dos ovos em meio líquido e apresenta quatro estádios larvais (L1, L2, L3 e L4), elas são providas de grande mobilidade, podendo ser reconhecidas pelos seus movimentos sinuosos característicos. Sua abundância depende da temperatura, precipitação pluviométrica e presença de criadouros. O desenvolvimento larval se completa em 5 a 10 dias, desde que ocorram condições favoráveis de temperatura (25 a 29°C). Após este período inicia-se a fase de pupa, que corresponde a um período de transição em que ocorrem profundas transformações que levam à formação do adulto e mudança

do hábito aquático pelo terrestre. Este estágio não requer alimentação e seu período de desenvolvimento em temperatura de 27° a 38°C é de um a três dias (FUNASA, 2001; FORATTINI, 2002).

O adulto é representante da fase reprodutiva do inseto, seu tórax possui tegumento recoberto de escamas escuras além de outras branco-prateadas as quais se dispõem formando o desenho classicamente comparado a uma “lira”. Os machos emergem um dia antes das fêmeas e permanecem nas imediações dos criadouros esperando que estas saiam aptas para a cópula. Uma única inseminação é suficiente para fecundar todos os ovos que a fêmea venha a produzir durante sua vida (FUNASA, 2001; FORATTINI, 2002).

Machos e fêmeas alimentam-se de néctar e fluídos açucarados de qualquer fonte, mas somente as fêmeas são hematófagas, picando durante todo o dia. O sangue é a fonte de proteínas que se fazem necessárias em sua alimentação para a maturação dos ovos. Esta ocorre durante a postura e se completa em dois ou três dias, após um repasto sanguíneo completo. Em geral a fêmea faz uma postura após cada repasto sanguíneo. O intervalo entre a alimentação sanguínea e a postura é, em regra, de três dias, em condições de temperatura satisfatórias. Com freqüência, a fêmea se alimenta mais de uma vez, entre duas sucessivas posturas, em especial quando perturbada antes de totalmente ingurgitada. Este fato resulta na variação de hospedeiros, com disseminação do vírus a vários deles. Em média uma fêmea produz cerca de 120 ovos (BARATA, 2001; FORATTINI, 2002; MARQUES et al., 2014).

1.3 CONTROLE DO VETOR E RESISTÊNCIA AOS INSETICIDAS

Os laboratórios acadêmicos e as empresas farmacêuticas têm desenvolvido diversas vacinas candidatas contra a dengue, utilizando diferentes tecnologias, como, por exemplo, vacinas contendo vírus vivos atenuados; vetores virais recombinantes que expressam os antígenos do envelope (E) do vírus da dengue; proteínas recombinantes e vacinas de DNA. Entretanto, até o presente, nenhuma vacina contra a dengue foi registrada (GUY et al., 2011), o que restringe a prevenção da doença ao controle do vetor (BISSET et al., 2011; COELHO, 2012). As estratégias de controle estão centradas na utilização de produtos químicos e biológicos, integrados com programas de manejo ambiental.

O controle biológico utiliza outros organismos para o controle populacional da espécie, como por exemplo, as larvas predadoras *Toxorhynchites sp.*; a bactéria *Bacillus thuringiensis* (Bti) e outros que possam se alimentar ou impedir o desenvolvimento do vetor (OLIVEIRA et al., 2011). O Bti possui três diferentes toxinas Cry (cristal tóxico) e uma Cyt (com atividade citolítica e hemolítica). Um ponto importante é que estas bactérias não são tóxicas para os humanos e podem ser utilizadas juntamente com inseticidas químicos para aumentar o potencial de mortalidade das larvas (POLANCZYK, et al., 2003).

Outra metodologia de controle biológico bastante promissora é a fabricação de mosquitos transgênicos, uma evolução da técnica do inseto estéril; o RIDL (Release of Insect carrying Dominant Lethal gene) é um sistema transgênico espécie-específico que induz a mortalidade nos insetos portadores do transgene. A técnica consiste na criação e liberação de um grande número de insetos submetidos à radiação, que ocasiona a quebra do material genético tornando o mosquito estéril,

os machos são liberados no ambiente para copular com as fêmeas selvagens, toda a prole resultante deste acasalamento será portadora do transgene e morrerá por toxicidade (OLIVEIRA, et al., 2011).

No Brasil, os programas de controle de vetores utilizam principalmente inseticidas químicos, onde se destacam os organofosforados (OP): malathion, fenitrothion e temephos e os piretróides (P): cipermetrina e deltametrina (MACORIS, 2002, LUNA et al., 2004). O uso de destes produtos por um longo período levou ao surgimento de resistência, que é definida pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como a habilidade de uma população de insetos tolerar uma dose de inseticida que, em condições normais, causaria sua morte (BRAGA e VALLE, 2007).

Os primeiros registros de alteração da suscetibilidade do *A. aegypti* a inseticidas derivam de testes realizados pela Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN), do governo do estado de São Paulo (MACORIS et al., 1995). Em 1999 foi instituída a Rede Nacional de Monitoramento da Resistência de *Aedes aegypti* a Inseticidas (MoReNAa) com a proposta de agregar 12 laboratórios para realização das provas biológicas. A partir de então populações de *A. aegypti* de 67 municípios do país foram avaliadas, tendo sido detectada resistência ao temephos principalmente em municípios das regiões sudeste e nordeste (LIMA et al., 2003; MACORIS et al., 2003; BRAGA et al., 2004). Os dados do programa demonstraram ao longo do tempo um aumento do número de populações resistentes ao temephos, principal larvicida utilizado e que a resistência a adulticidas da classe dos piretróides é disseminada em todo o estado de São Paulo desde 2000, havendo comprometimento do controle em campo nestas populações (MACORIS, 2011).

A resistência a inseticidas comumente está relacionada à atividade de enzimas envolvidas no metabolismo dos produtos utilizados para o controle, a

identificação de seus mecanismos é realizada por meio da quantificação da atividade das enzimas carboxilesterase (alfa e beta); oxidase multi-função (MFO) e glutathion-S-transferase (GST). Esta análise é realizada segundo metodologia proposta pelo Ministério da Saúde (2006), onde se calcula o percentil 99 da atividade enzimática da cepa susceptível de referência e a análise da população de campo baseia-se no percentual de indivíduos que possuem atividade enzimática superior a este valor. Percentuais entre zero e quinze indicam atividade “*não alterada*”, ou seja, equivalente a da cepa referência; entre quinze e cinquenta indicam “*alteração de atividade*” e acima de cinquenta representam atividade “*muito alterada*” (BRASIL, 2006). A atividade enzimática da cepa Rockefeller, mantida em laboratório e não exposta a inseticidas é considerada como padrão normal de atividade (KUNO, 2010)

Vários relatos na literatura apontam a atividade de enzimas da classe das esterases como responsáveis pelo mecanismo de resistência a organofosforados (GEORGHIOU e PASTEUR, 1978; DARY et.al., 1990; WIRTH et al., 1990; GOKHALE et al., 2000; HEMINGWAY et al., 1989; MACORIS et al., 2003; RODRIGUEZ et al., 2001, 2002, 2004; BISSET et al., 2004; SAELIM et al., 2005). As enzimas das classes das oxidases, MFO e GST, também já apresentaram evidências de envolvimento na resistência a organofosforados (RODRIGUEZ et al., 1999; BRAGA et al., 2004).

Os dados do histórico de resistência do Estado de São Paulo (MACORIS, 2011) demonstram que a detoxificação do temephos por enzimas esterases é o principal mecanismo de resistência a este xenobiótico. Ensaios bioquímicos realizados em 2009, pelo Núcleo de Apoio a Pesquisa da SUCEN de Marília, SP demonstraram que as populações de Araçatuba, Marília e Santos, apresentam

níveis distintos de atividade das enzimas alfa esterase, beta esterase e GST. Para a enzima MFO as populações de Araçatuba e Santos possuem atividade alterada enquanto Marília apresenta atividade normal, o que demonstra que as três populações apresentam diferentes potenciais de metabolização dos inseticidas (SUCEN, 2009: dados não publicados).

No Brasil, o temephos vem sendo utilizado como larvicida ao longo dos últimos 30 anos. No período de 1999 a 2011 populações de *A. aegypti* de 147 municípios do país foram avaliadas pela Rede MoReNAa para verificação do *status* de resistência, constatando-se mortalidade menor que 80% e/ou Razão de Resistência para a concentração letal 95% acima de 3,0 para 92,5% destes municípios, o que caracteriza resistência ao uso do produto (WHO, 1998). Somente em nove municípios foram encontradas populações suscetíveis, sendo que estas foram avaliadas até 2001, o que pode significar que atualmente possam ser resistentes ao temephos. Com exceção de Florianópolis e Porto Alegre, todas as capitais e o Distrito Federal possuem populações de *A. aegypti* resistentes a este larvicida. Tendo em vista as evidências apresentadas pela Rede MoReNAa e numa tentativa de reverter a situação para emprego futuro do larvicida temephos, recomendou-se a sua substituição em todos os municípios do país (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE – SVS, 2012).

Atualmente os produtos candidatos para aquisição pelo Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD) e recomendados pela área de pesticidas da Organização Mundial de Saúde (WHOPES) são: Bti, diflubenzuron, novaluron, pyriproxyfen e spinosad (SVS, 2012).

O spinosad é um metabólito da fermentação do fungo *Saccharopolyspora spinosa* e pertence ao grupo das espinosinas. O produto está registrado na Agência

Nacional de Vigilância Sanitária, obteve avaliação positiva da OMS e aprovação para uso em água de consumo humano pelo Programa Internacional de Segurança Química (IPCS) (SVS, 2012).

O Bti tem sido usado em programas de controle de mosquitos e simúlideos por mais de vinte anos, sendo recomendado pela OMS para uso em água potável (BRAGA e VALLE, 2007).

O diflubenzuron é um dos inibidores da síntese de quitina mais utilizados no Brasil, a OMS considera-o um produto seguro à saúde humana, tendo cumprido todos os protocolos do IPCS e em 2007 foi aprovado para uso em água potável (WHO, 2007).

O novaluron é um larvicida do grupo das benzoil-uréias e atua inibindo a síntese de quitina dos insetos durante o processo de muda. O uso em água potável foi autorizado pelo IPCS (BRASIL, 2014a).

O pyriproxyfen atua sobre o inseto de forma análoga ao hormônio juvenil, inibindo o desenvolvimento das características adultas do inseto (por exemplo, asas, maturação dos órgãos reprodutivos e genitália externa), mantendo-o com aspecto "imaturo" (ninfa ou larva). Durante o estágio larvário o hormônio juvenil também está presente, sendo sua produção interrompida ao final do quarto estágio larvário quando a atuação do pyriproxyfen é mais notada. Portanto, em campo se verifica o efeito de prolongação do tempo que o vetor se mantém como larva que pode chegar até 20 dias. Esse produto tem pouco efeito sobre mortalidade de larvas, sendo seu efeito de mortalidade verificado em pupas e na inibição de emergência do adulto. O IPCS considerou o produto seguro para uso no controle do vetor *A. aegypti*, inclusive em água de consumo humano (BRASIL, 2014b).

Os resultados da Rede MoReNAa revelaram também um amplo e disseminado processo de resistência ao uso de piretróides no país. Os ensaios biológicos e estudos de caracterização genética demonstram que o mecanismo de resistência encontrado apresenta um potencial de aumento de frequência e disseminação, recomendando-se a substituição imediata nas ações de controle vetorial do PNCD no país, considerando-se prioritários os Estados das Regiões Sudeste, Centro-Oeste e Sul, somado o Estado da Bahia; seguidos pelos Estados da Região Norte e o restante da Região Nordeste, nesta ordem (SVS, 2012).

Com a restrição ao uso dos piretróides, o único inseticida disponível para aplicações espaciais a Ultra Baixo Volume (UBV) é o organofosforado malathion. A formulação Grau Técnico, contendo de 93 à 96% do princípio ativo, é a atualmente em uso, necessitando ser diluída em óleo de soja para aplicação em campo, essa característica constitui-se em um obstáculo para sua utilização pelas secretarias estaduais de saúde pelo alto custo e dificuldade de aquisição do óleo de soja. Para uso em aplicações residuais (perifocal) as alternativas disponíveis na lista atual do WHOPES são os organofosforados malathion, fenitrothion, pirimifos metil e os carbamatos bendiocarb e propoxur (SVS, 2012).

Como estratégia de manejo da resistência recomenda-se a rotação de larvicidas. Considerando as complexidades logísticas de um processo de rotação, tais como processo de aquisição, capacitação de pessoal de campo e a distribuição aos municípios, recomenda-se a utilização de um único grupo de larvicidas, dentre aqueles recomendados pelo WHOPES, por um período máximo de quatro anos e que a lista de larvicidas seja reavaliada quando a rede MoReNAa detectar populações de *A. aegypti* resistentes ao grupo do larvicida em uso no país, o que pode impactar no processo de rotação de larvicidas (SVS, 2012).

1.4 ÓLEOS ESSENCIAIS

As plantas aromáticas, bem como os respectivos óleos essenciais (OE), são utilizadas desde o início da história da humanidade para flavorizar alimentos, empiricamente usadas para disfarçar odores desagradáveis e controlar problemas sanitários, contribuindo também para a comunicação entre os indivíduos e influenciando o bem-estar dos seres humanos e animais, demonstrando assim uma antiga tradição sociocultural e socioeconômica da utilização destes produtos (FRANZ, 2010).

Os OE apresentam diferentes propriedades biológicas, como atividade antioxidante (WANNES et al., 2010), ação analgésica e antiinflamatória, (MENDES et al., 2010), fungicida, (CARMO et al., 2008), atividade antitumoral (SILVA et al., 2008) e a ação larvicida, (RAJKUMAR e JEBANESAN, 2010). Na grande maioria das vezes são extraídos de plantas através da técnica de arraste a vapor e também pela prensagem do pericarpo de frutos cítricos, que no Brasil dominam o mercado de exportação. São compostos principalmente de mono e sesquiterpenos e de fenilpropanóides, metabólitos que conferem suas características organolépticas (BIZZO et al., 2009).

As mais recentes investigações em vários países confirmam que alguns deles têm não apenas a capacidade de repelir insetos, mas também ação inseticida através do contato direto ou pelas vias respiratórias dos insetos (ação fumigante), sendo úteis para o controle de pragas que atacam alimentos em armazéns e silos (CÔRREA e SALGADO, 2011). Há, também, os que atuam como agente anti-alimentar, impedindo que os insetos iniciem a alimentação, causando morte por inanição. As substâncias que atuam por ingestão, penetram no organismo por via

oral, que é uma forma específica de atuação, restrita a insetos herbívoros, apresentando, portanto, pouca toxicidade a humanos. Outro mecanismo de ação envolve atividade sobre órgão ou molécula alvo, neste caso, atuam dificultando o crescimento e o desenvolvimento, interferindo no metabolismo celular (MENEZES, 2005).

Entre as famílias de plantas promissoras, com óleos essenciais utilizados para repelir insetos, *Cymbopogon* spp., *Ocimum* spp. e *Eucalyptus* spp. são as mais citadas. Alguns dos compostos presentes nestas misturas incluem cânfora-pineno, limoneno, citronelol, citronelal e timol (NERIO et al., 2009).

1.4.1 *Syzygium aromaticum*

Syzygium aromaticum (L.) Merr. e L.M. Perry, Mirtaceae também conhecido como cravo-da-índia é uma especiaria muito apreciada desde a antiguidade, não só por seu sabor e qualidades culinárias, mas também por suas utilizações terapêuticas (AFFONSO et al., 2012). É uma árvore originária da Índia, tendo cultivo no Brasil principalmente nos estados de São Paulo e Bahia. Seus botões florais são bastante consumidos como aromatizante e para fins culinários, na forma de chá são utilizados para estimular as funções digestivas e por apresentarem propriedade carminativa, ajudando o organismo a eliminar gases presos no tubo digestivo e intestinos.

Os principais produtos derivados do cravo da Índia disponíveis no mercado nacional hoje em dia são o óleo essencial puro ou produtos derivados dele, cuja principal aplicação é como anestésico local em odontologia (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA, 2012).

Diversos autores descreveram os efeitos do OE *S. aromaticum* ou de seu constituinte majoritário, o eugenol, sobre o *A. aegypti* (CHAIEB et al, 2007; TRONGTOKIT et al, 2005; COSTA et al, 2005; FAYEMIWO et al, 2014; BARBOSA et al, 2012; SIMAS et al, 2004).

1.4.2 *Citrus sinensis*

Citrus sinensis (L.) Osbeck, Rutaceae, é uma planta aromática herbácea, popularmente conhecida como “laranja doce”.

O OE extraído do pericarpo do fruto é um subproduto da indústria do suco e seus derivados são usados em perfumaria, sabonetes e na área farmacêutica em geral, além de materiais de limpeza, em balas e bebidas. O rendimento máximo de extração de óleos cítricos é de 0,4%, ou seja, para cada tonelada de fruta processada são obtidos 4 kg de óleo (SANTOS et al., 2006).

Diversos autores descreveram os efeitos do *C. sinensis* sobre o *A. aegypti*: Gonsalves e colaboradores (2009) detectaram em seus estudos que o limoneno, principal constituinte do OE de *C. sinensis*, apresentou intensa atividade larvica e Warikoo e colaboradores (2012) observaram que o extrato possui efeito irritante notável contra adultos da espécie.

METODOLOGIA

2.1 PRODUTOS UTILIZADOS PARA A REALIZAÇÃO DE BIOENSAIOS DE DETECÇÃO DE ATIVIDADE LARVICIDA SOBRE *Aedes aegypti*

Os óleos essenciais e suas formulações com temephos utilizados no estudo foram fornecidos pela Universidade Federal de Sergipe (UFS), sob responsabilidade do Prof. Dr. Sócrates Cabral de Holanda Cavalcanti, visando dar continuidade aos objetivos do edital MCT/CNPq N° 073/2009, PRONEX, Rede Dengue. A constituição dos produtos foi revelada somente após vencimento de patente, quando os experimentos já haviam terminado.

As plantas utilizadas para extração dos óleos essenciais foram: *Citrus sinensis* e *Syzygium aromaticum*. Os frutos de *C. sinensis* foram adquiridos no comércio, em feira livre do município de Aracaju e a extração do óleo essencial foi realizada a partir de sua casca. O cravo da Índia (*S. aromaticum*) da marca Maratá® foi adquirido comercialmente. Durante todos os testes utilizou-se somente um lote dos óleos essenciais, a fim de evitar variações na constituição dos mesmos.

Os resultados da análise cromatográfica dos óleos essenciais encontram-se na tabela 1.

Tabela 1. Identificação e quantificação dos constituintes químicos dos óleos essenciais por Cromatografia Gasosa.

<i>C. sinensis</i>			<i>S. aromaticum</i>		
Composto	CG-EM %	CG-FID %	Composto	CG-EM %	CG-FID %
(E) Cinamaldeído	3,30	3,86	Mirceno	1,08	1,27
Eugenol	74,62	80,5	<i>n</i> -Octanol	1,23	1,09
β -Cariofileno	1,02	1,13	Limoneno	95,23	91,88
Acetato de Eugenol	19,74	13,56	Linalol	2,46	4,76
Ar-Tumerona	1,32	0,94	-----	-----	-----

CG-EM: Cromatografia Gasosa acoplada a espectrometria de massa.

CG-FID: Cromatografia Gasosa com detector de ionização de chama.

Fonte: Universidade Federal de Sergipe, 2012.

Para avaliação do efeito sinérgico ou antagonístico dos óleos em associação ao temephos (padrão sigma 97,5%), utilizou-se uma solução de *C. sinensis* contendo 0,018 mg de temephos por mg de solução e uma solução de *S. aromaticum* contendo 0,010 mg de temephos por mg de solução.

O temephos utilizado nos bioensaios de dose resposta para monitoramento da suscetibilidade de *A. aegypti* aos inseticidas utilizados para seu controle foi o padrão sigma.

2.2 LINHAGENS DE *Aedes aegypti* UTILIZADAS PARA AVALIAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE

Os ensaios foram realizados com populações de *A. aegypti* provenientes de três municípios do estado de São Paulo, integrantes do Programa Estadual de Monitoramento da Suscetibilidade, da SUCEN: Araçatuba, Marília e Santos. Estes municípios foram selecionados por apresentar níveis distintos de atividade das enzimas alfa, beta esterases e glutathion-s-transferase.

A cepa Rockefeller, sabidamente suscetível, foi utilizada como padrão de referência, esta linhagem tem sido mantida em insetários há anos, sendo periodicamente testada quanto à sua suscetibilidade.

Para avaliação da suscetibilidade foram utilizados ovos de geração F1, primeiros ovos postos no laboratório, provenientes das linhagens de campo. Optou-se pelo uso das primeiras gerações para obter resultados próximos à situação presente em condições naturais e impedir, assim, que a resposta biológica pudesse ser influenciada pela adaptação dos insetos às condições de laboratório, com ausência da pressão do uso de inseticidas (MACORIS, 2002).

2.3 PREPARO DAS SOLUÇÕES PADRÕES

Preparou-se uma solução de 20.0000 ppm tanto para os óleos essenciais como para sua associação ao temephos. Para diluição destes em água, utilizou-se o *tween* 80 como tensoativo, na proporção de: 20mg do OE / 5µL de *tween* / 1 mL de água deionizada.

2.4 METODOLOGIA DOS BIOENSAIOS PARA ESTIMATIVA DAS CONCENTRAÇÕES LETAIS (CL)

Os bioensaios de dose resposta foram realizados seguindo metodologia proposta pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 2005). Os testes foram realizados no Laboratório de Entomologia Aplicada da SUCEN, Marília, SP, em sala climatizada, com controle de temperatura (25°C) e umidade (70 U.R). Inicialmente as larvas de terceiro estágio foram expostas a uma ampla faixa de concentrações para

encontrar em que faixa se obtinha de 10 a 95% de mortalidade após 24 horas de exposição e a partir destas concentrações realizaram-se os bioensaios.

Cada bioensaio foi realizado utilizando-se um grupo controle, contendo água e *tween* e oito gradientes de concentrações com o larvicida em estudo, com quatro réplicas para cada um destes (Figura 1).

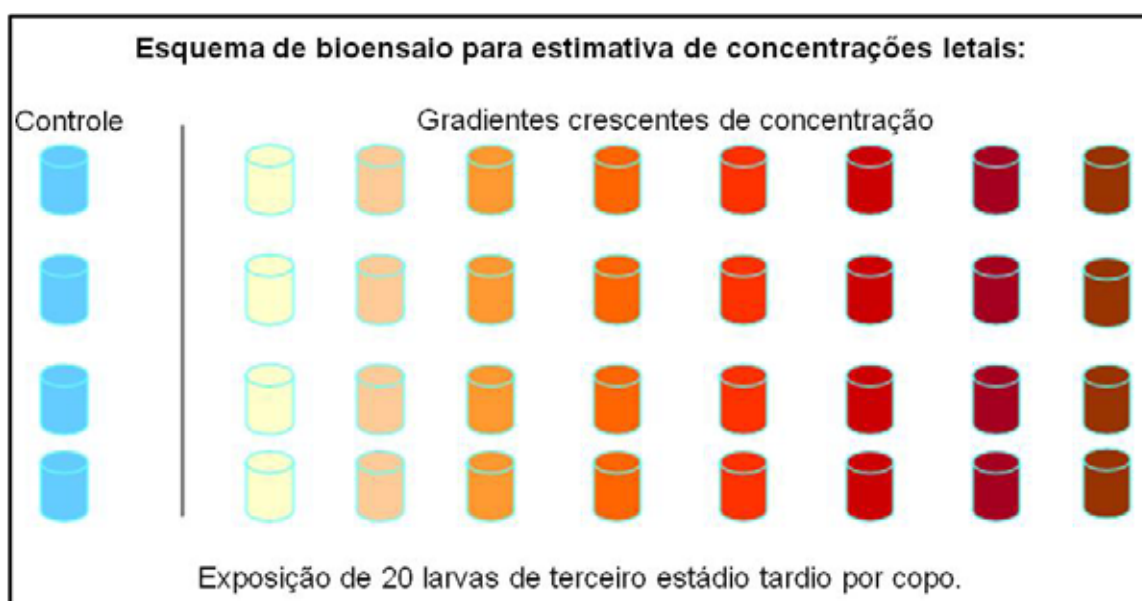


Figura 1. Esquema de bioensaio para estimativa de concentrações letais (MACORIS, 2002).

Vinte larvas de terceiro estágio tardio foram expostas em um volume final de 150 ml, utilizando-se como recipientes copos plásticos descartáveis de 200 mL. Desta maneira oitenta larvas foram expostas por concentração de larvicida e 80 para o controle. Os testes foram realizados em triplicatas obtendo-se uma amostra de pelo menos 240 larvas por concentração de inseticida. A resposta foi observada após 24 horas da exposição, com a contagem do número de larvas mortas e vivas por concentração. A porcentagem de mortalidade foi calculada totalizando-se o número de larvas expostas e mortas por concentração em cada teste realizado,

considerando-se que mortalidades superiores a vinte por cento no grupo controle invalidam o teste e que a mortalidade de cada concentração deve ser corrigida pela fórmula de Abbott (Equação 1), quando o controle obtiver mortalidades entre cinco e vinte por cento (WHO, 2008).

$$\frac{\% \text{ mortalidade (teste)} - \% \text{ mortalidade (controle)} \times 100}{100 - \% \text{ mortalidade (controle)}} \dots\dots\dots \text{Equação 1}$$

O pacote computacional Polo-PC (LEORA SOFTWARE, 1987) foi utilizado para converter o percentual de mortalidade para escala de probabilidades (FINNEY e STEVENS, 1948) e estimar as CL50, CL95 e CL99, a partir das quais, calculou-se as Razões de Resistência (RR) pela equação 2:

$$\frac{\text{RR} = \text{CL50 ou 95 da linhagem teste}}{\text{CL50 ou 95 da linhagem suscetível}} \dots\dots\dots \text{Equação 2}$$

Para construção dos gráficos de dose-resposta utilizou-se o programa Graph Pad prism versão 5.0.

2.5 AVALIAÇÃO DO EFEITO DE REPELÊNCIA DE LARVICIDAS NA OVIPOSIÇÃO DE *Aedes aegypti*

Para avaliar se a presença dos óleos essenciais de *C. sinensis* e *S. aromaticum* nos sítios de postura influenciam o comportamento de oviposição de fêmeas de *A. aegypti* foram preparadas duas gaiolas, uma para cada larvicida,

contendo cem fêmeas e cinquenta machos recém-emergidos cada uma, utilizando-se linhagem proveniente de Marília. A alimentação dos mosquitos foi realizada por meio de algodões entumecidos com solução de mel a dez por cento. Após três dias do preparo das gaiolas, período reservado para cópula, retirou-se a alimentação de mel e no quarto dia ofereceu-se sangue por meio de alimentadores artificiais (Figura 2). O sangue utilizado foi proveniente de matadouro bovino, sendo armazenado em tubos heparinizados e mantido em refrigerador. A partir de então as alimentações, sanguínea e mel, foram oferecidas em dias alternados, até o final do experimento.



Figura 2. Alimentador artificial utilizado para alimentação de *Aedes aegypti*, 2013.

A: Banho Maria.

B: Alimentador revestido com membrana de silicone porosa¹ que permite a alimentação de *A. aegypti*.

C: Vista interna da gaiola, mostrando *A. aegypti* se alimentando de sangue bovino.

Após três dias da primeira alimentação sanguínea foram colocados dois sítios de postura em cada gaiola, um copo com água de torneira e um copo com solução do larvicida, a fim de se observar possíveis preferências. Os copos foram revestidos com uma tira de papel de filtro que serve como substrato para a oviposição. As concentrações das soluções foram de 81,44 ppm para *C. sinensis*, 860 ppm para *S.*

¹ A membrana de silicone foi desenvolvida e disponibilizada pelo Prof. Dr. Adivaldo Henrique da Fonseca, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

aromaticum, concentrações aproximadamente quatro vezes maiores que as necessárias para matar 99% da cepa Rockefeller, critério arbitrário para uso de inseticidas em campo. As segundas, quartas e sextas feiras, ofereceu-se alimentação sanguínea, retirou-se as tiras de papel de filtro, colocando-as para secar e trocou-se a solução. Para evitar que a claridade do local interferisse na escolha do sítio de oviposição, a posição dos copos contendo água e solução de larvicida foi invertida no momento da troca das soluções. No dia seguinte a retirada das fitas foi realizada a contagem dos ovos. O experimento teve duração de 33 dias, registrando-se o número de mosquitos mortos em cada gaiola diariamente.

A análise estatística foi realizada por meio do teste t de *student*, comparando-se o número de ovos postos em cada par de sítios de postura. Os gráficos demonstrando o número de ovos para cada sítio de postura e o número de ovos ao longo do experimento foram construídos utilizando-se o programa Graph Pad prism versão 5.0.

O índice de atividade de oviposição (IAO) foi adotado para avaliar a resposta de oviposição das fêmeas aos diferentes sítios de oviposição (CLEMENTS, 2000; MARQUES et.al, 2013). O IAO varia entre -1 e +1, substâncias que atraem ou estimulam a deposição de ovos produzem índices positivos, enquanto compostos que repelem ou inibem produzem índices negativos. O mesmo é calculado pela equação 3.

$$IAO = \frac{N_t - N_c}{N_t + N_c} \dots\dots\dots \text{Equação 3}$$

Em que IAO é o índice de atividade de oviposição, N_t é a média do número de ovos a serem testados e N_c é a média do número de ovos do controle.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFFONSO, R. S.; RENNÓ, M. N.; SLANA, G. B. C. A.; FRANÇA, T. C. C. Aspectos Químicos e Biológicos do Óleo Essencial de Cravo da Índia. *Rev. Virtual Quim.*, p.146-161, 2012.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. Disponível em: http://www7.anvisa.gov.br/datavisa/Consulta_Produto_correlato/consulta_correlato.asp. Acesso em: 26 de abr. 2012.

BARATA, E. A. M. F.; COSTA, A. I. P.; CHIARAVALLOTI, F. N.; GLASSER, C. M.; BARATA, J. M. S.; NATA, D. *Aedes aegypti* (L.) population in an endemic area of dengue in the Southeast Brazil. *Rev Saúde Pública*, 2001.

BARBOSA, J. D.; SILVA, V. B.; ALVES, P. B.; GUMINA, G.; SANTOS, R. L.; SOUSA, D. P.; CAVALCANTI, S. C. Structure–activity relationships of eugenol derivatives against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae. *Pest management science*, v. 68, p. 1478-1483, 2012.

BISSET, J. A.; RODRIGUEZ, M. M.; FERNANDEZ, D.; PEREZ, O. Estado de la resistencia a insecticidas y mecanismos de resistencia en larvas del municipio Playa, colectadas durante la etapa intensiva contra el *Aedes aegypti* en Ciudad de La Habana, 2001-2002. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 2004.

BISSET, J. A.; RODRIGUEZ, M. M.; RICARDO, Y.; RANSON, H.; PEREZ, O.; MOYA, M.; ZQUEZ, A. V. Temephos resistance and esterase activity in the mosquito *Aedes aegypti* in Havana, Cuba increased dramatically between 2006 and 2008. *Medical and Veterinary Entomology*, Cuba, 2011.

BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. *Quim. Nova*, Rio de Janeiro, v. 32, n. 3, p. 588-594, 2009.

BRAGA, I. A.; LIMA, J. B. P.; SILVA, S. S.; VALLE, D. *Aedes aegypti* resistance to Temephos during 2001 in several municipalities in the states of Rio de Janeiro, Sergipe, and Alagoas, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.99, p. 199-203, 2004.

BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes Aegypti*: Inseticidas, mecanismos de ação e resistência. *Epidemiol. Serv. Saúde*, Brasília, v. 16, p. 279-293, 2007.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). Dengue manual de enfermagem. 2ª ed. Brasília, 2013.

BRASIL. Ministério da saúde, fundação Oswaldo Cruz, Metodologia para quantificação de atividades de enzimas relacionadas a resistência a inseticidas em *Aedes aegypti*, Ministério da Saúde, Série A. *Normas e Manuais Técnicos*, Brasil, 128 p, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Recomendações para uso do larvicida Novaluron para controle de *Aedes aegypti*. Disponível em: <http://u.saude.gov.br/images/pdf/2014/abril/28/Instru----es-para-emprego-no-Novaluron.pdf>. Acesso em: ago., 2014a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Orientações Técnicas para utilização do larvicida pyriproxyfen (0,5G) no controle de *Aedes aegypti*. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/632-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/controle-de-vetores-inseticidas-e-larvicidas/13059-orientacoes-tecnica-para-utilizacao-do-larvicida-pyriproxyfen-0-5-g-no-controle-de-aedes-aegypti>. Acesso em ago., 2014b.

CARMO, E. S.; LIMA, E. O.; SOUZA, E. L. The potential of *origanum vulgare* L. (lamiaceae) essential oil in inhibiting the growth of some food-related aspergillus species. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 39, n. 2, p. 362-367, 2008.

CHAIIB, K.; HAJLAOUI, H.; ZMANTAR, T.; KAHLA-NAKBI, A. B.; ROUABHIA, M.; MAHDOUANI K.; BAKHROUF A. The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzigium aromaticum* L. Myrtaceae): a short review, 2007.

CLEMENTS, A. N. The biology of mosquitoes. sensory, reception and behaviour. Wellinford: CABI, p.553-625, 2000.

COELHO, G. E. Challenges in the control of *Aedes aegypti*. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, 2012.

CÔRREA, J. C. R.; SALGADO, H. R. N. Atividade inseticida das plantas e aplicações: revisão. *Rev. Bras. Pl. Med.*, Botucatu, v.13, n.4, p. 500-506, 2011.

COSTA, J. G. M.; RODRIGUES, F. F. G.; ANGÉLICO, E. C.; SILVA, M. R.; MOTA, M. L.; SANTOS, N. K. A.; CARDOSO, A. L. H.; LEMOS, T. L. G. Estudo químico-biológico dos óleos essenciais de *Hyptis martiusii*, *Lippia sidoides* e *Syzigium aromaticum* frente às larvas do *Aedes aegypti*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 15, p. 304-309, Out./Dez, 2005.

DARY, O.; GEORGHIOU, G. P.; PARSONS, E.; PASTEUR, N. Microplate adaptation of Gomori's assay for quantitative determination of general esterase activity in single insects, *J. Econ. Entomol.* v. 83, p. 2187-2192, 1990.

FAYEMIWO, K. A.; ADELEKE, M. A.; AWOJIDE, S. H; AWONIYI, I. O. *Asian Pac J Trop Biomed.*, v. 4, n. 1, p. 30–34, 2014.

FERREIRA, G. L. C. *Rev. Inst. Med. Trop.*, Sao Paulo v. 54, suppl. 18, p. 5-6, 2012.

FINNEY, D. J.; STEVENS, W. L. A table for the calculation of working probits and weights in probit analysis. *Biometrika*, v. 35 (pts 1-2), p. 91-201, 1948.

FORATTINI, O. P. Culicidologia Médica: Identificação, Biologia, Epidemiologia. São Paulo: *Edusp*, v.2, 2002.

FRANZ, C. M. Essential oil research: past, present and future. *Flavour Fragrance Journal*, v. 25, p. 112-113, 2010.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE - Funasa. Ministério da Saúde. Dengue. Instruções para Pessoal de Combate ao Vetor, *Manual de Normas Técnicas*, 2001.

FURTADO, R. F.; LIMA, M. G. A.; NETO, M. A.; BEZERRA, J. N. S.; SILVA, M. G. V. Atividade Larvicida de Óleos Essenciais Contra *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). *Neotropical Entomology*, 2005.

GADELHA, D. P.; TODA, A. T. Biologia e comportamento do *Aedes Aegypti*. *Rev. Bras. Malariol. Doenças Trop.*, 1985.

GEORGHIOU, G.P.; PASTEUR, N. Electrophoretic esterase patterns in insecticide resistant and susceptible mosquitoes, *J. Econ. Entomol.* v. 71, p. 201-205, 1978.

GLUBER, D.J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev.*, v. 11, n. 3, p. 480-486, 1998.

GOKHALE, M.D.; JACOB, P.G.; MOURYA, D.T. Dengue virus and insecticide susceptibility status of *Aedes aegypti* mosquitoes from Belagola village, Mandya District, Karnakata state: during and post epidemic investigations, *J. Commun. Dis.* v. 32, p. 247-53, 2000.

GONSALVES, J.K.M.C.; COSTA, A.M.B.; SOUSA D.P.;CAVALCANTI, S.C.H.; NUNES, R.S. Microencapsulação do óleo essencial de *Citrus sinensis* (L) Osbeck pelo método da coacervação simples. *Scientia Plena*, v.5, 2009.

GUY, B.; SAVILLE, M.; LANG, J.; SIQUEIRA JR, J. B.; BRICKS, L. F. Desenvolvimento de uma vacina tetravalente contra dengue. *Rev Pan-Amaz Saude*, v. 2, n. 2, Ananindeua, 2011.

GUZMÁN, M. G.; KOURI, G. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: lessons and challenges. *J Clin Virol*, v. 27 n.1, p. 1-13, 2003.

HEMINGWAY, J.; BODDINGTON, R. J.; HARRIS, J. Mechanisms of resistance of *Ae aegypti* L. (Diptera:Culicidae) from Puerto Rico, *Bull. Ent. Res.* v.79, p.123-130, 1989.

INSTITUTO OSVALDO CRUZ, IOC. Dengue: Vírus e vetor. Disponível em: <http://www.ioc.fiocruz.br/dengue/textos/sobreovirus.html>. Acesso: ago., 2014.

KUNO, G. Early history of laboratory breeding of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) focusing on the origins and use of selected strains. *J Med Entomol*,v. 47, n. 6, p. 957-971, 2010.

LAMBRECHTS, L.; KNOX, T. B.; WONG, J.; LIEBMAN, K. A.; ALBRIGHT, R. G; STODDARD, S. T. Shifting priorities in vector biology to improve control of vector borne disease. *Trop Med Int Health*, v. 14, n. 12, p. 1505-14.

LEORA SOFTWARE. Polo-PC :Probit Or LOGit analysis [programa de computador]. Berkeley, Calif, 1987.

LIMA, J. B. P.; CUNHA, M. P.; SILVA, R. C.; GALARDO, A. K.; SOARES, S. S.; BRAGA, I. A.; RAMOS, R. P.; VALLE, D. Resistance of *Aedes aegypti* to orghanophosphates in several municipalities in the State of Rio de Janeiro and Espirito Santo, Brazil. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 68, p. 329-333, 2003.

LUNA, J. E. D.; MARTINS, M. F.; ANJOS, A. F.; KUWABARA, E. F.; NAVARRO-SILVA, M. A. Susceptibilidade de *Aedes aegypti* aos inseticidas Temephos e cipermetrina, Brasil. *Rev. Saúde Pública*, v. 38, p. 842-843, 2004.

MACORIS, M. L. G.; ANDRIGHETTI, M. T. M.; TAKAKU, L. Efeito Residual de Temephos em larvas de *Aedes aegypti*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 28, n. 4, p. 375–377, 1995.

MACORIS, M. L. G. Avaliação do nível de suscetibilidade de linhagens de *Aedes aegypti* (Díptera: Culicidae) aos inseticidas utilizados para seu controle. 66 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Coletiva) – Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2002.

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

MACORIS, M. L. G.; ANDRIGHETTI, M. T. M.; TAKAKU, L.; GLASSER, C. M.; GARBELOTO, V. C.; BRACCO, J. E. Resistance of *Aedes aegypti* from the state of São Paulo, Brazil to organophosphates insecticides. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.98, p. 703-708, 2003.

MARQUES, G. R. A. M.; SERPA, L. L.N.; BRITO, M. *Aedes aegypti*. Disponível em: http://www.saude.sp.gov.br/resources/sucen/homepage/downloads/arquivos-dengue/den_vetore.pdf. Acesso em 16 de jan., 2014.

MARQUES, G. R. A.; MONTEIRO, L. S. M.; CHAVES, L. L. N. S.; ARDUÍNO, M. B.; CHAVES, F. J. M. Água de abastecimento público de consumo humano e oviposição de *Aedes aegypti* Public drinking water supply and egg laying by *Aedes aegypti*. *Rev Saúde Pública*, v. 47, n. 3, p. 579-587, 2013.

MENDES, S. S.; BOMFIM, R. R.; JESUS, H. C. R.; ALVES, P. B.; BLANK, A. F.; ESTEVAM, C. S.; ANTONIOLLI, A. R.; THOMAZZI, S. M. Evaluation of the analgesic and anti-inflammatory effects of the essential oil of *Lippia gracilis* leaves. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 129, n. 3, p. 391-397, 2010.

MENEZES, E.L.A. Inseticidas botânicos: seus princípios ativos, modo de ação e uso agrícola. Seropédica, Rio de Janeiro: *Embrapa Agrobiologia*, 58p., 2005.

NERIO, L. S.; OLIVERO-VERBEL, J.; STASHENKO, E. Repellent activity of essential oils: A review. *Bioresource Technology*, 2009.

OLIVEIRA, S. L.; CARVALHO, D.O.; CAPURRO, M.L. Mosquito transgênico: do paper para a realidade. *Revista da Biologia*, v.6b, p. 38-43, 2011.

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

RAJKUMAR, S.; JEBANESAN, A. 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). *Journal of Asia-Pacific Entomology*, v. 13, p. 107-109, 2010.

RODRIGUEZ, M. M.; BISSET, J. A.; SOCA, A. Cross-resistance to pyrethroid and organophosphorus insecticides induced by selection with Temephos in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Cuba. *Journal of Medical Entomology*, 2002.

RODRIGUEZ, M. M.; BISSET, J. A.; FERNINDEZ, D.; PEREZ, O. Resistencia a insecticidas en larvas y adultos de *Aedes aegypti*: prevalencia de la esterasa A4 asociada con la resistencia a Temephos. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 2004.

RODRIGUEZ, M. M.; BISSET, J. A.; MOLINA, D. F.; SOCA, A. Adaptacion de los metodos en placas de microtitulacion para la cuantificacion de la actividad de esterases y glutathion-s-transferasa en *Aedes aegypti* (L). *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 2001.

RODRIGUEZ, M. M.; BISSET, J. A.; MILA, L. H.; CALVO, E.; DIAZ, A.; SOCA, A. Levels of insecticide resistance and its mechanisms in a strain of *Aedes aegypti* of Santiago de Cuba, *Rev. Cubana Med. Trop.*, v. 51, p. 83-88, 1999.

SAELIM, V.; BROGDON, W. G.; ROJANAPREMSUK, J. Bottle and biochemical assays on Temephos resistance in *Aedes aegypti* in Thailand. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 2005.

SANTOS, A. S.; ANTUNES, A. M. S.; BIZZO, H. R.; D'AVILA, L. A. *Rev. Bras. Pl. Med.*, 2006

SÃO PAULO, SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE. Plano de Ações para o controle da dengue Estado de São Paulo, 2013-2014, São Paulo, 2013.

SECRETARIA DE VIGILANCIA EM SAUDE, SVS. Resumo Executivo do II Seminário Internacional para Avaliação de Ações de Controle Químico de *Aedes aegypti* no Brasil, 2012. Disponível em:
http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=40134
 Acesso: Dez., 2013.

SILVA, S. L.; CHAAR, J. S.; FIGUEIREDO, P. M. S.; YANO, T. Cytotoxic evaluation of essential oil from *Casearia sylvestris* Sw on human cancer cells and erythrocytes. *Acta Amazônica*, Manaus, v. 38, n. 1, 2008.

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

TRONGTOKIT, Y; RONGSRIYAM, Y; KOMALAMISRA, N; APIWATHNASORN, C. Comparative repellency of 38 essential oils against mosquito bites, 2005.

WANNES, W. A.; MHAMDI, B.; SRITI, J.; JEMIA, M. B.; OUCHIKH, O.; HAMDAR, G.; KCHOUK, M. E.; MARZOUK, B. Antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts from myrtle (*Myrtus communis* var. *italica* L.) leaf, stem and flower. *Food and Chemical Toxicology*, v. 48, n. 5, p. 1362-1370, 2010.

WARIKOO, R; RAY, A.; SANDHU, J. K.; SAMAL, R.; WAHAB, N.; KUMAR, S. Larvicidal and irritant activities of hexane leaf extracts of *Citrus sinensis* against dengue vector *Aedes aegypti* L. *Asian Pac J Trop biomed*, 2012.

WIRTH, M. C.; MARQUINE, M.; GEORGHIOU, G. P.; PASTEUR, N. Esterases A2 and B2 in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae): Role in Organophosphate Resistance and Linkage, *J. Med. Entomol.*, v. 27, n. 5, p. 202-206, 1990.

WORLD HEALTH ORGANIZATION-WHO. Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vectors, bio efficacy and persistence of insecticides on treated surfaces, Geneva, 43f., 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. Situation Dengue / Dengue hemorrhagic fever in SEA countries, *Dengue bulletin*, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO, Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides, Geneva, v.13, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. Report of the Scientific Working Group Dengue, Geneva, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. Guidelines for drinking-water quality, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. Disponível em <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/> . Acesso em nov., 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control, 2009.

2. RESULTADOS

Atividade larvica dos óleos essenciais de *Syzygium aromaticum* e *Citrus sinensis* em populações de *Aedes aegypti*

Adriana F. O. Araujo¹

1. Programa de mestrado Pós-graduação em biociências, Universidade Estadual Paulista, Assis, SP, Brasil. CEP:19806-900.

RESUMO

A indisponibilidade de uma vacina que imunize a população contra os quatro sorotipos da dengue restringe a prevenção da doença ao controle do vetor. As estratégias de controle estão centradas na utilização de produtos químicos e biológicos, porém o uso frequente em altas doses tem selecionado populações resistentes do mosquito. Diante dessa situação há necessidade de se buscar por produtos alternativos que tenham efeito nestas populações. Considerando que os óleos essenciais de *Syzygium aromaticum* e *Citrus sinensis* apresentam pronunciada atividade larvica, pretendeu-se com este trabalho avaliar o potencial destes produtos como alternativa de controle larvica, para populações de *Aedes aegypti* resistentes ao organofosforado temephos e qual o efeito da associação dos óleos a este inseticida sobre a atividade larvica. Avaliou-se também se a presença dos óleos essenciais nos sítios de postura influencia na oviposição do vetor. A comparação da atividade larvica nas populações resistentes e suscetíveis foi realizada por meio das concentrações letais obtidas em ensaios de dose-resposta. Para verificar a influencia na oviposição comparou-se o número de ovos dos sítios de postura contendo soluções dos óleos em relação ao número de ovos dos sítios de postura contendo água. Os resultados revelaram que os óleos essenciais

exerceram atividade larvícida semelhante nas populações resistentes e suscetíveis ao temephos, sendo uma alternativa de manejo à resistência; quando associados ao temephos não potencializaram o efeito larvícida, agindo como antagonistas. A presença dos óleos nos sítios de postura levou a uma diminuição significativa no número de ovos em relação aos sítios contendo somente água. Assim, os resultados obtidos permitiram concluir que os óleos essenciais de *C. sinensis* e *S. aromaticum* apresentam um amplo potencial de uso como larvicidas, pois foram eficientes para populações resistentes ao temephos, porém os aspectos de sua volatilidade devem ser considerados para o desenvolvimento de formulações, visando à diminuição de sua ação repelente sobre a oviposição do vetor.

INTRODUÇÃO

Atualmente a dengue é considerada a mais importante arbovirose que acomete populações humanas, constituindo-se em um dos mais sérios problemas de saúde pública do planeta, especialmente nos países tropicais, onde as condições do meio ambiente favorecem o desenvolvimento e a proliferação do *Aedes aegypti*, principal mosquito vetor do vírus da dengue (1). No estado de São Paulo o número de casos no ano de 2013 foi de 209.042, superando os anos de 2010, 2011 e 2012 que tiveram em torno de 180.000, 90.000 e 22.000 casos respectivamente, sendo que a presença do vetor atingiu quase a totalidade do estado (2).

Até o momento, a indisponibilidade de uma vacina que imunize a população contra os quatro sorotipos da dengue restringe a prevenção da doença ao controle do vetor (3, 4). As estratégias de controle estão centradas na utilização de produtos químicos e biológicos, integrados com programas de manejo ambiental. No Brasil, os programas utilizam principalmente inseticidas químicos, onde se destacam os

organofosforados e piretróides (5), porém o uso frequente em doses cada vez maiores desses produtos tem selecionado populações resistentes do mosquito (6, 7).

A resistência a inseticidas comumente está relacionada à atividade de enzimas envolvidas no metabolismo dos produtos utilizados para o controle; dados do histórico de resistência do Estado de São Paulo (8) demonstram que a detoxificação do temephos, amplamente utilizado no país nos últimos trinta anos como larvicida, por enzimas esterases é o principal mecanismo de resistência a este xenobiótico. Diante da caracterização da resistência de populações de *A. aegypti* ao temephos torna-se necessário buscar produtos alternativos que tenham a capacidade de agir por um mecanismo de ação diverso ao que conferiu a resistência ao organofosforado.

Numerosas investigações têm sido realizadas em busca de compostos com atividades biológicas a partir de fontes naturais, destacando-se os óleos essenciais de plantas medicinais e aromáticas, conhecidos pelas suas propriedades larvicidas, antimicrobianas, antifúngicas, dentre outras (9, 10, 11, 12, 13). A imensa biodiversidade da flora brasileira e o potencial inseticida de diversas espécies ainda inexploradas surgem como uma alternativa de novos agentes químicos para o controle de culicídeos, principalmente o *A. aegypti* (14, 15). O uso de plantas como uma alternativa para o controle de vetores é motivado pela baixa toxicidade destes produtos para animais e plantas e pelo fato de serem biodegradáveis, o que evita a contaminação do meio ambiente; em contraste, os inseticidas sintéticos aos quais os insetos se tornam cada vez mais resistentes, são tóxicos e poluentes (16, 17, 18).

Diversos estudos demonstraram que os óleos essenciais de *Syzygium aromaticum* e *Citrus sinensis*, bem como seus constituintes majoritários apresentam

pronunciada atividade larvícida sobre o *A. aegypti* (19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28).

Em função destes aspectos, buscou-se com este estudo avaliar a atividade larvícida dos óleos essenciais em populações de *A. aegypti* resistentes ao temephos e verificar se quando associados a este produto possuem efeito sinérgico ou antagônico sobre a atividade larvícida. Avaliou-se também a influência dos óleos essenciais no comportamento de oviposição de fêmeas de *A. aegypti* quando presentes nos sítios de postura, visto que o efeito de repelência é prejudicial para a ação larvícida.

Os ensaios para avaliação da atividade larvícida foram realizados com populações de *A. aegypti* provenientes de três municípios do estado de São Paulo: Araçatuba, Marília e Santos e a cepa Rockefeller, sabidamente suscetível, foi utilizada como padrão de referência. Em ensaios bioquímicos realizados em 2009, pelo Núcleo de apoio de pesquisa da Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN) de Marília, SP detectou-se que estas populações apresentam níveis distintos de atividade das enzimas alfa, beta esterases e glutathione-S-transferase; para a enzima oxidase multi função as populações de Araçatuba e Santos possuem atividade alterada enquanto a de Marília possui atividade normal (SUCEN, 2009: dados não publicados).

Contudo, o trabalho pretendeu verificar se os óleos essenciais de *C. sinensis* e *S. aromaticum* podem ser utilizados como alternativas de manejo da resistência ao temephos. Os resultados obtidos permitiram concluir que estes produtos apresentam um amplo potencial de uso como larvicidas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Preparo das soluções. Os óleos essenciais e suas associações ao temephos (padrão sigma 97,5%) foram fornecidos pela Universidade Federal de Sergipe, sob responsabilidade do Prof. Dr. Sócrates Cabral de Holanda Cavalcanti. Os frutos de *C. sinensis* foram adquiridos no comércio, em feira livre do município de Aracaju e a extração do óleo essencial foi realizada a partir de sua casca por hidrodestilação por arraste de vapor. O cravo da Índia (*S. aromaticum*) da marca Maratá® foi adquirido comercialmente; a partir dos óleos essenciais preparou-se soluções de 20.0000 ppm, utilizando-se *tween* 80 como tensoativo, na proporção de: 20mg do OE / 5µL de *tween* / 1 mL de água deionizada. Nas associações a proporção dos constituintes foi: 0,018 mg de temephos por mg de solução para o *C. sinensis* e 0,010 mg de temephos por mg de solução para o *S. aromaticum*. O temephos utilizado nos bioensaios de dose resposta para monitoramento da suscetibilidade de *A. aegypti* aos inseticidas utilizados para seu controle foi o padrão sigma.

Os testes foram realizados no Laboratório de Entomologia Aplicada da SUCEN, Marília, SP, em sala climatizada, com controle de temperatura (25°C) e umidade (70 U.R).

Bionsaios. Os bionsaios de dose resposta foram realizados seguindo metodologia proposta pela Organização Mundial da Saúde (29).

Cada bioensaio foi realizado com um controle, contendo água e *tween* e oito gradientes de concentrações com o larvicida em estudo, utilizando-se quatro réplicas para cada um destes. Vinte larvas de terceiro estágio tardio foram expostas em um

volume final de 150 ml, utilizando-se como recipientes copos plásticos descartáveis de 200 mL. Desta maneira oitenta larvas foram expostas por concentração de larvicida e 80 para o controle. Os testes foram realizados em triplicatas obtendo-se uma amostra de pelo menos 240 larvas por concentração de inseticida. A resposta foi observada após 24 horas da exposição, com a contagem do número de larvas mortas e vivas por concentração. A porcentagem de mortalidade foi calculada totalizando-se o número de larvas expostas e mortas por concentração em cada teste realizado, considerando-se que mortalidades superiores a vinte por cento no grupo controle invalidam o teste e que a mortalidade de cada concentração deve ser corrigida pela fórmula de Abbott, quando o controle obtiver mortalidades entre cinco e vinte por cento (30).

Para avaliar se a presença dos óleos essenciais de *C. sinensis* e *S. aromaticum* nos sítios de postura influenciam o comportamento de oviposição de fêmeas de *A. aegypti* formou-se duas gaiolas, uma para cada larvicida, contendo cem fêmeas e cinquenta machos recém-emergidos cada uma, a linhagem utilizada foi proveniente da cidade de Marília, SP. Após três dias de formadas, período para cópula, retirou-se a alimentação, solução de mel a dez por cento, oferecida por meio de algodões entumecidos e no quarto dia ofereceu-se sangue por alimentador artificial. A partir de então as alimentações, sanguínea e mel, foram oferecidas em dias alternados, até o final do experimento, que teve duração de 33 dias.

Após três dias da primeira alimentação sanguínea foram colocados dois sítios de postura em cada gaiola, um copo com água de torneira e um copo com solução do larvicida, a fim de se observar possíveis preferências (Figura 1). Os copos foram revestidos com uma tira de papel de filtro que serve como substrato para a oviposição e recobertos por um recipiente preto para controle da luminosidade. As

concentrações das soluções foram de 81,44 ppm para *C. sinensis*, 860 ppm para *S. aromaticum*, concentrações aproximadamente quatro vezes maiores que as necessárias para matar 99% da cepa Rockefeller, critério arbitrário para uso de inseticidas em campo.

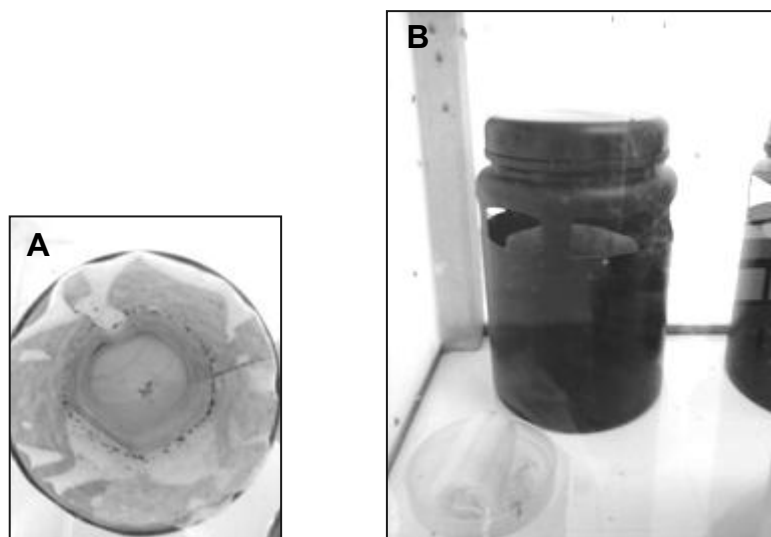


Figura 1. A) Copo âmbar revestido por papel de filtro, utilizado como sítio de postura para *A. aegypti*. B) Recipiente utilizado sobre o sítio de oviposição para garantir condições adequadas de luminosidade, SUCEN, 2013.

As segundas, quartas e sextas feiras, ofereceu-se alimentação sanguínea, retirou-se as tiras de papel de filtro, colocando-as para secar e trocou-se a solução. Para evitar que a claridade do local interferisse na escolha do sítio de oviposição, a posição dos copos contendo água e solução de larvicida foi invertida no momento da troca das soluções. No dia seguinte a retirada das fitas foi realizada a contagem dos ovos.

Análise estatística. O pacote computacional Polo-PC (31) foi utilizado para converter o percentual de mortalidade para escala de probabilidades (32) e estimar as CL50, CL95 e CL99, a partir das quais, calculou-se as razões de resistência pela equação 1.

RR = CL50 ou 95 da linhagem testeEquação 1

CL50 ou 95 da linhagem suscetível

Para construção dos gráficos de dose-resposta utilizou-se o programa Graph Pad prism versão 5.0.

O índice de atividade de oviposição (IAO) foi adotado para avaliar a resposta de oviposição das fêmeas aos diferentes sítios de oviposição (33, 34). O IAO varia entre -1 e +1, substâncias que atraem ou estimulam a deposição de ovos produzem índices positivos, enquanto compostos que repelem ou inibem produzem índices negativos. O mesmo é calculado pela equação 2.

$$\text{IAO} = \frac{N_t - N_c}{N_t + N_c} \dots\dots\dots \text{Equação 2}$$

Em que IAO é o índice de atividade de oviposição, N_t é a média do número de ovos a serem testados e N_c é a média do número de ovos do controle.

O teste t de *student* foi utilizado para comparar o número de ovos postos em cada par de sítios de postura. Os gráficos demonstrando o número de ovos para cada sítio de postura e o número de ovos ao longo do experimento foram construídos utilizando-se o programa Graph Pad prism versão 5.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os testes de suscetibilidade das larvas de *A. aegypti* demonstraram que os óleos essenciais de *S. aromaticum* e *C. sinensis*, apresentaram efeito larvicida em todas as populações testadas. O *tween* 80, utilizado como tensoativo, não interferiu

na mortalidade das larvas, conforme observado no grupo controle. Todos os testes obtiveram mortalidade inferior a vinte por cento no controle, portanto nenhum deles foi invalidado. As concentrações letais e seus respectivos intervalos de confiança podem ser verificados na tabela 1.

Tabela 1. Testes de Concentrações Letais (CL 50, 95 e 99) e respectivos intervalos de confiança, em populações de *A. aegypti* provenientes de Araçatuba, Marília, Santos e cepa Rockefeller, para os diversos produtos testados.

Larvicida	Linhagem	CL 50 (IC 95%) ppm	CL 95 (IC 95%) ppm	CL 99 (IC 95%) ppm
<i>C. sinensis</i>	Rockefeller	11,92 (11,7 - 12,2)	17,40 (16,4 - 18,9)	20,36 (18,8 - 22,7)
	Araçatuba	15,06 (14,7-15,5)	27,59 (26,3-29,1)	35,45(33,3-38,1)
	Marília	13,70 (13,4-14,0)	21,08 (20,4-21,9)	25,20 (24,1-26,6)
	Santos	16,30 (15,5-17,1)	34,18 (31,5-37,7)	46,40 (41,7-53)
<i>S. aromaticum</i>	Rockefeller	93,56 (90,1-97,0)	167,85 (157,2-182,1)	213,83 (195,6-239,0)
	Araçatuba	92,97 (90,0-95,8)	163,40 (156,2-172,0)	206,40 (194,4-221,4)
	Marília	106,90 (103,9-109,8)	174,20 (167,7-181,9)	213,20 (202,6-226,3)
	Santos	95,00 (92,2-97,8)	155,50 (148,3-164,4)	190,70 (179,1-205,6)
<i>C. sinensis</i> + Temephos	Rockefeller	0,33 (0,29-0,35)	0,57 (0,53-0,65)	0,73 (0,64-0,88)
	Araçatuba	1,65 (1,48-1,81)	5,13 (4,61-5,83)	8,21 (7,08-9,86)
	Marília	1,78 (1,61-1,95)	5,48 (4,39-7,80)	8,75 (6,43-14,33)
	Santos	1,88 (1,65-2,09)	5,35 (4,62-6,56)	8,25 (6,70-11,14)
<i>S. aromaticum</i> + Temephos	Rockefeller	0,72 (0,69-0,75)	1,00 (0,94-1,08)	1,14 (1,06-1,26)
	Araçatuba	1,66 (1,5-1,8)	4,39 (3,8-5,4)	6,60 (5,36-8,81)
	Marília	1,87 (1,41-2,21)	5,20 (4,21-7,74)	7,94 (10,98-24,13)
	Santos	1,96 (1,75-2,14)	3,96 (3,53-4,65)	5,3 (4,54-6,66)
Temephos²	Rockefeller	0,0035 (0,0034-0,0036)	0,0052 (0,0050-0,0054)	0,0061 (0,0058-0,0065)
	Araçatuba	0,0130 (0,012-0,013)	0,0240 (0,023-0,026)	0,0310 (0,028-0,034)
	Marília	0,0088 (0,0083-0,0092)	0,0180 (0,017-0,019)	0,02400 (0,022-0,027)
	Santos	0,0120 (0,011-0,012)	0,0200 (0,0191-0,022)	0,0260 (0,024-0,028)

IC 95% - Intervalo de confiança a 95% de probabilidade.

Sobrepondo-se os intervalos de confiança na concentração letal 95%, observa-se que todas as populações diferiram entre si para o óleo essencial de *C. sinensis*. Para o *S. aromaticum* as populações de campo não apresentaram

² Dados não publicados, Relatório de Bioensaios realizados em 2013 para monitoramento da suscetibilidade de *Aedes aegypti* aos inseticidas utilizados para seu controle. Laboratório de Entomologia Aplicada da SUCEN de Marília, SP, 2013.

diferenças significativas em relação cepa Rockefeller e entre elas as únicas que se apresentaram significativamente diferentes foram Santos e Marília. A média da diferença dos intervalos de confiança para *C. sinensis* foi de 3,25 e para o *S. aromaticum* de 17,75, o que demonstra maior instabilidade deste, visto que agiu em uma ampla faixa de concentrações. Para as associações ao temephos todas as populações de campo apresentaram-se significativamente diferentes da cepa Rockefeller e semelhantes entre si, com um perfil próximo da resposta ao temephos.

A CL 95 foi escolhida para a sobreposição dos intervalos de confiança, pois na CL 50 as populações não haviam se diferenciado e na CL99 os intervalos de confiança foram muito grandes, isto geralmente ocorre porque os valores de CL99 são estimados pelo programa, já que nos testes é difícil chegar a este valor.

Chaieb et al. (2007) e Simas et al. (2004) estudando o eugenol, constituinte majoritário do óleo essencial *S. aromaticum*, encontraram CL50 de 44,5 ppm (23, 19). Já para o óleo essencial o valor de CL50 encontrado por Costa et al. (2005) foi de 21,4 ppm (21), por Fayemiwo et al. (2014) de 92,56 mg (28) e por Barbosa et al. (2012) de 62,3 ppm para população de campo e 77,0 ppm para cepa Rockefeller (25).

Warikoo e colaboradores (2012) encontraram CL50 de 446.84ppm para extrato alcoólico de *C. sinensis* enquanto Murungan e colaboradores (2012) encontraram CL50 de 342,45 (27, 26).

Os valores de CL50 encontrados neste estudo para os óleos essenciais de *C. sinensis* e *S. aromaticum* foram diferentes dos encontrados nos estudos citados acima, porém estas diferenças já eram esperadas, pois tanto as populações testadas como a constituição dos produtos são diferentes.

O pH da água destilada não foi alterado pelo acréscimo das soluções de óleos essenciais, mesmo na maior concentração utilizada durante o estudo, o que descarta a possibilidade da mortalidade das larvas ser ocasionada por acidez.

De acordo com Mazzari e Georghiou (1995), os níveis de resistência são definidos como: razão de resistência menor que cinco; baixo, entre cinco e dez; médio e superior a dez; elevado (35), seguindo-se este conceito, o nível de resistência para os óleos essenciais isolados é considerado baixo, enquanto para o temephos e suas associações aos óleos essenciais é considerado médio (Tabela 2). Nas associações de *C. sinensis* ao temephos os valores de razões de resistência foram próximos a dez, portanto dentre os produtos testados é o menos recomendado para o controle do vetor.

A Rede Nacional de Monitoramento da Resistência de *A. aegypti* a Inseticidas indica a substituição de larvicida quando for identificada em laboratório razão de resistência igual ou maior que três (Secretaria de Vigilância em Saúde, Reunião Técnica Para Discutir Status de Resistência de *Aedes aegypti*, 2006: dados não publicados), portanto os óleos essenciais de *C. sinensis* e *S. aromaticum* tornam-se potenciais candidatos ao manejo da resistência de populações de *A. aegypti* aos organofosforados, enquanto suas associações ao temephos não seriam indicadas para uso como larvicidas.

Tabela 2. Razões de resistência para CL 50, CL 95 e CL 99 conforme larvicida e população.

Larvicida	Linhagem	RR CL 50	RR CL 95	RR CL 99
<i>C. sinensis</i>	Araçatuba	1,3	1,6	1,7
	Marília	1,1	1,2	1,2
	Santos	1,4	2,0	2,3
<i>S. aromaticum</i>	Araçatuba	1,0	1,0	1,0
	Marília	1,1	1,0	1,0
	Santos	1,0	0,9	0,9
Temephos	Araçatuba	3,7	4,6	5,1
	Marília	2,5	3,5	3,9
	Santos	3,4	3,8	4,3
<i>C. sinensis</i> + Temephos	Araçatuba	5,0	9,0	11,2
	Marília	5,4	9,6	12,0
	Santos	5,7	9,4	11,3
<i>S. aromaticum</i> + Temephos	Araçatuba	2,3	4,4	5,8
	Marília	2,6	5,2	7,0
	Santos	2,7	4,0	4,6

Para a construção dos gráficos de dose-resposta foi utilizado o método probit proposto por Bliss e Fisher (1935) (36, 37). Esta metodologia permite a comparação entre as diferentes populações e produtos testados, pois transforma curvas dose-resposta sigmóides em retas, por meio da conversão das doses para log das doses e da porcentagem de mortalidade para a escala de probit, que varia de dois a oito (Figura 2).

Verificou-se pela comparação dos gráficos que a dose necessária para que o *S. aromaticum* tenha ação larvicida é aproximadamente dez vezes maior que a necessária para o *C. sinensis*, porém as quatro populações testadas agiram de forma mais homogênea a este produto. Comparando-se os gráficos das associações com o do temephos conclui-se que a dose necessária para que o temephos tenha atividade larvicida sozinho é inferior à necessária nas associações.

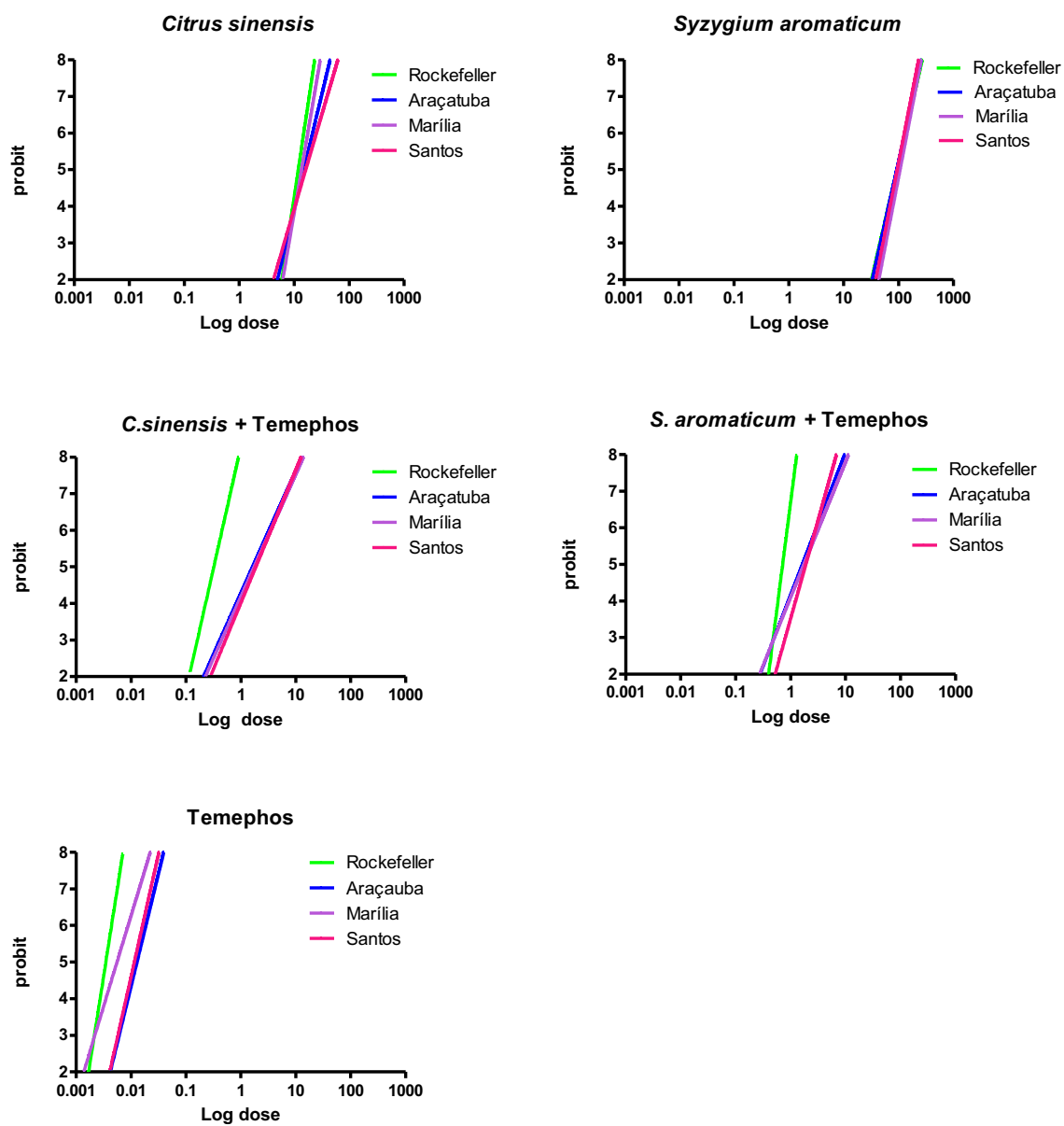


Figura 2. Curvas de dose resposta dos bioensaios realizados para avaliação da atividade larvicida dos óleos de *C. sinensis* e *S. aromaticum* e suas associações ao temephos, 2013.

Levando-se em consideração o conceito de Brindley e Selim (1984) de que sinergistas são substâncias que quando utilizadas em quantidades subletais aumentam a letalidade dos inseticidas (38), conclui-se que os óleos essenciais exerceram efeito antagonístico quando associados ao temephos, já que na CL50 das associações dos óleos essenciais ao temephos a concentração de temephos foi superior a do temephos utilizado sozinho, para todas as populações testadas (Tabela 3).

Tabela 3. Valores de CL50 (ppm) para o temephos sozinho e para o temephos nas associações com óleos essenciais de *C. sinensis* e *S. aromaticum*.

Linhagem	Temephos (sozinho)	Temephos na Associação com <i>C. sinensis</i>	Temephos na Associação com <i>S. aromaticum</i>
Rockefeller	0,004	0,006	0,007
Araçatuba	0,013	1,620	0,016
Marília	0,009	1,748	0,019
Santos	0,012	1,846	0,019

O estudo de repelência na oviposição demonstrou que as fêmeas grávidas realizaram postura em todos os sítios de postura, com diferença significativa ($p < 0,05$) no número de ovos entre as soluções dos óleos essenciais e da água. O número de ovos nos sítios de oviposição contendo *C. sinensis* e *S. aromaticum* foi inferior estatisticamente em relação ao respectivo par de sítios de postura contendo água (Tabela 4) (Figura 3).

Tabela 4. Comparação da resposta oviposicional de fêmeas de *A. aegypti* em sítios de postura contendo óleos essenciais de *C. sinensis* e *S. aromaticum* com sítios de postura contendo água.

	<i>S. aromaticum</i>	Água	<i>C. sinensis</i>	Água
Total de ovos por sítio de postura	515	14536	5050	7592
Média de número de ovos a cada 48 hs	34	969	337	506
Desvio Padrão	40,98	521,49	220,61	295,35
Teste t (p)	0,000002		0,0006	
Índice de Atividade de Oviposição	-0,93		-0,2	

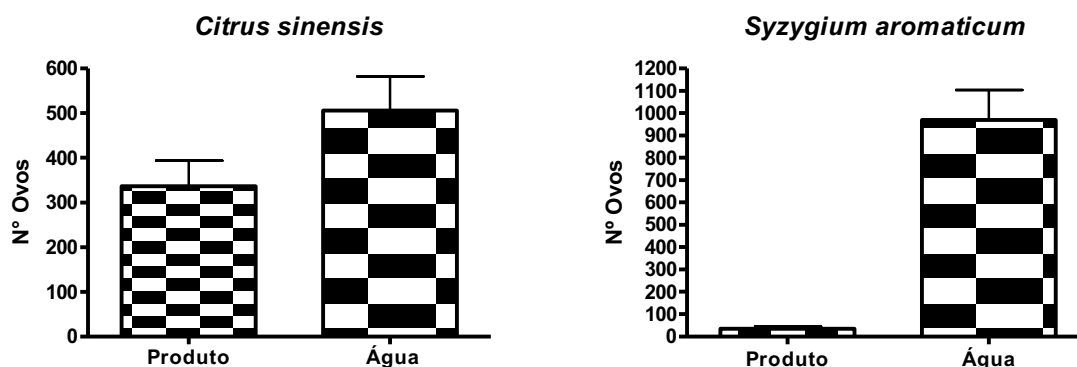


Figura 3. Número de ovos de *Aedes aegypti* segundo sítios de oviposição, 2013.

A primeira postura realizada pelas fêmeas foi a mais produtiva nas duas gaiolas, havendo uma redução no número de ovos nos dias subsequentes, o que permitiu verificar curva exponencial decrescente, com um aumento próximo ao trigésimo dia (Figura 4).

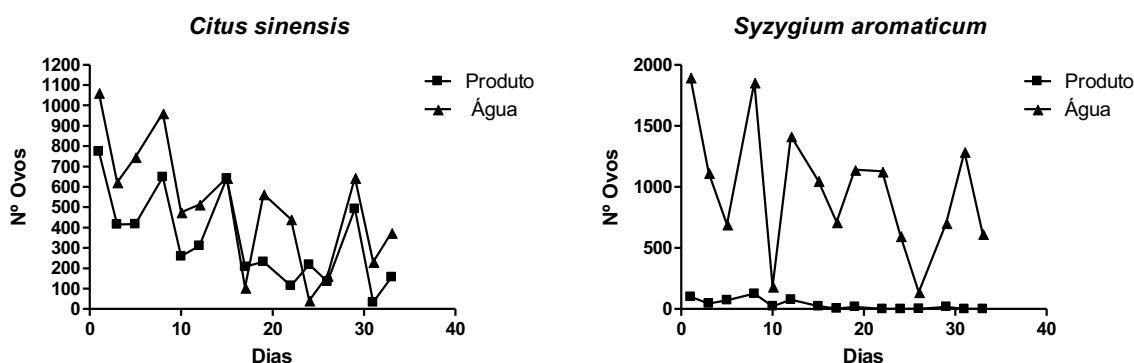


Figura 4. Número de ovos de *Aedes aegypti* segundo o tempo, 2013.

Conforme descrito por Marques et.al. (2013), o índice de atividade de oviposição varia entre -1 e +1, substâncias que atraem ou estimulam a deposição de ovos produzem índices positivos, enquanto as que repelem ou inibem produzem índices negativos (33), os óleos essenciais de *C. sinensis* e *S. aromaticum* obtiveram índice negativo, portanto exercem efeito de repelência sobre a oviposição do *A. aegypti*, o que é um fator complicador para utilização dos óleos essenciais como

larvicidas, pois o vetor irá ovipor em locais que não contenham os produtos. Sendo assim, aspectos de sua volatilidade deverão ser considerados para o desenvolvimento de formulações, visando à diminuição da ação repelente.

CONCLUSÕES

Os óleos essenciais de *C. sinensis* e *S. aromaticum* possuem atividade larvicida semelhante em populações de *A. aegypti* com diferentes perfis de susceptibilidade ao organofosforado temephos, portanto possuem o potencial para serem utilizados nos programas de controle de vetores como alternativa de manejo a resistência.

O óleo essencial de *S. aromaticum* possivelmente possui mecanismo de ação diferente ao do temephos, pois não houve diferença significativa entre a atividade larvicida para as populações resistentes a este inseticida e a cepa suscetível Rockefeller, já o óleo essencial de *C. sinensis* obteve diferenças significativas nas concentrações letais para todas as populações testadas, o que pode ser um indício de resistência cruzada a algum inseticida utilizado anteriormente.

A associação dos óleos essenciais ao temephos não levou ao aumento da toxicidade do mesmo, portanto não ocorreu efeito sinérgico.

Os óleos essenciais de *C. sinensis* e *S. aromaticum* exercem efeito de repelência no comportamento de oviposição de fêmeas de *A. aegypti*, isto prejudica sua utilização como larvicida na rotina de controle de vetores, pois levará o vetor a ovipor em locais que não contenham os produtos. Sendo assim, aspectos de sua volatilidade deverão ser considerados para o desenvolvimento de formulações, visando à diminuição da ação repelente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Brasil (2002). Caderno Saúde Pública. Rio de Janeiro; 18:187-195.
2. Centro De Vigilância Epidemiológica (2014). Plano de ações para o controle da dengue, estado de São Paulo, 2013-2014. Disponível em: http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/zoo/pdf/dengue13_Plano2013-2014.pdf. Acesso em: janeiro de 2014.
3. Bisset JA, Rodriguez MM, Ricardo Y, Ranson H, Prez O, Moya M, et al. (2011). Temephos resistance and esterase activity in the mosquito *Aedes aegypti* in Havana, Cuba increased dramatically between 2006 and 2008. Medical and Veterinary Entomology, Cuba.
4. Coelho GE (2012). Challenges in the control of *Aedes aegypti*. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.
5. Luna JED, Martins MF, Anjos AF, Kuwabara EF, Navarro-Silva MA (2004). Susceptibilidade de *Aedes aegypti* aos inseticidas Temephos e cipermetrina, Brasil. *Rev. Saúde Pública*; 38: 842-843.
6. Braga IA, Lima JBP, Silva SS, Valle D (2004). *Aedes aegypti* resistance to Temephos during 2001 in several municipalities in the states of Rio de Janeiro, Sergipe, and Alagoas, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*; 99: 199-203.
7. Lima JBP, Cunha MP, Silva RC, Galardo AK, Soares SS, Braga IA., et al. (2003). Resistance of *Aedes aegypti* to organophosphates in several municipalities in the State of Rio de Janeiro and Espirito Santo, Brazil. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*; 68:329-333.

8. Macoris MLG (2011). Mecanismos de resistência de *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) a inseticidas. (Tese Doutorado em Biologia Geral e Aplicada). Universidade Estadual Paulista, Botucatu; 82 f.
9. Carmo ES, Lima EO, Souza EL (2008). The potential of *origanum vulgare* L. (lamiaceae) essential oil in inhibiting the growth of some food-related aspergillus species. *Brazilian Journal of Microbiology*; 39(2): 362-367.
10. Silva SL, Chaar JS, Figueiredo PMS, Yano T (2008). Cytotoxic evaluation of essential oil from *Casearia sylvestris* Sw on human cancer cells and erythrocytes. *Acta Amazônica*.
11. Wannes WA et al (2010). Antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts from myrtle (*Myrtus communis* var. *italica* L.) leaf, stem and flower. *Food and Chemical Toxicology*; 48(5): 1362-1370.
12. Mendes SS et al. (2010). Evaluation of the analgesic and anti-inflammatory effects of the essential oil of *Lippia gracilis* leaves. *Journal of Ethnopharmacology*; 129(3): 391-397.
13. 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). *Journal of Asia-Pacific Entomology*; 13: 107-109.
14. Fantinatti ECS, Duque JEL, Silva AM, Navarro-Silva MA (2007). Abundância e Agregação de Ovos de *Aedes aegypti* L e *Aedes albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae) no Norte e Noroeste do Paraná. *Neotropical Entomology*.
15. Furtado RF, Lima MGA, Neto MA, Bezerra JNS, Silva MGV (2005). Atividade Larvica de Óleos Essenciais Contra *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). *Neotropical Entomology*.

16. Pimenta ATA, Santiago GMP, Arriaga AMC, Menezes GHA, Bezerra SB (2006). Estudo fitoquímico e avaliação da atividade larvicida de *Pterodon polygalaeflorus* Benth (Leguminosae) sobre *Aedes aegypti*. Revista Brasileira de Farmacognosia; 16(4): 501-505.
17. Broglio-Micheletti SMF, Valente ECN, Souza LA, Dias NS, Araújo AMN (2009). Extratos de plantas no controle de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) em laboratório. Rev. Bras. Parasitol. Vet., Jaboticabal; 4: 44-48.
18. Côrrea JCR, Salgado HRN (2011). Atividade inseticida das plantas e aplicações: revisão. Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu; 13(4): 500-506.
19. Simas NK, Lima EC, Conceição SR, Kuster RM, Oliveira FAM (2004). Produtos naturais para o controle da transmissão da dengue: atividade larvicida de *Myroxylon balsamum* (óleo vermelho) e de terpenóides e fenilpropanóides. Quím. Nova; 27: 46-49.
20. Cavalcanti ESB, Moraes SM, Lima MA, Santana EWP (2004). Larvicidal activity of essential oils from Brazilian plants against *Aedes aegypti* L. Mem Inst Oswaldo Cruz; 99: 541- 544.
21. Costa, JGM, Rodrigues, FFG, Angélico EC, Silva MR, Mota ML, Santos NKA, et al. (2005). Estudo químico-biológico dos óleos essenciais de *Hyptis martiusii*, *Lippia sidoides* e *Syzigium aromaticum* frente às larvas do *Aedes aegypti*. Revista Brasileira de Farmacognosia; 15(4): 304-309.
22. Furtado RF, Lima MGA, Neto MA, Bezerra JNS, Silva MGV (2005). Atividade Larvicida de Óleos Essenciais Contra *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). Neotropical Entomology.

23. Chaieb K, Hajlaoui H, Zmantar T, Kahla-Nakbi AB, Rouabhia M, Mahdouani K, et al. (2007). The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzigium aromaticum* L. Myrtaceae): a short review.
24. Gonsalves JKMC, Costa AMB, Sousa DP, Cavalcanti SCH, Nunes RS (2009). Microencapsulação do óleo essencial de *Citrus sinensis* (L) Osbeck pelo método da coacervação simples. Scientia Plena.
25. Barbosa JD, Silva VB, Alves PB, Gumina G., Santos RL, Sousa DP, et al. (2012) Structure–activity relationships of eugenol derivatives against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae. Pest management Science; 68(11): 1478-1483.
26. Murugan K, Mahesh Kumar P, Kovendan K, Amerasan D, Subrmaniam J, Hwang JS (2012). Larvicidal, pupicidal, repellent and adulticidal activity of *Citrus sinensis* orange peel extract against *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). Parasitol; 111(4): 1757-69.
27. Warikoo R, Ray A, Sandhu JK, Samal R, Wahab N, Kumar S (2012). Larvicidal and irritant activities of hexane leaf extracts of *Citrus sinensis* against dengue vector *Aedes aegypti* L. Asian Pac J Trop biomed.
28. Fayemiwo KA, Adeleke MA, Awojide SH, Awoniyi IO (2014). Asian Pac J Trop Biomed; 4(1): 30–34.
29. World Health Organization – WHO (2005), Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides, Geneva:
30. World Health Organization – WHO (2008). [on line] disponível em <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/> [2008 novembro 18].
31. Leora Software (1987). Polo-PC :Probit or Logit analysis. Berkeley.
32. Finney DJ, Stevens WL (1948). A table for the calculation of working probits and weights in probit analysis. Biometrika; 35:191-201.

33. Clements AN (2000). The biology of mosquitoes. sensory, reception and behaviour. Wellinford: CABI:553-625.
34. Marques GRA, Monteiro LSM, Chaves LLNS, Arduíno MB, Chaves FJM (2013). Água de abastecimento público de consumo humano e oviposição de *Aedes aegypti* Public drinking water supply and egg laying by *Aedes aegypti*. *Rev Saúde Pública*; 47(3):579-87.
35. Mazzarri M B, Georghiou GP (1995). Characterization of resistance to organophosphate, carbamate and pyrethroid insecticides in field populations of *Aedes aegypti* from Venezuela. *J. Am. Mosq. Control Asso.*
36. Bliss CI (1935). The calculator of the dosage-mortality curve. *Annals of Applied Biology*; 22:134-167.
37. Fisher RA. Appendix to Bliss (1935): The case of zero survivors. *Annals of Applied Biology*; .22: 164-165.
38. Brindley WA, Selim AA (1984). Synergism and antagonism in the analysis of insecticide resistance. *Environmetal Entomology*; 13:348-353.

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os óleos essenciais de *C. sinensis* e *S. aromaticum* possuem atividade larvicida semelhante em populações de *A. aegypti* com diferentes perfis de susceptibilidade ao organofosforado temephos, portanto possuem o potencial para serem utilizados nos programas de controle de vetores como alternativa de manejo a resistência, porém os aspectos de sua volatilidade deverão ser considerados para o desenvolvimento de formulações, visando à diminuição da ação repelente sobre o comportamento de oviposição das fêmeas do vetor.

***PLOS ONE* Manuscript Guidelines**

1. Format Requirements

PLOS ONE does not consider presubmission inquiries. All submissions should be prepared with the following files:

- Cover letter
- Manuscript, including tables and figure legends
- Figures (guidelines for preparing figures can be found at the)

Prior to submission, authors who believe their manuscripts would benefit from professional editing are encouraged to use language-editing and copyediting services. Obtaining this service is the responsibility of the author, and should be done before initial submission. These services can be found on the web using search terms like "scientific editing service" or "manuscript editing service." Submissions are not copyedited before publication.

Submissions that do not meet the *PLOS ONE* Publication Criterion for language standards may be rejected.

Cover Letter

You should supply an approximately one page cover letter that:

- Concisely summarizes why your paper is a valuable addition to the scientific literature
- Briefly relates your study to previously published work
- Specifies the type of article you are submitting (for example, research article, systematic review, meta-analysis, clinical trial)
- Describes any prior interactions with PLOS regarding the submitted manuscript
- Suggests appropriate *PLOS ONE* Academic Editors to handle your manuscript Lists any recommended or opposed reviewers

Your cover letter should not include requests to reduce or waive publication fees. Should your manuscript be accepted, you will have the opportunity to include your requests at that time.

Manuscript Organization

PLOS ONE considers manuscripts of any length. There are no explicit restrictions for the number of words, figures, or the length of the supporting information, although we encourage a concise and accessible writing style. We will not consider monographs.

All manuscripts should be double-spaced and include line numbers and page numbers.

Manuscripts should begin with the ordered sections:

- Title
- Authors
- Affiliations
- Abstract
- Introduction

and end with the sections of:

- Acknowledgments
- References
- Figure Legends
- Tables

Figures should not be included in the main manuscript file. Each figure must be prepared and submitted as an individual file. Find more information about preparing figures [here](#).

The title, authors, and affiliations should all be included on a title page as the first page of the manuscript file.

There are no explicit requirements for section organization between these beginning and ending sections. Articles may be organized in different ways and with different section titles, according to the authors' preference. In most cases, internal sections include:

- Materials and Methods
- Results
- Discussion
- Conclusions (optional)

PLOS ONE has no specific requirements for the order of these sections, and in some cases it may be appropriate to combine sections. Guidelines for individual sections can be found below.

Abbreviations should be kept to a minimum and defined upon first use in the text. Non-standard abbreviations should not be used unless they appear at least three times in the text.

Standardized nomenclature should be used as appropriate, including appropriate usage of species names and SI units.

2. Guidelines for Standard Sections

Title

Manuscripts must be submitted with both a full title and a short title, which will appear at the top of the PDF upon publication if accepted. Only the full title should be included in the manuscript file; the short title will be entered during the online submission process.

The full title must be 250 characters or fewer. It should be specific, descriptive, concise, and comprehensible to readers outside the subject field. Avoid abbreviations if possible. Where appropriate, authors should include the species or model system used (for biological papers) or type of study design (for clinical papers).

Examples:

- Impact of Cigarette Smoke Exposure on Innate Immunity: A *Caenorhabditis elegans* Model
 - Solar Drinking Water Disinfection (SODIS) to Reduce Childhood Diarrhoea in Rural Bolivia: A Cluster-Randomized, Controlled Trial
- The short title must be 50 characters or fewer and should state the topic of the paper.

Authors and Affiliations

All author names should be listed in the following order:

- First names (or initials, if used),
- Middle names (or initials, if used), and
- Last names (surname, family name)

Each author should list an associated department, university, or organizational affiliation and its location, including city, state/province (if applicable), and country. If the article has been submitted on behalf of a consortium, all author names and affiliations should be listed at the end of the article.

This information cannot be changed after initial submission, so please ensure that it is correct.

To qualify for authorship, a researcher should contribute to all of the following:

1. Conception and design of the work, acquisition of data, or analysis and interpretation of data
2. Drafting the article or revising it critically for important intellectual content
3. Final approval of the version to be published

All persons designated as authors should qualify for authorship, and all those who qualify should be listed. Each author must have participated sufficiently in the work to take public responsibility for appropriate portions of the content. Those who

contributed to the work but do not qualify for authorship should be listed in the acknowledgments.

When a large group or center has conducted the work, the author list should include the individuals whose contributions meet the criteria defined above, as well as the group name.

One author should be designated as the corresponding author, and his or her email address or other contact information should be included on the manuscript cover page. This information will be published with the article if accepted.

Abstract

The abstract should:

- Describe the main objective(s) of the study
- Explain how the study was done, including any model organisms used, without methodological detail
- Summarize the most important results and their significance
- Not exceed 300 words

Abstracts should not include:

- Citations
- Abbreviations, if possible

Introduction

The introduction should:

- Provide background that puts the manuscript into context and allows readers outside the field to understand the purpose and significance of the study
- Define the problem addressed and why it is important
- Include a brief review of the key literature
- Note any relevant controversies or disagreements in the field
- Conclude with a brief statement of the overall aim of the work and a comment about whether that aim was achieved

Materials and Methods

This section should provide enough detail to allow suitably skilled investigators to fully replicate your study. Specific information and/or protocols for new methods should be included in detail. If materials, methods, and protocols are well established, authors may cite articles where those protocols are described in detail, but the submission should include sufficient information to be understood independent of these references.

We encourage authors to submit detailed protocols for newer or less well-established methods as Supporting Information. Methods sections of papers on research using human or animal subjects and/or tissue or field sampling must include required ethics statements. See the Reporting Guidelines for human research, clinical trials, animal research, and observational and field studies for more information.

Methods sections of papers with data that should be deposited in a publicly available database should specify where the data have been deposited and provide the relevant accession numbers and version numbers, if appropriate. Accession numbers should be provided in parentheses after the entity on first use. If the accession numbers have not yet been obtained at the time of submission, please state that they will be provided during review. They must be provided prior to publication.

Methods sections of papers using cell lines must state the origin of the cell lines used.

Methods sections of papers adding new taxon names to the literature must follow the Reporting Guidelines below for a new zoological taxon, botanical taxon, or fungal taxon.

Results, Discussion, and Conclusions

These sections may all be separate, or may be combined to create a mixed Results/Discussion section (commonly labeled "Results and Discussion") or a mixed Discussion/Conclusions section (commonly labeled "Discussion"). These sections may be further divided into subsections, each with a concise subheading, as appropriate. These sections have no word limit, but the language should be clear and concise.

Together, these sections should describe the results of the experiments, the interpretation of these results, and the conclusions that can be drawn. Authors should explain how the results relate to the hypothesis presented as the basis of the study and provide a succinct explanation of the implications of the findings, particularly in relation to previous related studies and potential future directions for research.

PLOS ONE editorial decisions do not rely on perceived significance or impact, so authors should avoid overstating their conclusions.

Acknowledgments

People who contributed to the work but do not fit the *PLOS ONE* authorship criteria should be listed in the acknowledgments, along with their contributions. You must ensure that anyone named in the acknowledgments agrees to being so named.

Funding sources should not be included in the acknowledgments, or anywhere in the manuscript file. You will provide this information during the manuscript submission process.

References

General guidelines

- Authors may cite any and all available works in the reference list.
- Authors may not cite unavailable and unpublished work, including manuscripts that have been submitted but not yet accepted (e.g., “unpublished work,” “data not shown”).
- If an article is submitted to a journal and also publicly available as a pre-print, the pre-print may be cited.
- If related work has been submitted to PLOS ONE or elsewhere, authors should include a copy with the submitted article as confidential supplementary information, for review purposes only.
- Authors should not state 'unpublished work' or 'data not shown,' but instead include those data as supplementary material or deposit the data in a publicly available database.
- Authors should not state 'unpublished work' or 'data not shown,' but instead include those data as supplementary material or deposit the data in a publicly available database.

Reference formatting

References must be listed at the end of the manuscript and numbered in the order that they appear in the text. In the text, citations should be indicated by the reference number in brackets. Journal name abbreviations should be those found in the NCBI databases. A number of reference software companies supply PLOS style files (e.g., Reference Manager, EndNote).

References should be formatted as follows:

- **Published papers.** Hou WR, Hou YL, Wu GF, Song Y, Su XL, et al. (2011) cDNA, genomic sequence cloning and overexpression of ribosomal protein gene L9 (rpL9) of the giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*). Genet Mol Res 10: 1576-1588.

Note: Use of a DOI number for the full-text article is acceptable as an alternative to or in addition to traditional volume and page numbers.

- **Accepted, unpublished papers.** Same as above, but “In press” appears instead of the page numbers.
- **Electronic journal articles.** Huynen MMTE, Martens P, Hilderlink HBM (2005) The health impacts of globalisation: a conceptual framework. *Global Health* 1: 14. Available: <http://www.globalizationandhealth.com/content/1/1/14>. Accessed 25 January 2012.
- **Books.** Bates B (1992) *Bargaining for life: A social history of tuberculosis*. Philadelphia: University of Pennsylvania Press. 435 p.
- **Book chapters** Hansen B (1991) New York City epidemics and history for the public. In: Harden VA, Risse GB, editors. *AIDS and the historian*. Bethesda: National Institutes of Health. pp. 21-28.
- **Published media, not peer-reviewed. Examples: print or online newspapers and magazine articles.** Fountain H (29 Jan 2014). For Already Vulnerable Penguins, Study Finds Climate Change Is Another Danger. *The New York Times*. Available: <http://www.nytimes.com/2014/01/30/science/earth/climate-change-taking-toll-on-penguins-study-finds.html>. Accessed 17 March 2014.
- **New media, unregulated. Examples: blogs, websites, and other written works.** Allen L (01 Sept 2010) Announcing PLOS Blogs. Available: <http://blogs.plos.org/plos/2010/09/announcing-plos-blogs/>. Accessed 17 March 2014.
- **Master of Science and Doctor of Philosophy theses.** Wells A (1999) Exploring the development of the independent, electronic, scholarly journal. M.Sc. Thesis, The University of Sheffield. Available: <http://cuminCAD.scix.net/cgi-bin/works/Show?2e09>. Accessed 17 March 2014.
- **Databases and repositories. Examples: figshare, archive.com.** Roberts SB (2013) QPX Genome Browser Feature Tracks. Database: figshare. http://figshare.com/articles/QPX_Genome_Browser_Feature_Tracks/701214. Accessed 17 March 2014.

- **Multimedia. Examples: videos, movies, and TV shows.** Hitchcock A, producer and director (1954) Rear Window [Film]. Los Angeles: MGM.

Tables

Tables should be included at the end of the manuscript. All tables should have a concise title. Footnotes can be used to explain abbreviations. Citations should be indicated using the same style as outlined above. Tables occupying more than one printed page should be avoided, if possible. Larger tables can be published as Supporting Information.

Figure Legends

Figures should **not** be included in the manuscript file, but figure legends should be. Figure legends should describe the key messages of a figure. Legends should have a short title of 15 words or less. The full legend should have a description of the figure and allow readers to understand the figure without referring to the text. The legend itself should be succinct, avoid lengthy descriptions of methods, and define all non-standard symbols and abbreviations.