

EFECTO REPELENTE DE UN EXTRACTO ALCOHÓLICO DE *Syzygium aromaticum* (*Eugenia caryophyllata* L. MYRTACEAE) CONTRA *Aedes aegypti* (LINNAEUS, 1792) SOBRE PIEL HUMANA

Irma F. Agrela, Kerly Palacios, Flor Herrera

Instituto de Investigaciones Biomédicas "Dr. Francisco Triana Alonso" (BIOMED), Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad de Carabobo. Maracay, Estado Aragua. Venezuela

Autor de Correspondencia: Irma F. Agrela. Correo:agrelairma@hotmail.com

Recibido: 12 Diciembre 2012. Aceptado: 21 Febrero 2013

RESUMEN

El uso de repelentes de aplicación tópica evita las molestias ocasionadas por artrópodos hematófagos y representa una alternativa para disminuir el contacto hombre-vector. El N,N-dietil-3-metilbenzamida (DEET) es un producto efectivo aunque se ha reportado reacciones alérgicas y reacciones tóxicas y es por ello que existe gran interés en el desarrollo de repelentes a base de hierbas o aceites esenciales. Con el propósito de evaluar el efecto repelente sobre piel humana de un extracto alcohólico de *Syzygium aromaticum* (Clavo de Olor) se realizaron bioensayos utilizando el método estandarizado por la OMS y dos cepas de *Aedes aegypti* [Distrito Capital (DC) y Rockefeller] frente a un repelente comercial a base de DEET. Los ensayos demostraron que el efecto repelente del extracto aumenta significativamente al aumentar el periodo de maceración y después de 168 y 744 horas de maceración el efecto repelente resultó entre el 70 y 80%. Aunque el efecto repelente del producto comercial a base de DEET fue más prolongado, el extracto obtenido a partir de *S. aromaticum* brinda un 60% protección una hora después de su aplicación.

Palabras clave: *Aedes aegypti*, dengue, repelente, tiempo de protección, *Syzygium aromaticum*

Repellent effect of an alcoholic extract of *Syzygium aromaticum* (*Eugenia caryophyllata* L. myrtaceae) against *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1792) on human skin

ABSTRACT

The use of repellents for topical application avoids the annoyance caused by hematophagous arthropods and represents an alternative to reduce the contact man-vector. The N,N-diethyl-3-methylbenzamide (DEET) is an effective repellent although it has been reported to cause allergic and toxic reactions. There is therefore great interest in the development of alternative repellents from natural sources like plant essential oils. In order to evaluate the repellent effect of an alcoholic extract of *Syzygium aromaticum* (clove) on human skin, bioassays based on a standard protocol were performed using two strains of *Aedes aegypti* [Distrito Capital (DC) and Rockefeller]. The results showed that the repellent effect of the extract significantly raised by increasing the maceration period; after 168 and 744 hours the repellent effect was between 70 and 80%. The repellence of the DEET lasted longer than the one

from the extract, although at one hour, the extract was still effective at 60 % one hour after application.

Keywords: *Aedes aegypti*, dengue, repellent, protection time, *Syzygium aromaticum*

INTRODUCCIÓN

Una de las principales estrategias utilizadas para el control de enfermedades transmitidas por artrópodos tales como el dengue y la malaria se fundamenta en el uso de insecticidas; no obstante, su uso ha conducido al desarrollo de resistencia por parte de las diferentes especies de artrópodos transmisores de enfermedades (1-3) y provocado daños al medio ambiente. La búsqueda de estrategias más amigables con el medio ambiente ha llevado a diferentes grupos de investigación a explorar la posibilidad de reducir el contacto hombre-vector mediante el uso de productos obtenidos a partir de plantas con efectos repelentes para insectos de importancia médica.

En el mercado existen numerosos productos que utilizan el DEET (N,N-dietil-3-metilbenzamida) como repelente de insectos y aunque este compuesto es un repelente eficaz frente a diferentes especies de mosquitos y garrapatas (4-6); se ha reportado tanto reacciones alérgicas como efectos neurotóxicos, particularmente en niños y mujeres embarazadas (7-9); por otra parte, la mayoría de los usuarios de repelentes a base de DEET señalan que el olor es desagradable y que estos productos dejan una sensación grasosa en la piel.

Los inconvenientes asociados al uso de productos a base de DEET son un motivo para la búsqueda de alternativas y cada vez cobran fuerzas los repelentes de origen natural a base de hierbas o aceites esenciales obtenidos a partir de plantas. En la literatura existen numerosos reportes donde se muestra el efecto repelente de extractos orgánicos y aceites esenciales frente a mosquitos vectores de diversas enfermedades metaxémicas, entre ellos puede mencionarse aquellos obtenidos a partir de *Cymbopogon nardus* (10,11), *C. citratus* (12) *Apium graveolens* (13), *Corymbia spp* (14-16) y *Ocimum sp* (17-19), entre otros.

En la medicina tradicional *Syzygium aromaticum* (clavo de olor) se utiliza para aliviar el dolor y para promover la cicatrización; además se ha utilizado ampliamente en la industria de los perfumes y saborizantes (20). Se ha demostrado sus propiedades antibacterianas (21), antiparasitarias (22, 23), antivirales (24-26)

y antifúngicas (27, 28) así como también se sabe que poseen actividades antioxidantes (29-31), antiinflamatorias (32) y anestésicas (33). Aunque sus propiedades farmacológicas y medicinales son conocidas desde hace mucho tiempo; son pocas las publicaciones sobre el potencial de esta planta como repelente contra mosquitos, específicamente contra *Aedes aegypti*, por ello el motivo de la presente investigación fue evaluar el efecto repelente de un extracto alcohólico de *S. aromaticum*, sobre piel humana contra *Ae. aegypti* bajo condiciones de laboratorio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención del extracto. Se colocaron 30 yemas flores de *Syzygium aromaticum* (clavo de olor), en 900 mL de isopropanol al 70% y se mantuvo en maceración durante 24, 48, 72, 168 y 744 horas; al final de cada periodo se tomó una alícuota de 100 mL del extracto y se mezcló con aceite mineral (Jhonson®) en proporción 9:1. Los extractos alcohólicos obtenidos a partir de las yemas florales de *S. aromaticum* fueron probados frente a un repelente comercial el cual contiene DEET al 7,125% (Marca OFF!, en crema; de Johnson & Johnson Inc, USA).

Mosquitos. Para el desarrollo de los ensayos se utilizaron hembras adultas pertenecientes a la especie *Ae. aegypti* obtenidas por el "Laboratorio de Resistencia a Insecticidas de la Dirección de Salud Ambiental del Ministerio del Poder Popular para la Salud" en colonias establecidas a partir de material colectado en la comunidad de La Pedrera, ubicada en la zona de Antimano, Distrito Capital y como cepa de referencia se utilizó hembras pertenecientes a la cepa Rockefeller. Los mosquitos fueron criados bajo condiciones estándares y a una temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$, humedad relativa de $65 \pm 5\%$ y fotoperiodo de 12 horas. Los mosquitos adultos fueron mantenidos con solución azucarada y se usaron palomas como fuente de la comida sanguínea.

Preparación previa de los mosquitos. Antes de la realización de los ensayos se colocaron 100 hembras adultas de 5 a 7 días de edad pertenecientes a ambas cepas de *Ae. aegypti* en jaulas separadas de 30x40x30 cm; estas no habían recibido comida sanguínea y fueron privadas de la solución azucarada 24 horas antes del ensayo.

Voluntarios. Adultos saludables de ambos sexos, con edades comprendidas entre 20 y 50 años; sin antecedentes de reacciones alérgicas a la picada de mosquitos y sin enfermedades dermatológicas aparentes fueron invitados a participar como voluntarios en este estudio. Todos los voluntarios que participaron en el estudio fueron informados acerca de los objetivos, la metodología del trabajo y los posibles efectos adversos de los productos a probar antes que firmaran una forma de consentimiento informado. Previo a la realización de los bioensayos con repelente se solicitó a cada participante el lavado riguroso de ambos

antebrazos y manos con agua y jabón. Posteriormente, se procedió a lavar ambos antebrazos con isopropanol al 70% y se dejó secar. Al momento del ensayo ambas manos fueron protegidas con guantes.

Bioensayo de repelente a diferentes tiempos de maceración. Para el desarrollo de cada ensayo se siguió el protocolo estándar para la evaluación de repelentes sobre piel humana, recomendado por la Organización Mundial de la Salud (34). Un simple ensayo comprendió el uso del mismo lote de mosquitos por el mismo voluntario y se completó en el mismo día. De cada ensayo se hicieron tres réplicas por voluntario, con lotes diferentes de mosquitos pertenecientes a ambas cepas de *Ae. aegypti*.

El antebrazo derecho fue seleccionado como control y el izquierdo para probar los extractos alcohólicos obtenidos a partir de *S. aromaticum*; dichos extractos fueron aplicados en orden creciente al tiempo de maceración.

El primer paso de cada bioensayo consistió en que cada voluntario introdujera su brazo derecho (control) en la jaula que contenía los mosquitos durante 30 segundos y se procedió a contar el número de mosquitos que se posaron o picaron en ese tiempo; luego se procedió a aplicar 1 mL del solvente del producto a ensayar (isopropanol) en el antebrazo derecho, se dejó secar durante dos minutos y se solicitó a cada participante introducir nuevamente el antebrazo en la jaula por 30 segundos. Con la finalidad de considerar válido el ensayo, el número de mosquitos que se posaron o picaron en el antebrazo control en 30 segundos debió ser superior o igual a 10.

Posteriormente, se aplicó 1 mL del producto a ensayar en el antebrazo izquierdo, se dejó secar durante dos minutos y entonces el participante introdujo este antebrazo en la jaula durante 30 segundos, tiempo durante el cual se contó el número de mosquitos que se posaron o picaron. Finalmente, se aplicó una cantidad suficiente del repelente comercial en el antebrazo derecho siguiendo las recomendaciones del fabricante, se solicitó al participante que introdujera su antebrazo derecho en la jaula con los mosquitos y se contabilizó el número de mosquitos que se posaron o picaron durante 30 segundos.

Tiempo de protección del extracto alcohólico obtenido a partir de *S. aromaticum*. Para ello se siguió el protocolo propuesto por la Organización Mundial de la Salud (34), en el mismo grupo de voluntarios y utilizando ambas cepas de *Ae. aegypti* (Distrito Capital y Rockefeller). En los ensayos se colocaron en dos jaulas separadas, grupos aproximados de 100 mosquitos, pertenecientes a una misma cepa y a un mismo lote, identificadas como jaula control (repelente comercial) y jaula muestra (extracto alcohólico obtenido de *S. aromaticum*) respectivamente. El antebrazo derecho se utilizó como control y en él se aplicó el repelente comercial siguiendo las indicaciones del fabricante

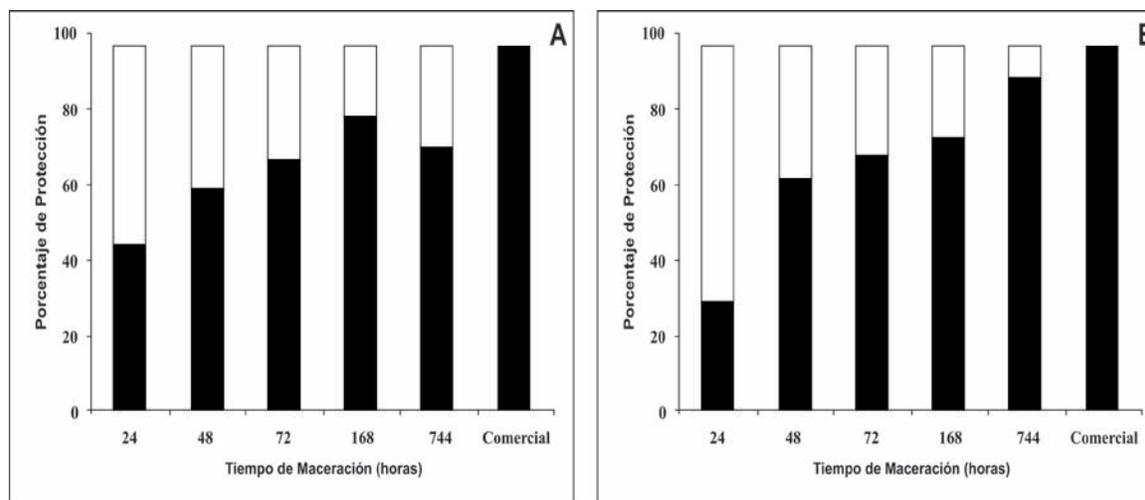


Figura 1. Porcentaje de protección obtenido con el extracto alcohólico de *Syzygium aromaticum* y el repelente comercial (Off!, DEET al 7,125%, crema) (porción de la barra de color negro) y la diferencia del porcentaje de protección entre ambos productos (porción de la barra de color blanco). A: *Aedes aegypti* cepa Rockefeller; B: *Ae. aegypti* cepa Distrito Capital

mientras que el antebrazo izquierdo fue usado como prueba y en él se aplicó 1 mL del extracto alcohólico de *S. aromaticum* obtenido después de 72 horas de maceración previo a la confirmación del criterio de validación del ensayo y se procedió a cuantificar el número de mosquitos que se posaron o picaron durante 30 segundos. Este proceso fue repetido durante 90 minutos cada 30 minutos, sin reaplicar los repelentes.

Análisis de los resultados. Para propósitos del estudio el porcentaje de protección fue calculado de la siguiente manera $p = [1 - (T/C)] * 100$; donde "T" correspondió al número de mosquitos que se posaron o picaron sobre el antebrazo prueba (izquierdo) y "C" fue igual al número de mosquitos que se posaron o picaron sobre el antebrazo control (derecho) (34).

Posteriormente, el efecto del tiempo de maceración de

los extractos obtenidos a partir de *S. aromaticum* y la cepa de *Ae. aegypti* en el porcentaje de protección se evaluó mediante un análisis de varianza de dos vías. En caso de existir diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos y la cepa de mosquito éstas fueron evaluadas mediante la prueba de Tukey. Mientras que el tiempo de protección del extracto alcohólico de *S. aromaticum* y el repelente de referencia (DEET) frente a las dos cepas de *Ae. aegypti* fue evaluado mediante la prueba de t de student.

RESULTADOS

Bioensayo de repelente a diferentes tiempos de maceración. Los resultados obtenidos demostraron el efecto repelente de los extractos alcohólicos obtenidos a partir de *S. aromaticum* sobre piel humana contra

Tabla 1. Porcentaje de protección sobre piel humana de los extractos alcohólicos de *Syzygium aromaticum* obtenidos a diferentes tiempos de maceración frente a dos cepas de *Aedes aegypti* en comparación con un repelente comercial (Off!, DEET al 7,125%, crema)

Tiempo de maceración (horas)	Cepa de <i>Aedes aegypti</i>			
	Rockefeller		Distrito Capital	
	Mosquitos que se posaron o picaron	Porcentaje de Protección(*)	Mosquitos que se posaron o picaron	Porcentaje de Protección(*)
Control	27	--	18	--
24	15	44	13	28
48	11	59	7	61
72	9	67	6	67
168	6	78	5	72
744	8	70	2	89
Repelente Comercial	1	96	1	94

(*) $p = [1 - (T/C)] * 100$

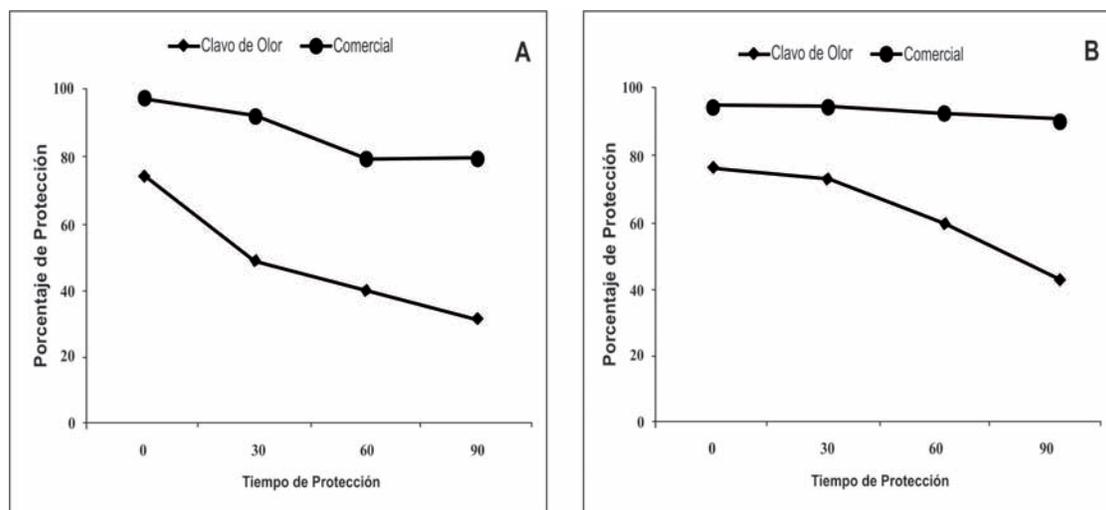


Figura 2. Tiempo de protección del extracto de *Syzygium aromaticum* y el repelente comercial (Off!, DEET 7,125%; crema) contra *Aedes aegypti* (A= cepa Rockefeller; B=cepa Distrito Capital)

ambas cepas de *Ae. aegypti*; así mismo, se observó que el porcentaje de protección incrementa con el tiempo de maceración de las yemas florales de *S. aromaticum* en isopropanol (Tabla 1).

Se observó que la diferencia entre el porcentaje de protección obtenido con los extractos alcohólicos de *S. aromaticum* y el obtenido con el repelente comercial frente a ambas cepas de *Ae. aegypti* se redujo al aumentar el tiempo de maceración (Figura 1).

El análisis estadístico de los resultados demostró que no existen diferencias estadísticamente significativas en la respuesta de los mosquitos pertenecientes a ambas cepas utilizadas ($F= 0,06$; $p =0,8050$) pero si se observaron diferencias altamente significativas en relación a los extractos alcohólicos de *S. aromaticum* y el repelente comercial ($F=12,86$ $p= 0,0001$). Aunque la prueba de Tukey demostró que los extractos obtenidos a partir de *S. aromaticum* tienen un efecto repelente menor al repelente comercial a base de DEET, la media del porcentaje de protección no difiere para los extractos obtenidos después de 744, 168 y 72 horas de maceración.

Tiempo de protección del extracto alcohólico obtenido a partir de *S. aromaticum*. La Figura 2 muestra el porcentaje de protección del extracto preparado a partir de *S. aromaticum* obtenido después de 72 horas de maceración y el efecto provisto por el repelente de referencia durante los primeros 90 minutos después de su aplicación. Aunque los resultados obtenidos muestran que el repelente comercial provee un porcentaje de protección superior al 80% frente a ambas cepas de *Aedes* a lo largo del periodo de observación, el extracto alcohólico obtenido a partir de *S. aromaticum* protege hasta 60% una hora después de su aplicación. El análisis de los resultados mostró diferencias altamente significativas entre ambos repelentes en relación al tiempo de protección

(Rockefeller: $t= 13,52$; $df= 23$; $p=0,0001$ y DC: $t=16,76$; $df=23$; $p=0,0001$).

DISCUSIÓN

Los ensayos antes descritos demostraron que el extracto alcohólico de *S. aromaticum* tiene efecto repelente contra *Ae aegypti*, aunque dicho efecto fue inferior al observado al usar el repelente comercial a base de DEET. Posiblemente, el efecto repelente de los extractos obtenidos a partir de *S. aromaticum* se deba a la presencia de eugenol, uno de los principales componentes de los extractos alcohólicos obtenidos a partir del clavo de olor y que ha sido señalado como el responsable de gran parte de sus actividades farmacológicas (20, 31).

El análisis de los resultados mostró que a mayor tiempo de maceración mayor efecto protector; esto sugiere que el efecto repelente es dosis dependiente y probablemente un mayor tiempo de maceración permite una mejor y más eficiente extracción de los principios activos presentes en clavo de olor, tal como fue observado por otros investigadores (13, 35-37).

En relación con el tiempo de protección se ha reportado que el Off! en sus diferentes presentaciones ofrece protección durante un tiempo que varía entre 3,5 y 8 horas bajo condiciones de laboratorio (13,38) en nuestro caso el porcentaje de protección resultó ser superior al 80%, 90 minutos después de su aplicación. Con respecto al porcentaje de protección del extracto alcohólico obtenido a partir de *S. aromaticum* los resultados demostraron que éste cae significativamente 1 hora después de su aplicación; probablemente esto se deba a la presencia de compuestos altamente volátiles en el extracto ya que la mayoría de los repelentes obtenidos a partir de plantas protegen contra la picada de los mosquitos por periodos cortos de tiempo (39). Diferentes autores han reportado que el efecto repelente de los extractos o aceites esenciales obtenidos a partir de diferentes plantas mejora si éstos

se mezclan con vainilla; la vainilla fija los compuestos volátiles del repelente potencial a la piel, aumentando significativamente el tiempo de protección (13, 40-42); en nuestro caso se usó aceite mineral con ese propósito, sin embargo parece no haber sido lo suficientemente efectivo.

El extracto alcohólico fue probado frente a dos cepas de *Ae. aegypti*, el principal vector del dengue en nuestro país. El comportamiento de ambas cepas de *Aedes* fue muy similar ya que el análisis estadístico no demostró diferencias significativas entre ambas cepas en relación a su comportamiento frente a los extractos alcohólicos obtenidos y el repelente comercial. La utilidad de un repelente está vinculada a su efecto protector ante el ataque de diferentes especies de artrópodos antropofílicos y en especial que protejan de las picaduras de mosquitos que no sólo son una molestia sino también vectores de enfermedades (ej., malaria, filarias, dengue). Debido a que cada especie de mosquito exhibe un comportamiento diferente frente a un repelente en particular (43) es indispensable realizar pruebas sobre piel humana con el extracto alcohólico de *S. aromaticum* frente a otras especies de mosquitos particularmente aquellos pertenecientes a los géneros *Culex* y *Anopheles*.

Aparte de los efectos alérgicos y neurotóxicos del DEET ya citados, uno de los inconvenientes de muchos repelentes comerciales a base de DEET es la falta de aceptación por parte de los usuarios (13). Los voluntarios que participaron en este estudio manifestaron que el extracto alcohólico obtenido de *S. aromaticum* tiene un aroma muy agradable y no deja sensación grasosa en la piel; además, aunque el estudio no fue suficiente para asegurar que el extracto no causa reacciones adversas, los participantes no manifestaron irritación o dermatitis durante el estudio.

Finalmente, es importante señalar que aunque el repelente comercial a base de DEET resultó ser más efectivo y brinda un tiempo de protección mayor, probablemente el costo de este producto no está al alcance de la mayoría de nuestra población, la preparación del extracto alcohólico probado durante la realización de esta investigación puede ser realizada por la población usando recursos técnicos sencillos y empleando para ello elementos que puede adquirir en los mercados locales a muy bajo costo, lo cual significa una opción para personas de escasos recursos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores quieren agradecer a todas las personas que tan gentilmente participaron en el estudio como voluntarios. También agradecemos al Sr. Jesús González y a la Economista Karen Flores del Laboratorio de Resistencia a Insecticidas de la Dirección de Salud Ambiental del Ministerio del Poder Popular para la Salud, por facilitar el material biológico utilizado durante el desarrollo de estos ensayos. La ejecución de este trabajo de investigación fue posible

gracias al financiamiento del Fondo Nacional para la Ciencia, Investigación y Tecnología (FONACIT) a través de Misión Ciencia, Sub-proyecto: Nuevas alternativas tecnológicas para la prevención y el control del dengue con la participación ciudadana.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Brooke BD, Humb RH, Koekemorer LL, Dossou-Yovo J, Coetzee M. Evaluation of a polymerized chain reaction assay for detection of pyrethroid insecticide resistance in the malaria vector species of the *Anopheles gambiae* complex. *J Am Mosq Control Assoc.* 2000; 15: 565-568
2. Severini C, Rom R, Marinucci M, Rajmond M. Mechanisms of insecticide resistance in field populations of *Culex pipiens* from Italy. *J. Am. Mosq Control Assoc.* 1993; 9:164-168
3. World Health Organization. WHO Expert comite on vector biology and control vector resistance to pesticides: fifteenth report of the expert committee on vector biology and control. WHO. Organization Technical Report Series. 1992; 818: 1-62
4. Frances SP, Bugoro H, Butafa C, Cooper RD. Field evaluation of DEET against *Anopheles farauti* al Ndendo (Santa Cruz) Island, Solomon Islands. *J. Med. Entomol.* 2010; 45 (5): 851-854
5. Golenda CF, Solberg VB, Burge R, Gambel JM, Wirth RA. Gender- related efficacy difference to an extended duration formulation of topical N, N diethyl-m-toluamide (DEET). *Am J Trop Med Hyg.* 1999; 60: 654-657
6. Frances SP, Eamsila C, Pilakasiri C, Linthicum KJ. Effectiveness of repellent formulations containing DEET against mosquitoes in northeastern Thailand. *J Am Mosq Control Assoc.* 1996; 12 (2Pt 1): 331-333
7. Koren G, Matsui D, Bailey B. DEET- based insect repellents: safety implications for children and pregnant and lactating women. *CMAJ.* 2003; 169 (3): 209-212
8. Briassoulis G, Narlioglou M, Hatzis T. Toxic encephalopathy associated with use of DEET insect repellents: a case analysis of its toxicity in children. *Hum Exp Toxicol* 2001; 20:8-14
9. Roland E, Jan J, Rigg JM. Toxic encephalopathy in a child after brief exposure to insect repellents. *Can Med Assoc J.* 1985; 1 (32): 155-156.
10. Müller GC, Junnila A, Butler J, Kravchenko VD, Revay EE, Weis RW, Schlein Y. Efficacy of botanical repellents geraniol, linalool, and citronella against mosquitoes. *J. Vector Ecol.* 2009; 34 (1): 2-8
11. Lindsay LR, Surgeoner GA, Heal JD, Gallivan GJ. Evaluation of efficacy of 3% citronella candles and 5% citronella incense for protection against field populations of *Aedes* mosquitoes. *J. Am Mosq Control Assoc.* 1996; 12 (2 Pt 1): 293-4
12. Pushpanathan T, Jebanesan A, Govindarajan M. Larvicidal, ovicidal and repellent activities of *Cymbopogon citratus* Stapf (Gramineae) essential

- oil against the filarial mosquito *Culex quinquefasciatus* (say) (Diptera: Culicidae). Trop Biomed. 2006; 23 (2): 208-12
13. Tuetun B, Choochote W, Kanjanapothi D, Rattanachanpichai E, Chaithong U, Chaiwong P, Jitpakdi A, Tippawangkosol P, Riyong D, Pitasawat B. Repellent properties of celery, *Apium graveolens* L., compared with commercial repellents, against mosquitoes under laboratory and field conditions. Trop Med Int Health. 2005; 10 (11): 1190-8
14. Trigg JK. Evaluation of eucalyptus-based repellent against *Anopheles spp* in Tanzania. J. Am Mosq Control Assoc. 1996; 12 (2 Pt 1) 243-6
15. Moore SJ, Hill N, Ruiz C, Cameron MM. Field evaluation of traditionally use plant-based insect repellents and fumigants against the vector *Anopheles darlingi* in Riberalta Bolivian Amazon. J. Med. Entomol. 2007a; 44 (4): 624-30
16. Moore SJ, Darling ST, Sihuincha M, Padilla N, Devine GJ. A low-cost repellent for malaria vectors in the Americas: results of two field trials in Guatemala and Peru. Maral J. 2007b; 6:101. También disponible en <http://malariajournal.com/content/6/1/101>
17. Kweka E J, Mosha F W, Lowassa A, Mahande A M, Mahande MJ, Massenga C P, Tenu F, Lyatuu EE, Mboya MA, Temu E. Longitudinal evaluation of *Ocimum* and other plants effects on the feeding behavioral response of mosquitoes (Diptera: Culicidae) in the field in Tanzania. Parasit & Vectors. 2008a; 1:42 (<http://www.parasitesandvectors.com/content/1/1/42>)
18. Kweka E J, Mosha F, Lowassa A, Mahande A M, Kitau J, Matowo J, Mahande MJ, Massenga C P, Tenu F, Feston E, Lyatuu EE, Mboya MA, Mndeme R, Chuwa G, Temu E.. Ethnobotanical study of some of mosquito repellent plant in north-eastern Tanzania. Maral J. 2008b; 7:152 (<http://www.malariajournal.com/content/7/1/152>)
19. Oparaocha E T, Iwu I, Ahanaku J E. Preliminary study on mosquito repellent and mosquitocidal activities of *Ocimum gratissimum* (L.) grown in Eastern Nigeria. J. Vector Borne Dis. 2010; 47: 45-50
20. Chaieb K, Hajlaoui H, Zmantar T, Kahla-Nakbi AB, Rouabhia M, Mahdouani K, Bakhrouf A. The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzygium aromaticum* L. Myrtaceae): a short review. Phytother Res. 2007a; 21 (6): 501-6
21. Mandal S, Manisha DebMandal, Saha K, Pal NK. In vitro antibacterial activity of three Indian spices against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Oman Med J. 2011; 26 (5): 319-23
22. Machado M, Dinis AM, Salgueiro L, Custódio JB, Cavaleiro C, Sousa MC. Anti-giardia activity of *Syzygium aromaticum* essential oil and eugenol: effects on growth, viability, adherence and ultrastructure. Exp. Parasitol. 2011; 127 (4): 732-9
23. Bagavan A, Rahuman AA, Kaushik NK, Sahal D. In vitro antimalarial activity of medicinal plants extracts against *Plasmodium falciparum*. Parasitol Res. 2011; 108 (1): 15-22
24. Kurokawa M, Hozumi T, Tsurita M, Kadota S, Namba T, Shiraki K. Biological characterization of eugenin as anti-herpes simplex virus type 1 compound in vitro and in vivo. J. Pharmacol Exp. Ther. 2001; 297(1): 372-379
25. Kurokawa M, Hozumi T, Basnet P, Nakano M, Kadota S, Namba T, Kawana T, Shiraki K. Purification and characterization of eugenin as an anti-herpesvirus compound from *Geum japonicum* and *Syzygium aromaticum*. J. Pharmacol Exp. Ther. 1998; 284 (2): 728-35
26. Yukawa TA. Kurokawa M, Sato H, Yoshida Y, Kageyama S, Hasegawa T, Namba T, Imakita M, Hozumi T, Shiraki K. Prophylactic treatment of cytomegalovirus infection with traditional herbs. Antiviral Res. 1996; 32 (2):63-70
27. Pinto E, Vale-Silva L, Cavaleiro C, Salgueiro L. Antifungal activity of clove essential oil from *Syzygium aromaticum* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophytes species. J. Med. Microbiol. 2009; 58 (Pt 11): 1454-62
28. Chaied K, Zmantar T, Ksouri R, Hajlaoui H, Mahdouani K, Abdelly C, Bakhrouf A. Antioxidant properties of essential oil of *Eugenia caryophyllata* and its antifungal activity against a large number of clinical *Candida* species. Mycoses. 2007b; 50 (7): 403-6
29. Yoshimura M, Amakura Y, Yoshida T. Polyphenolic compounds in clove and pimento and their antioxidative activities. Biosci Biotechnol Biochem. 2011; 75 (11): 2207-12
30. Niwano Y, Saito K, Yoshizaki F, Kohno M, Ozawa T. Extensive screening for herbal extracts with potent antioxidant properties. J. Clin. Biochem Nutr. 2011; 48 (1): 78-84
31. Jirovetz L, Bucbauer G, Stoilova I, Stoyanova A, Krastanov A, Schmidt E. Chemical composition and antioxidant properties of clove leaf essential oil. J. Agric Food Chem. 2006; 54 (17): 6303-7
32. Bachiega TF, de Sousa JP, Bastos JK, Sforcin JM. Clove and eugenol in noncytotoxic concentrations exert immunomodulatory/anti-inflammatory action on cytokine production by murine macrophages. J Pharm Pharmacol. 2012; 64(4): 610-616
33. Ghelardini C, Galeotti N, Di Cesare Mannelli L, Mazzanti G, Bartolini A. Local anaesthetic activity of beta-caryophyllene. Farmaco. 2001; 56(5-7): 387-389
34. OMS. Guidelines for efficacy testing of mosquito repellents for human skin. 2009; (<http://www.who/html/ntd/whopes/2009-4>)
35. Panneerselvam C, Murugan K, Kovendan K, Mahesh Kumar P. Mosquito larvicidal, pupicidal, adulticidal and repellent activity of *Artemisia nilagirica* (Family: Compositae) against *Anopheles stephensi* and

Aedes aegypti. Parasitol Res. 2012; 111(6): 2241-51

36. Rajkumar S, Jebanesan A. Oviposition deterret and skin repellent activities of *Solanum trilobatum* leaf extract against the malarial vector *Anopheles stephensi*. J. Insect Sci. 2005; 5:15

37. Conti B, Benelli G, Leonardi M, Afifi FU, Cervelli C, Profeti R, Pistelli L, Canale A. Repellent effect of *Salvia dorisiana*, *S. longifolia* and *S. sclarea* (Lamiaceae) essential oils against the mosquito *Aedes albopictus* Skuse (Diptera: Culicidae). Parasitol Res. 2012; 111(1): 291-299

38. Barnard DR, Xue RD. Laboratory evaluation of mosquito repellents against *Aedes albopictus*, *Culex nigripalpus* and *Ochlerotatus triseriatus* (Diptera: Culicidae). J Med Entomol. 2004; 41: 726-730

39. Ferreira M, Moore SJ. Plant-based insect repellents: a review of their efficacy, development and testing. Malaria J. 2011; 10 (suppl 1): S11 (<http://www.malariajournal.com/content/10/S1/S11>)

40. Tawatsin a, Wratten SD, Scott RR, Thavara U, Techadamrongsin Y. Repellency of volatile oils from plants against three mosquito vectors. J Vector Ecol. 2001; 26(1): 72-82

41. Kongkaew C, Sakunrag I, Chaiyakunapruk N, Tawatsin A. Effectiveness of citronella preparations in preventing mosquito bites: systematic review of controlled laboratory experimental studies. Trop Med Int Health. 2011; 16 (7): 802-810.

42. Kim SI, Yoon JS, Baeck SJ, Lee SH, Ahn YJ, Kwon HW. Toxicity and synergic repellency of plant essential oil mixtures with vanillin against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). J Med Entomol. 2012; 49 (4): 876-885

43. Robert LL, Hallam JA, Seeley DC, Roberts LW, Wirtz RA. Comparative sensitivity of four *Anopheles* (Diptera: Culicidae) to five repellents. J Med Entomol. 1991; 28 (3): 417-420.