

Plantas medicinais tropicais e mediterrânicas com propriedades biocidas no controlo de insetos vetores

Tropical and mediterranean medicinal plants with biocide properties for insect vector control

Diara Kady Rocha

Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa.
diara@ihmt.unl.pt

Olívia Cruz de Matos

Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, INIAV.
Unidade de Parasitologia e Microbiologia Médicas, IHMT,
oliviamatos@sapo.pt

Cristina Moiteiro

Faculdade de Ciência da Universidade de Lisboa.
Departamento de Química e Bioquímica, CQB,
cmmoiteiro@fc.ul.pt

Marilene Djata Cabral

UniCV, Campus Palmarejo, Praia, Cabo Verde;
marilena.cabral@docente.unicv.edu.cv

Maria Teresa Novo

Instituto de Higiene e Medicina Tropical,
Unidade de Parasitologia e Microbiologia Médicas, IHMT.
Universidade Nova de Lisboa
tenovo@ihmt.unl.pt

Resumo

Há milénios que as civilizações têm recorrido às plantas e suas virtudes terapêuticas para prevenir e combater doenças.

O progressivo aumento de resistências dos insetos vetores de parasitoses e arboviroses conduziu a restrições na aplicação de inseticidas químicos e/ou à introdução de novos compostos sintéticos. Devido à redução de compostos disponíveis, assiste-se a um aumento da procura de produtos de origem natural, eficazes e mais inócuos para o ambiente. A exigência do mercado e a pressão legislativa internacional tornam imperativa a pesquisa de novos produtos, promovendo o desenvolvimento de alternativas mais seguras.

Os produtos naturais de origem vegetal ressurgem como fonte de compostos biologicamente ativos para controlo de vetores. Estando a sua síntese frequentemente associada a mecanismos de defesa das plantas contra inimigos naturais, os compostos delas derivados apresentam, potencialmente, maior especificidade para os organismos-alvo, são geralmente biodegradáveis e comportam menos riscos ambientais.

O presente estudo consistiu na avaliação das propriedades biocidas de plantas medicinais tropicais e mediterrânicas, (*Sambucus nigra*, *Melia azedarach*, *Azadirachta indica*, *Foeniculum vulgare* e *Mentha pulegium*), e da sua utilidade no controlo dos culicídeos vetores de agentes patogénicos da malária e arboviroses, nomeadamente, *Anopheles arabiensis* e *Aedes aegypti*, em Cabo Verde.

Palavras Chave:

Aedes aegypti, *Anopheles arabiensis*, controlo vetorial, plantas medicinais.

Abstract

For millennia plants and their therapeutic qualities have been used by civilizations to prevent and fight against diseases. The progressive increase of resistance in target insects lead to restrictions on the application of chemical insecticides and/or on increases the search on the use of new synthetic compounds. The reduced number of safe compounds marketed new natural compounds more effective against targets and environmentally harmless. Market requirement, and international legislation pressure, makes imperative to look for such new products.

Natural plant products re-emerge as promising sources of biologically active compounds to the control of mosquito vector species. Since its synthesis is often associated to natural plant defense mechanisms against pests, plant-derived compounds generally exhibit greater specificity to target organisms, are in general biodegradable and present less environmental risks.

The present study aims to develop new safe measures to control vectors through the evaluation of the biocidal properties of tropical and Mediterranean medicinal plants (*Sambucus nigra*, *Melia azedarach*, *Azadirachta indica*, *Foeniculum vulgare* and *Mentha pulegium*), and on their usefulness to control mosquitoes that are vectors of pathogens of diseases such as malaria and arboviruses, namely, *Anopheles arabiensis* and *Aedes aegypti* in Cape Verde.

Key Words:

Aedes aegypti, *Anopheles arabiensis*, vector control, medicinal plants.

Introdução

Os mosquitos são o maior grupo de insetos responsável, a nível mundial, pela transmissão de doenças como a malária e arboviroses, nomeadamente a febre-amarela, dengue e diversas encefalites, e outras parasitoses tais como a maioria das filarioses [1;2].

A malária, sendo uma das mais antigas doenças infecciosas conhecidas nas sociedades africanas, continua a causar morbidade e mortalidade elevadas, com a consequente sobrecarga económica nas regiões particularmente mais afetadas. De acordo com o relatório da Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2010 foram notificados cerca de 216 milhões de casos de malária a nível mundial[3]. Mais de 80% dos casos e 91 % das mortes foram registadas no continente africano, tendo um custo anual superior a 12 mil milhões de dólares e causando um elevado atraso no crescimento económico em cerca de 1,3 por cento por ano [4; 5; 6; 7]. Assim, a malária continua a ser um dos maiores problemas de saúde pública, principalmente em regiões tropicais e subtropicais.

A malária não constitui um problema prioritário de Saúde Pública em Cabo Verde mas, dada a vulnerabilidade e a receptividade do país, é necessária uma vigilância epidemiológica permanente, orientada para a prevenção, deteção precoce e contenção de epidemias, tratamento correto dos casos e monitorização da eficácia do tratamento, bem como o controlo e vigilância entomológica [8].

Anopheles arabiensis, única espécie de *Anopheles* vetor de malária presente no arquipélago de Cabo Verde [9; 10], foi descrita como um mosquito antropofílico, de tendência exofágica e exofílica, com uma área de distribuição entre a costa e 500 metros de altitude [11]. As larvas desta espécie encontram-se presentes, ao longo do ano, em tanques e poços agrícolas, levadas, tanques doméstico mal cobertos, poças temporárias e charcos, constituindo os primeiros biótopos larvares permanentes. No entanto, tem como locais de criação as poças nas margens das ribeiras, pegadas de animais e charcos temporários expostos ao sol formados durante a época das chuvas pelo que, durante este período, há tendência para uma proliferação significativa do vetor, que é também facilitada pelo aumento de temperatura.

A dengue é uma doença infecciosa febril aguda causada por um vírus da família Flaviviridae, género *Flavivirus*, que inclui quatro tipos imunológicos DENV-1, DENV-2, DENV-3

e DENV-4, e tem como principais vetores duas espécies de mosquito, nomeadamente, *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) e *Aedes albopictus*, (Skuse, 1894), [12;13].

No arquipélago africano de Cabo Verde, a primeira epidemia de dengue, com 21.000 casos em 2009, demonstrou que o vírus da dengue está-se expandindo em novos territórios [14]. Dado que ainda não existe uma vacina ou tratamento específico eficaz para maior parte das arboviroses e parasitoses, os programas de controlo vetorial constituem uma das principais estratégias de prevenção e combate às doenças como dengue e malária. Tendo surgido resistência aos inseticidas, para todas as classes dos mesmos, incluindo microbianos e reguladores de crescimento [15], os produtos de origem vegetal ressurgem como uma promissora fonte de compostos biologicamente ativos no controlo de vetores de agentes patogénicos.

Os extratos de plantas são fontes de substâncias bioativas potencialmente úteis na luta química contra os insetos, atuando como ovicidas, larvicidas e/ou adulticidas. Desde a Idade Média que os óleos essenciais têm sido amplamente utilizados como bactericidas, fungicidas, anti-virais, anti-parasitários e inseticidas, tendo hoje em dia importância nas indústrias farmacêutica, sanitária, cosmética, agrícola e alimentar [16].

Com este trabalho pretendeu-se: i) estudar a composição química dos extratos de *Sambucus nigra*, L. *Melia azedarach*, L. *Azadirachta indica* A. Juss e óleos essenciais (OE's) de *Mentha pulegium*, L. e *Foeniculum vulgare*, Mill das ilhas de Cabo Verde e de Portugal (Figura 1); ii) Avaliar o efeito inseticida destes produtos em insetos (imaturos e adultos) de *Anopheles arabiensis* e de *Aedes aegypti*, vetores, respetivamente, de malária e dengue em Cabo Verde.

Materiais e métodos

O material vegetal utilizado para todas as fases experimentais foi proveniente de regiões do Norte e Sul de Portugal e do Arquipélago de Cabo Verde (ilhas de Santiago e Santo Antão), sendo todas as amostras recolhidas na mesma fase de desenvolvimento da planta. *S. nigra* foi a única espécie estudada apenas de Portugal por não existir em Cabo Verde. Sob a orientação científica da Doutora Maria Cândida Liberato, Investigadora jubilada do Instituto de Investigação



Fig. 1 - Plantas em estudo

Científica Tropical (IICT), foram identificadas as espécies vegetais e herborizaram-se exemplares representativos, referenciando-se o coletor, número, local e data de colheita, tendo sido depositados no Herbário do IICT em Lisboa, assegurando deste modo a sua conservação, validando os espécimes e a origem geográfica das plantas em estudo.

As folhas de *M. pulegium* (poejo) de Cabo Verde e Portugal e a parte aérea de *F. vulgare* (funcho) de Cabo Verde depois de secas à temperatura ambiente e no escuro, foram submetidas a processos de extração dos óleos essenciais (OEs), por hidrodestilação, utilizando um aparelho de Clevenger modificado. Pelo facto do funcho ter um baixo rendimento optou-se por utilizar o óleo essencial comercial de *F. vulgare* de Portugal, adquirido na Terra Pura, Segredo da Planta. A obtenção dos extratos de folhas de *S. nigra*, *M. azedarach* e *A. indica* foi feita com solventes de diferentes polaridades (hexano, acetato de etilo e etanol). A preparação dos extratos desenvolveu-se em 4 fases: secagem, extração, filtração e evaporação. Todos os trabalhos de secagem, produção de óleos e extratos vegetais decorreram no laboratório de Ecofisiologia e Biotecnologia (URGENP) do INIAV, em Oeiras.

As colónias de *An. arabiensis*, estirpe Dongola (ovos cedidos pela Agência Atómica Europeia), originária do Sudão e de *Ae. aegypti* originária de Cabo Verde, foram implementadas e mantidas ao longo de várias gerações em condições otimizadas de temperatura, humidade relativa e fotoperíodo nos insectários da Unidade de Ensino e Investigação de Parasitologia Médica do IHMT em Lisboa.

Os bioensaios de atividade larvicida foram efetuados de acordo com os testes padronizados da Organização Mundial da Saúde [17; 18; 19].

As condições ambientais durante a fase de criação e bioensaios de sensibilidade foram constantes, de $26 \pm 2^\circ\text{C}$ de temperatura, $80 \pm 10\%$ de humidade relativa e um fotoperíodo de 12 horas de escuro/luz, estando os adultos de *Ae. aegypti* acondicionados em câmara de segurança.

Para a preparação dos ensaios com OE's foi necessária a adição do tensoativo Tween® 20, de modo a obter uma emulsão otimizada do produto em água. Para tal foi previamente testada uma gama de concentrações deste ten-

sioativo de modo a eliminar qualquer efeito tóxico eventual do mesmo sobre as larvas.

Os óleos essenciais cujas propriedades larvicidas foram avaliadas, foram em seguida analisados por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN de ^{13}C), de modo a identificar os seus constituintes maioritários. Os extratos vegetais de acetato de etilo *S. nigra* por terem revelado atividade larvicida, foram analisados por cromatografias de TLC (cromatografia de camada fina) e fracionados por cromatografia de coluna (CC) para posteriormente serem analisados por Cromatografia Líquida de Alta Resolução (HPLC), de modo a caracterizar o perfil químico da planta, dados não apresentados neste artigo.

Os resultados dos bioensaios de determinação do nível de sensibilidade aos extratos, óleos essenciais e seus compostos ativos foram analisados estatisticamente com recurso aos programas Microsoft Excel® 2010 e SPSS® para Windows, versão 21.

Resultados e discussão

Os óleos essenciais de *F. vulgare* e de *M. pulegium* revelaram atividade larvicida, 24h após o início do ensaio. Atingiu-se, aproximadamente, 100% de mortalidade das larvas de *Ae. aegypti* com $52,4 \mu\text{l/l}$ do óleo de funcho (*F. vulgare*) de Portugal comparativamente aos $37,1 \mu\text{l/l}$ do funcho Cabo-Verde (Tabela 1). Este resultado confirmou os efeitos larvicidas do óleo essencial de *F. vulgare* referidos por Chung *et al.*, 2011, que obtiveram efeito tóxico considerável com esta mesma planta nas larvas do 4º estágio de *Ae. aegypti* com CL_{50} de $41,23 \text{ppm}$ e CL_{90} de $65,20 \text{ppm}$ [20].

As diferenças de atividade observadas com os OEs do *F. vulgare* de Portugal e Cabo Verde devem-se, provavelmente, às características edafoclimáticas das duas regiões, o que confirma a teoria de Sukumar *et al* 1991, segundo a qual a origem geográfica das plantas condiciona a bioatividade das mesmas [21].

Os resultados obtidos comprovam ainda efeito larvicida de OE de *M. pulegium* de Portugal (CL_{90} - $189,6 \mu\text{l/l}$) e de Cabo-Verde (CL_{90} - $223,96 \mu\text{l/l}$), sendo o OE desta planta menos ativo comparativamente ao do *F. vulgare*.

A análise por ^{13}C RMN do OE de *M. pulegium* de Portugal (Tabela 2) mostrou que a pulegona1 (Figura 2) é o seu principal composto, seguido de mentona, enquanto no OE de Cabo Verde foram detetados vestígios de pulegona sendo este óleo uma mistura complexa de mentona2, mentol entre outros compostos terpénicos. A pulegona1 foi também o composto maioritário detetado no OE comercial do poejo. Relativamente à constituição do OE de *F. vulgare* de Cabo Verde, o *trans*-anetol3 e o limoneno4 (Figura 2) são os principais constituintes identificados na análise de RMN de ^{13}C (Tabela 3). A análise do OE de fun-

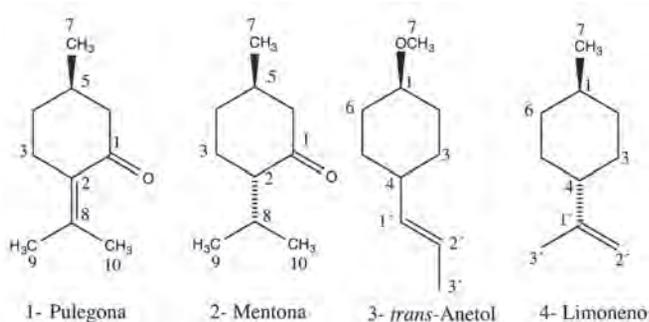


Fig. 2 - Estrutura química dos principais compostos que constituem os OEs da *M. pulegium* e *F. vulgare*.

Tabela 1 - Atividade larvica dos óleos essenciais de *F. vulgare* e *M. pulegium* no 3º estágio das larvas de *Ae. aegypti*, 24 horas após o contato.

Concentração letal	Efeito larvica do óleo essencial			
	Concentração, µL L ⁻¹ , <i>Ae. aegypti</i> (Intervalo de confiança 95%)			
	<i>F. vulgare</i> Cabo Verde (A)	<i>F. vulgare</i> Portugal (B)*	<i>M. pulegium</i> Cabo Verde (C)	<i>M. pulegium</i> Portugal (D)
LC ₅₀	23,3 (22,6-24,0)	28,2 (27,2-29,3)	136,1(132,1-140,0)	97,9 (82,7-113,0)
LC ₉₀	30,1(28,7-32,3)	39,6 (37,5-42,6)	183,4(176,1-192,8)	140,87 (119,85-221,42)
LC ₉₉	37,1 (34,2-41,8)	52,4 (48,0-58,7)	223,9 (219,1-254,4)	189,57 (147,94-421,12)
Equação da reta	11,07*x +(-15,14)	9,38*x+ (-12,5)	9,85*x+(-21,02)	8,00*x+(-14,87)
Coefficiente de correlação	0,999	0,983	0,995	0,931

*óleo comercial

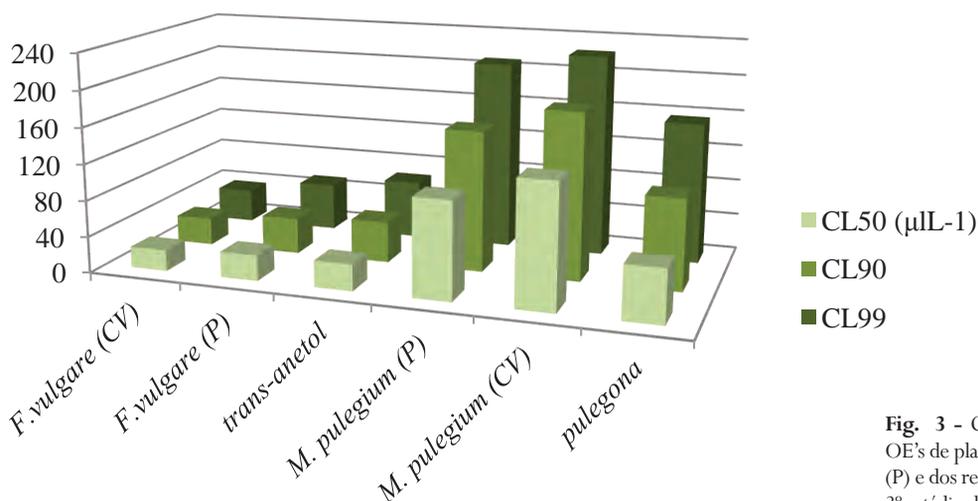


Fig. 3 - Comparação da atividade larvica dos OE's de plantas de Cabo verde (CV) e de Portugal (P) e dos respectivos compostos ativos nas larvas do 3º estágio do *Ae. aegypti*.

Tabela 2 - Identificação dos constituintes maioritários da análise por Ressonância Magnética Nuclear de ¹³C do OE de *M. pulegium* de Portugal (Equipamento de RMN 400 MHz).

Pico	Composto	δ (ppm)	Atribuição
1	Mentona 2	18,62	CH ₃ (C-9)
2	Mentona 2	21,13	CH ₃ (C-7)
3	Pulegona 1	21,70	CH ₃ (C-7)
4	Pulegona 1	22,04	CH ₃ (C-9)
5	Mentona 2	22,22	CH ₃ (C-10)
6	Pulegona 1	22,93	CH ₃ (C-10)
7	Mentona 2	25,82	CH (C-8)
8	Mentona 2	27,81	CH ₂ (C-3)
9	Pulegona 1	28,55	CH ₂ (C-3)
10	Pulegona 1	31,52	CH (C-5)
11	Pulegona 1	32,72	CH ₂ (C-4)
12	Mentona 2	33,84	CH ₂ (C-4)
13	Mentona 2	35,41	CH (C-5)
14	Mentona+ Pulegona 1+2	50,76	CH ₂ (C-6)
15	Mentona 2	55,76	CH (C-2)
16	Pulegona 1	131,60	C=C (C-2)
17	Pulegona 1	141,78	C=C (C-8)
18	Pulegona 1	204,05	C=O (C-1)
19	Mentona 2	212,23	C=O (C-1)

cho comercial de Portugal é uma mistura complexa de fenchona, α-pineno, p-cimeno, estragole entre outros, sendo também os compostos maioritários o *trans-anetol*3 e o limoneno4.

O OE *M. pulegium* de Cabo Verde revelou atividade larvica distinta da *M. pulegium* de Portugal. A análise da constituição destes OEs foi confirmada por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS).

Quanto às meliáceas, *A. indica* e *M. azedarach*, os ensaios preliminares com os seus extratos revelaram atividade larvica apenas para os extratos de n-hexano, mas estes não foram reprodutíveis. Para *S. nigra*, foi registada atividade apenas no extrato em acetato de etilo, tendo sido determinadas as doses letais mínimas que revelam estarmos perante uma população de *Ae. aegypti* sensível (Tabela 4).

Depois de se identificarem os compostos maioritários dos OE's das duas plantas (funcho e poejo), foi avaliada a atividade larvica de compostos maioritários de cada planta. A análise

Tabela 3 - Identificação dos compostos maioritários da análise por RMN de ¹³C do OE do *F. vulgare* (Equipamento de RMN de 400 MHz).

Pico	Composto	δ (ppm)	Atribuição
1	<i>trans</i> -Anetol 3	18,53	CH ₃ (C-3)
2	Limoneno 4	20,94	CH ₃ (C-3')
3	Limoneno 4	23,60	CH ₃ (C-7)
4	Limoneno 4	28,06	CH ₂ (C-5)
5	Limoneno 4	30,73	CH ₂ (C-6)
6	Limoneno 4	30,94	CH ₂ (C-3)
7	Limoneno 4	41,22	CH (C-4)
8	<i>trans</i> -Anetol 3	55,38	CH ₃ (C-7)
9	Limoneno 4	108,49	CH ₂ (C-2')
10	<i>trans</i> -Anetol 3	114,02	CH (C-2 e C-6)
11	Limoneno 4	120,77	CH (C-2)
12	<i>trans</i> -Anetol 3	123,58	CH (C-2')
13	<i>trans</i> -Anetol 3	126,99	CH (C-3 e C-5)
14	<i>trans</i> -Anetol 3	130,47	CH (C-1')
15	<i>trans</i> -Anetol 3	130,95	C=C (C-4)
15	Limoneno 4	150,39	C=C (C-1')
16	<i>trans</i> -Anetol 3	158,69	C=C (C-1)

Tabela 4 - Atividade do extrato em acetato de etilo (EtOAc) de *S. nigra* no 3º estágio das larvas de *Ae. aegypti*, 24 horas após o contacto.

Concentração letal (mgL ⁻¹) (Intervalo de confiança 95%)	Extrato EtOAc de <i>S. nigra</i>
LC ₅₀	304,7 (296,1-312,7)
LC ₉₀	389,9 (373,4-414,5)
LC ₉₉	476,9 (443,2-530,9)
Equação da reta	12,5*X-31,0
Coefficiente de correlação	0,994

Tabela 6 - Atividade larvicida do OE de *F. vulgare* nas larvas do 3º estágio de *An. arabiensis*, 24 após contacto.

Concentração letal (µl L ⁻¹)	OE de <i>F. vulgare</i> Cabo Verde	OE de <i>F. vulgare</i> Portugal
LC ₅₀	27,0	27,0 (24,6-30,4)
LC ₉₀	55,2	36,6 (32,1-50,7)
LC ₉₉	98,9	47,1 (38,4-81,2)
Equação da reta	2,89*x+ (-4,34)	9,54*x+(-13,62)
Coefficiente de correlação	0,975	0,948

N=100 larvas por concentração

Tabela 5 - Resultados da quantificação das doses letais dos OE's de plantas de diferentes origens geográficas em larvas do *Ae. aegypti*.

Conc. letais µl L ⁻¹	<i>F. vulgare</i> Cabo Verde	<i>F. vulgare</i> Portugal	<i>trans</i> -Anetol	<i>M. pulegium</i> Cabo Verde	<i>M. pulegium</i> Portugal	Pulegona
LC ₅₀	23,3	28,0	25,9	136,1	97,9	58,5
LC ₉₀	30,1	39,6	37,8	183,4	140,9	100,4
LC ₉₉	37,1	52,4	51,2	223,9	189,6	155,9

dos resultados da atividade dos OE's sobre as larvas de *Ae. aegypti* (Figura 3) evidencia a existência de efeitos sinérgicos entre vários constituintes ativos. Efetivamente, o efeito larvicida de cada um dos compostos ativos maioritários isoladamente é inferior ao efeito observado para a fração de onde os compostos foram isolados. Assim, a atividade biológica nem sempre se deve a um único composto, como foi verificado com o *trans*-anetol de *F. vulgare*. No entanto, no caso de *M. pulegium* constatou-se que a elevada atividade larvicida da pulegona, um dos seus compostos maioritários, é comparável à atividade do OE bruto [LC₅₀-58,5 µl/l versus LC₅₀-97,9 µl/l (Tabela5)], o que nos leva a inferir que, muito provavelmente, a ação larvicida desta planta pode ser devida apenas à pulegona.

No caso de *Anopheles arabiensis* foi grande a dificuldade no estabelecimento de uma colónia, tendo-se revelado difícil e morosa a produção suficiente de indivíduos para se efetuarem os ensaios previstos. Assim optou-se por fazer bioensaios larvares somente com *F. vulgare*, a planta que, nos ensaios preliminares, revelou maior eficácia. Os resultados deste ensaio indicam que o OE de *F. vulgare* de Portugal é potencialmente mais ativo que o OE do funcho de Cabo Verde. No entanto é necessária a realização de maior número de réplicas (Tabela 6).

Conclusões

Os ensaios larvicidas com três réplicas de 100 larvas por cada concentração revelaram que *F. vulgare* de origem cabo-verdiana apresenta um elevado potencial larvicida, superior ao da planta de origem portuguesa. Por seu turno, *M. pulegium* de Portugal parece ser mais eficaz que os exemplares de Cabo Verde, embora sejam necessárias mais réplicas destes ensaios.

Como já foi referido, as diferenças de atividade obtidas podem estar relacionadas com as características edafoclimáticas, contudo a composição química dos óleos essenciais é determinada por fatores genéticos, porém, outros fatores podem causar alterações significativas na produção dos metabolitos secundários. De facto, os metabolitos secundários representam uma interface química entre as plantas e o ambiente. Os estímulos decorrentes do ambiente, no qual a planta se encontra, podem redirecionar a via metabólica, conduzindo a biossíntese de diferentes compostos. Destes fatores destacam-se: as interações planta/ microrganismos, planta/ insetos e planta/ planta; idade e estágio de desenvolvimento, fatores abióticos como luminosidade, temperatura, pluviosidade, nutrição, época e horário de colheita, bem como técnicas de colheita e pós-colheita. É válido salientar que estes fatores podem apresentar correlações entre si, não atuando isoladamente, podendo exercer influência conjunta no metabolismo secundário. Este estudo permitiu caracterização química a avaliação das atividades de plantas provenientes de regiões geográficas, que ainda não tinham sido estudadas, com resultados bastante promissores.

Bibliografia

1. James, A.A., (1992). Mosquito Molecular Genetic. The hand that feed bite back. *Science*, **257**: 37-38.
2. Gubler, D.G., (1998). Ressurgent Vector Born Diseases as Global Health Problem. *Emerg. Infect. Dis.*, **4**: 442-450.
3. WHO, (2012). World Malaria Report 2012. Acedido em 02 de maio de 2013
in: http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2012/report/en/index.html (acedido a).
4. TDR/WHO, (2002). Training in Tropical Disease. *Malaria Fact Sheet*, Geneva.
5. Roll Back Malaria (RBM/WHO), (2000). RBM Advocacy Guide. Geneve, *World Health Organization*.
6. GHO- Global Health Observatory, (2008). Consultado em Maio de 2013.
In: http://www.who.int/gho/mdg/diseases/malaria/situation_mortality
7. Malaria Foundation International. About Malaria. Consultado em Junho de 2013.
in: http://www.malaria.org/index.php?option=com_content&task=section&id=8&Itemid=32.
8. Ministério da Saúde, (2009). Plano Estratégico de pré-eliminação do paludismo 2009 - 2013, Ministério da Saúde, Direção Geral de Saúde e Programa Nacional de luta contra o Paludismo, Cabo Verde.
9. Alves, J., (1994). *Analyse de situaçao do paludismo em Cabo Verde*. Rapport du PNLN.
10. Alves, J., B. Gomes, R. Rodrigues, J. Silva, A.P. Arez, J. Pinto, and C.A. Sousa, (2010). Mosquito fauna on the Cape Verde Islands (West Africa): an update

Agradecimentos

Fundação Calouste Gulbenkian pelo financiamento.
Doutora Cândida Maria Liberato (Investigadora jubilada do ICT) pelo apoio na identificação das plantas.
Eng. Manuel Delgado da Delegação do Ministério do Desenvolvimento Rural, MDR. Porto Novo, Santo Antão, Cabo Verde, pelo apoio técnico na colheita das plantas.
Sr^a Conceição, Responsável pelo viveiro do Porto Novo (Santo Antão) pela ajuda na colheita das plantas.
Sr. Jorge Rocha pelo apoio na colheita de mosquitos na ilha de Santiago, Cabo Verde.

Justificação de utilização de animais

A utilização dos animais foi necessária para alimentação das colónias de mosquitos, tendo a sua manipulação sido efetuada de acordo com as normas em vigor da Direção Geral da Veterinária e por pessoal devidamente certificado (Diara Kady Monteiro Vieira Lopes Rocha -Curso de Experimentação Animal (FELASA) -Categoria C, realizado em 17/04/2006 - 28/04/2006.

on species distribution and a new finding. *Journal of Vector Ecology*, **35**(2).

11. Cambournac, F.J., Petrarca V., Coluzzi M., (1982). *Anopheles arabiensis* in the Cape Verde archipelago. *Parassitologia*, **24**: 265-267.
12. Gubler, D.J. & Kuno, G., (1997). *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever*. Cab International. USA. 478p.
13. Borges, S.M.A.A., (2001). Importância epidemiológica do *Aedes albopictus* nas Américas. Dissertação de Mestrado. Acedido em Junho de 2010. In: http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/8/86/Martados_anjos2.pdf
14. Franco, L., A. Di Caro, F. Carletti, O. Vapalahti, C. Renaudat, H. Zeller, and A. Tenorio, (2010). Recent expansion of dengue virus serotype 3 in West Africa. *Eurosurveillance*, **15**(7).
15. Brogdon, W.G. & McAllister, J.C., (1998). Synopses "Insecticide resistance and vector control", *Emerg. Inf. Diseases*, **4**: 605-611.
16. Bakkali, F. et al, (2008). Biological effects of essential oils - A review, *Food and Chemical Toxicology* **46** (2), 446-475.
17. World Health Organization (WHO, 1981a). *Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides*. Geneva. 6 p.
18. World Health Organization (WHO, 1981b). *Criteria and Meaning of Tests for Determining the Susceptibility or Resistance of Insects to Insecticides*. Geneva. 4 p.
19. WHO, (1998). Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vectors, bio-efficacy and persistence of insecticides on treated surfaces. WHO, Geneva, Switzerland (28-30 September).
20. Chung I.M., Ro H.M., Moon H.I., (2011). Major essential oils composition and immunotoxicity activity from leaves of *Foeniculum vulgare* against *Aedes aegypti* L. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, **33**(3):450-3.
21. Sukumar, K., Perich M.J., Boobar, L.R., 1991. Botanical Derivatives in Mosquito Control: A Review. *J. Am. Mosq. Contr. Assoc.*, **7**: 210-237.