



Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Campus de Araraquara



Gustavo Chagas Lutfala Paulino

EXTRATOS VEGETAIS DE *Curcuma longa* L. (Zingiberaceae), COMO ESTRATÉGIA
DE OBTENÇÃO DE AGENTES BIOCIDAS PARA O CONTROLE DE *Aedes aegypti*.

Araraquara

2016

Gustavo Chagas Lutfala Paulino

EXTRATOS VEGETAIS DE *Curcuma longa* L. (Zingiberaceae), COMO ESTRATÉGIA
DE OBTENÇÃO DE AGENTES BIOCIDAS PARA O CONTROLE DE *Aedes aegypti*.

Trabalho de Conclusão de Curso para
obtenção de grau do Farmacêutico-Bioquímico
na Faculdade de Ciências Farmacêuticas,
Farmácia-Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Adriano Mondini

Araraquara

2016

Sumário

1. Introdução	9
1.1. Mosquitos como agentes etiológicos de doenças negligenciadas.....	9
1.2. <i>Aedes aegypti</i> : vetor de doenças tropicais	10
1.3.. Prevenção e Controle	13
1.4. Espécie vegetal <i>Curcuma longa</i> L.	14
2. Objetivos.....	17
3. Materiais e Métodos.....	18
3.1. Criação de Mosquitos	18
3.2. Preparo dos extratos.....	18
3.3. Bioensaio Larvicida	20
3.4. Bioensaio Adulticida.....	20
3.5. Preparo das amostras para as análises por CLAE- DAD	21
3.6. Análises por CLAE- DAD no modo analítico	22
4. Resultados e Discussão.....	23
4.1. Análise Química	23
4.2. Análise Biológica.....	30
5. Conclusão.....	34
6. Referências Bibliográficas	35

Resumo

A dengue é uma das doenças tropicais mais importantes do mundo. Os quatro sorotipos (DENV 1-4) são transmitidos por mosquitos do gênero *Aedes*. Possui como principal vetor em áreas urbanas o mosquito *Aedes aegypti*, sendo uma doença de importância em saúde pública. A incidência de dengue tem aumentado drasticamente nas últimas décadas, e sabe-se que bilhões de pessoas em muitas regiões no mundo correm o risco de infecção por dengue. Há uma necessidade na criação de inseticidas biodegradáveis e com pouca absorção ambiental que atue na diminuição de mosquitos vetores do dengue. O objetivo do trabalho foi sintetizar extratos de rizomas de plantas da família Zingiberaceae, especificamente a espécie *Curcuma longa* L., avaliando sua capacidade larvívora e adultívora em larvas e mosquitos de *Aedes aegypti*.

Palavras-chave: Dengue, *Aedes aegypti*, extratos, *Curcuma longa* L., Larvívora

Lista de figuras

- Figura 01. Cromatograma representativo do perfil cromatográfico do extrato aquoso de *C. longa* L.25
- Figura 02. Espectros no UV referentes aos picos do cromatograma 1-7 do extrato aquoso de *C. longa* L.26
- Figura 03. Cromatograma representativo do perfil cromatográfico do extrato hidroalcólico de *C. longa* L.28
- Figura 04. Espectros no UV dos picos do extrato hidroalcólico de *C. longa* L.29

Lista de Tabelas

Tabela 1. Ensaio larvicida extrato aquoso utilizando três concentrações	
.....	30
Tabela 2. Ensaio larvicida extrato hidroalcólico utilizando três concentrações	
.....	30

Lista de abreviaturas e siglas

DENV	Vírus do dengue
<i>Ae. Aegypti</i>	<i>Aedes aegypti</i>
<i>Ae. Albopictus</i>	<i>Aedes albopictus</i>
Tr	Tempo de retenção
<i>C. Longa</i>	<i>Curcuma longa</i> L.
G	Gravidade
UV	Ultravioleta
RPM	Rotações por minuto
CL50	Concentração letal para 50%
CLAE-DAD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência- Detector por arranjo de Diodo
$\lambda_{\text{máx}}$	lambda máximo
PPM	Parte Por Milhão

CL90	Concentração letal para 90%
nm	Nanômetros
p-cimeno	para-cimeno

1. INTRODUÇÃO

1.1. Mosquitos como agentes etiológicos de doenças negligenciadas

Arbovírus é o termo dado para um grupo de vírus que são transmitidas por artrópodes hematófagos. Possuem ciclos que incluem a interação entre animais invertebrados e vertebrados, nos quais ocorre o repasto sanguíneos. Os vertebrados configuram-se como reservatórios e/ou amplificadores, podendo ser dispersores e colaborar com a manutenção de epidemias (KUNO et al., 2005; CIOTA et al., 2010; WEAVER et al., 2010; COFFEY et al., 2013). O ciclo biológico da maioria dos arbovírus acontece de forma horizontal durante o repasto sanguíneo, no qual pode ocorrer a transmissão do vírus ao hospedeiro vertebrado. Alguns vírus podem ser mantidos pela transmissão vertical do artrópode adulto a seus progenitores ou pela transmissão venérea durante a cópula (WEAVER et al., 2010; COFFEY et al., 2013).

Existe uma diversidade de invertebrados hematófagos que podem transmitir os arbovírus. Dentre esses, destacam-se os culicídeos, conhecidos popularmente por mosquitos e, em menor escala, os carrapatos, flebotomíneos entre outros (CIOTA et al., 2010; WEAVER et al., 2010). Os arbovírus normalmente circulam entre animais selvagens, num ciclo enzoótico. No entanto, podem causar epidemias quando são transmitidos a humanos e/ou animais domésticos, que são hospedeiros acidentais, num ciclo conhecido como zoonótico (WEAVER et al., 2010).

A transmissão dos arbovírus é influenciada pela ecologia dos vetores, que por sua vez é delineada pelo seu ancestral comum, pelo ambiente e pelo hospedeiro (FARAJOLLAHI et al., 2011). Os mosquitos são agentes etiológicos de doenças

parasitárias e virais de extrema importância para saúde pública mundial (WATERHOUSE et al., 2014). A febre do dengue é uma das doenças tropicais mais importantes do mundo. Os quatro sorotipos (DENV 1-4) (Gênero *Flavivirus*, família *Flaviridae*) são transmitidos por mosquitos do gênero *Aedes*, sendo que seus vetores mais comuns são o *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*. O aumento da distribuição geográfica de *Ae. aegypti* tem sido a principal causa da disseminação DENV no mundo (GLUBER et al., 2008).

1.2. *Aedes aegypti*: vetor de doenças tropicais

Os arbovírus, que possuem como principal agente etiológico os culicídeos, podem estar dispersos em uma diversidade de ambientes e causar problemas econômicos, ambientais, além de afetar a saúde humana e animal. Podem habitar nichos similares ao seu ambiente natural, assim como podem adaptar-se a diferentes configurações ecológicas (SCHAFFNER; MEDLOCK; VAN BORTE, 2013; NGOAGOUNIL et al., 2015).

Duas espécies de culicídeos são responsáveis pela transmissão de importantes problemas de saúde pública, como os vírus dengue, zika e chikungunya. *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* pertencem ao filo Arthropoda, classe Hexapoda, ordem Diptera, família Culicidae e gênero *Aedes* e diferenciam-se por colonizarem, respectivamente, ambientes urbanos e de transição (FUNASA, 2001; MARQUES; SERPA; BRITO, 2015).

Ae. albopictus é originário das regiões tropicais e temperadas da Ásia e vem dispersando-se nas últimas décadas, com a introdução da espécie em outras regiões das Américas, na Europa e África. Nos anos de 1980, teve uma larga expansão geográfica, e sua presença foi notificada na Albânia em 1979, Texas em 1985, e no Brasil em 1986. É geralmente, um culicídeo zoofílico. No entanto, o aumento da influência antrópica em seus nichos característicos desencadeou a adaptação da espécie às mudanças. Esse culicídeo é

considerado vetor ou potencial vetor de diversos patógenos de importância tanto humana como veterinária, como dengue e chikungunya e estudos de isolamento viral e competência vetorial mostraram que é um eficiente vetor para cerca de 24 arbovírus, incluindo os gêneros *Alphavirus*, *Flavivirus* e *Orthobunyavirus*, sendo os três mais importantes gêneros de arbovírus para a saúde pública (LAMBRECHTS; SCOTT; GUBLER, 2010; WALDOCK et al., 2013; NGOAGOUNIL et al., 2015).

Ae. aegypti é originário de regiões tropicais da África. Através do comércio e tráfico de escravos, atingiu as Américas entre os séculos XV e XIX; chegou à Ásia por volta da metade do século XIX. Atualmente está disseminado por todo território, principalmente nas Américas, Austrália, Ásia e África (POWELL; TABACHNICK, 2013; MARQUES; SERPA; BRITO, 2015).

Presente no território brasileiro desde o século XVII, causou uma importante epidemia de febre amarela no país, o que fez com que medidas de erradicação fossem adotadas. Em 1955, o último foco de *Ae. aegypti* no território brasileiro foi considerado erradicado. Entretanto, houve a reintrodução da espécie no Pará em 1967. Em 1976, foi detectado na Bahia e, no ano seguinte, no Rio de Janeiro. Acredita-se que a reintrodução no estado de São Paulo foi por volta de 1980, instalando-se definitivamente por todo o território (FUNASA, 2001; MARQUES; SERPA; BRITO, 2015).

O *Ae. aegypti* é o principal agente responsável por epidemias de dengue nas Américas, Sudeste Asiático e parte ocidental do Pacífico, sendo a transmissão do dengue endêmica em mais de 100 países. Quando essa espécie se espalhou pelo sul da Europa, foi responsável por epidemias de dengue e febre amarela. Possui uma capacidade de transmitir outros arbovírus nos locais em que ocorre sua infestação (SCHAFFNER; MEDLOCK; VAN BORTE, 2013).

O *Ae. aegypti* é bem adaptado ao ambiente urbano e é um vetor altamente competitivo devido a sua natureza antropofílica, vivendo em proximidade com os humanos. O *Ae. albopictus*, no entanto, é adaptado a regiões peridomésticas e com vegetação e, ocasionalmente é encontrado em locais com maior urbanização. Isto ocorre devido a sua alta plasticidade ecológica e adaptabilidade a diferentes ambientes (LAMBRECHTS; SCOTT, GUBLER, 2010).

A principal forma de transmissão dos arbovírus para os humanos ocorre através do repasto sanguíneo. As fêmeas infectadas, ou mesmo quando não infectadas, realizam o repasto sanguíneo em um hospedeiro infectado, depois de um período extrínseco de incubação de 4-10 dias, possuindo infectividade até o fim da vida (FREDERICKS; FERNANDEZ-SESMA, 2014). O vírus se dissemina em curto período de tempo, já que as fêmeas possuem um ciclo gonotrófico rápido, gerando descendentes capazes de transmitir o vírus. Normalmente, não voam longas distâncias e a dispersão do vírus se dá mais pela movimentação de pessoas infectadas entre casas e comunidades do que pela dispersão de um vetor infectado (FREDERICKS; FERNANDEZ-SESMA, 2014).

Após a ingestão do sangue contendo o vírus, ocorre infecção das células epiteliais que revestem o intestino médio do culicídeo. Ao ultrapassar a barreira epitelial do intestino médio, dissemina-se em outros tecidos, principalmente as glândulas salivares. A saliva é meio de transmissão dos vírus durante os repastos sanguíneos. O trato genital também pode ser infectado e o vírus pode ser transmitido aos ovos já desenvolvidos durante a oviposição. Trata-se da transmissão vertical (KUNO; CHANG, 2005; CARRINGTON; SIMMONS, 2014).

Após realizarem o repasto sanguíneo, as fêmeas procuram locais que sirvam como potenciais criadouros e realizam a oviposição. Os sítios de oviposição devem apresentar,

obrigatoriamente, água para o desenvolvimento dos estádios larvários (BACK; LUNDKVIST, 2013). A adaptação dessa espécie de vetor claramente indica a ampla gama de locais onde colocam seus ovos (SIVAGNANAME; GUNASEKARAN, 2012).

Os culicídeos desenvolvem-se por metamorfose completa e seu ciclo de vida está compreendido em quatro fases: ovo, larva, pupa, que são aquáticos, e a forma adulta terrestre. Ciclos de desenvolvimento podem ter duração de aproximadamente 10 dias. Após a eclosão dos ovos, as larvas surgem. Essas possuem quatro estádios larvais e a passagem de um estágio a outro ocorre o processo de muda, havendo desprendimento do exoesqueleto. Passam a maior parte do tempo se alimentando, principalmente de matéria orgânica presente na água, mas não toleram altas concentrações das mesmas. A duração da fase larvária é de cerca de cinco dias e, então, ocorre a formação da pupa. Nessa fase, ocorre a metamorfose do estágio pupal para o adulto, que leva cerca de dois a três dias para atingir o desenvolvimento completo do adulto (FUNASA, 2001; MARQUES; SERPA; BRITO, 2015).

Condições climáticas desempenham um papel fundamental na biologia e ecologia dos vetores e nos vírus que transmitem. Como muitos invertebrados, são diretamente afetados pelas mudanças climáticas, as temperaturas têm influencia no desenvolvimento de estádios imaturos e atividade dos adultos. Uma vez que estádios imaturos do vetor necessitam de água para sobreviver, as precipitações regulares são muito importantes para possibilitarem locais para reprodução, enquanto que a umidade relativa afeta perda de água e sobrevivência do adulto e pode interferir na dinâmica populacional do vetor (THAI; ANDERS, 2011; WALDOCK et al., 2013).

1.3. Prevenção e controle

Prevenção e controle de doenças causadas por arbovírus envolvem desenvolvimento e implementação de planos que incluem sistemas de alerta precoce, vigilâncias epidemiológica, entomológica e ambiental, apoio laboratorial, manejo de casos clínicos, controle de vetores, controles ambientais, comunicações dos riscos e mobilização social (WHO, 2009).

Doenças causadas por arbovírus quando mantidas no ciclo de transmissão humano-culicídeo são caracterizadas por diversos surtos capazes de sobrecarregar a capacidade da saúde pública no controle de surtos e suporte de pacientes. Quando não há vacinas disponíveis e medicamentos eficientes, a prevenção e controle são dependentes de métodos de controle de vetores. Esses incluem métodos e estratégias de controle biológicas e químicas, focadas na redução de infestação de vetores de modo a diminuir níveis de transmissão (EISEN; LOZANO-FUENTES, 2009; SIVAGNANAME; GUNASEKARAN, 2012; MURRAY; QUAM; WILDER-SMITH, 2013).

Não há medidas de controle específicas direcionadas aos humanos, embora uma vacina tenha sido recentemente liberada para utilização (Organização Mundial de Saúde, 2016). A notificação dos casos suspeitos, investigação do local provável de infecção e busca ativa de casos são elementos essenciais, mas o vetor continua sendo o maior problema na cadeia epidemiológica. Sendo assim, o controle ainda está centrado na redução da densidade vetorial (MINISTERIO DA SAUDE, 2009a).

1.4. Espécie vegetal *Curcuma longa* L.

A espécie *Curcuma longa* L., popularmente conhecida como açafrão da terra, pertencente à família Zingiberaceae é um condimento extensivamente utilizado na Índia e em outros países asiáticos. A espécie é também conhecida como tumérico, que é um

rizoma possuindo amplo espectro de atividades biológicas (REVATHY et al., 2011). É um alimento amplamente consumido da mesma família do gengibre (*Zingiberofficinale*) (MOHIUDDIN et al., 2010). O estudo dessa planta demonstrou sua capacidade pesticida e repelente contra diversos insetos (DAMALAS; ELEFTHEROHORINOS, 2011).

A classe química conhecida como curcuminóide é extensivamente descrita na literatura possuindo diversos metabólitos secundários e que apresentam diferentes propriedades físico-químicas (REVATHY et al., 2011). A coloração amarelada do açafrão é devida, principalmente, à presença de pigmento curcuminóide, sendo um composto natural bioativo (AKRAM et al., 2010; VERMA et al., 2012).

No trabalho realizado por Verma e colaboradores (2012) foi comparado o poder extrativo de solventes com diferentes polaridades e foi averiguado que os extratos acetônico e acetato etílico apresentaram quantidade superior de curcuminóides. O mesmo foi detectado no extrato hidroalcólico, que apresentou rendimento consideravelmente superior aos demais solventes estudados (VERMA et al., 2012).

Entre as classes de metabólitos majoritários isolados e relatados na literatura do açafrão-da-Índia estão os sesquiterpenos e os pigmentos fenólicos curcuminóides. No trabalho descrito por Jiang e colaboradores (2015), foram isolados onze flavonóis glicosilados e também um glicosídeo de diidroisoflavanol.

Os curcuminóides de *Curcuma longa* L. são constituídos principalmente pela curcumina (60-80%), desmetoxicurcumina (15-30%) e o bisdesmetoxicurcumina (2-6%) (RAO; SAKARIAH, 2005). Entre as atividades biológicas de interesse, podemos citar atividades anti-inflamatória e anticarcinogênica (AKRAM et al., 2010). Além disso possui também atividade antiradicalar, capaz de inibir a peroxidação lipídica e,

consequentemente, atuar na proteção celular das macromoléculas celulares, evitando danos oxidativos ao DNA (BIANCHI et al., 1999).

O controle de culicídeos é feito principalmente pelo uso de inseticidas biológicos e sintéticos. Porém, o uso exacerbado dessas substâncias têm gerado uma série de consequências negativas, dentre elas a resistência aos inseticidas (CHANDRE et al., 1999). Dessa forma, a busca por alternativas eficientes para controle de vetores é imprescindível. A busca por compostos ecológicos sustentáveis, produtos naturais e metabolitos de origem vegetal que sejam eficientes e gerem resistência mínima, constituem pontos importantes para o desenvolvimento de alternativas para o controle de vetores (AGGARWAL et al., 2007).

2-OBJETIVOS

- Avaliar a capacidade larvícida e adultícida de extratos polares de *C. longa* em *Aedes aegypti*, além de analisar os compostos presentes nos extratos vegetais.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Criação dos mosquitos

Os ovos utilizados nos ensaios biológicos foram fornecidos pelo Laboratório de Parasitologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (FCFAR/UNESP). Os testes eram realizados com larvas de quarto estágio e mosquitos adultos (5 a 6 dias) livres de infecção. Os ovos foram colocados em uma bandeja de plástico branca de tamanho 46 cm de comprimento por 30 cm de largura que comporta um volume de cinco litros. Foi adicionada ao recipiente 2,5 litros de água deionizada para que os ovos eclodissem. Após eclosão, as larvas eram transferidas para um segundo recipiente de plástico transparente de tamanho 20 cm por 10 cm de largura que comporta 3 litros de água. Em cada recipiente foi adicionado 500ml de água deionizada para que as larvas pudessem se desenvolver. As larvas foram alimentadas com ração para peixe em flocos. Para facilitar o seu uso, a ração foi triturada manualmente até atingir a consistência de um pó. Posteriormente, ao se tornarem adultos, os mosquitos eram transferidos para gaiolas. Os mosquitos foram alimentados com mel diluído, produzida a partir da diluição em água deionizada (15:50). A umidade relativa do ar foi mantida entre 65-85% e a temperatura em torno $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, com fotoperíodo de 12:12 (claro/escuro) (KOVENDAN et al., 2013).

3.2. Preparo dos extratos

O preparo dos extratos estudados foi adaptada da metodologia de Garcez e colaboradores (2013) a partir de amostras comerciais certificadas de *Curcuma longa* L. (Kampo de Ervas).

3.2.1. Extrato aquoso

Foram utilizados 200 gramas do pó seco macerado para 5 litros de água. Primeiramente, solubilizou-se o pó em 2,5 litros de água a uma temperatura de 60 °C sob agitação magnética, em vidro âmbar por três horas. Filtrou-se a solução e reservou-se o eluído. Foram adicionados 2,5 litros de água ao resíduo da *Curcuma longa* L., que permaneceu por mais três horas sob as mesmas condições anteriores. A solução foi posteriormente filtrada. O eluído total foi centrifugado a 5000 g por cinco minutos a 25°C para eliminar quaisquer resquícios da parte sólida. Posteriormente, foi realizada uma filtração a vácuo em funil de Buchner. O filtrado foi liofilizado para obtenção de um extrato cristalizado que posteriormente foi utilizado nos ensaios biológicos. Todas essas etapas foram feitas em ambientes com luminosidade controlada e em frascos reflexivos, já que se trata de um extrato fotossensível.

3.2.2.Extrato hidroalcólico

O extrato hidroalcólico foi obtido a partir da diluição do álcool etílico absoluto PA (Synth) para 70% e a maceração do pó comercial. Foram utilizados 200 gramas de pó comercial para um volume de cinco litros de etanol 70%. Primeiramente, solubilizou-se o pó em 2,5 litros de etanol a uma temperatura de 60°C sob agitação magnética em um frasco âmbar. Filtrou-se a solução e reservou-se o eluído. Foram adicionados os 2,5 litros de etanol 70% ao resíduo da *Curcuma longa* L. do filtrado, que permaneceu por mais três horas sob as condições anteriores. A solução foi posteriormente filtrada. O eluído total foi centrifugado a 5000 g por cinco minutos a 25°C para eliminar quaisquer resquícios da parte sólida. O eluído foi levado ao rota-evaporador para completa eliminação do etanol a 45°C 120 RPM para não alterar o produto final do extrato. Após a evaporação do solvente em

evaporador rotativo a porção aquosa obtida foi submetida à liofilização. Todas essas etapas foram feitas em ambientes com luminosidade controlada e frascos reflexivos.

3.3. Bioensaio Larvicida

Métodos padrão para testar a toxicidade dos extratos e a suscetibilidade de larvas de mosquitos a inseticidas foram realizados de acordo com a Organização Mundial da Saúde–OMS (WHO, 2005). Os ensaios biológicos larvicidas foram realizados em temperatura ambiente de $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa do ar entre 65-85%, e ainda sob um fotoperíodo de 12:12 (claro/escuro) .

Aleatoriamente, vinte quatro (24) larvas do quarto estágio foram colocadas em recipientes contendo 200ml de água duplamente destilada. As diluições do extrato utilizadas nos ensaios foram feitas nos recipientes onde as larvas foram expostas. Para tanto, os liofilizados foram pesados e diluídos em 25ml de água deionizada. Controles sem os extratos foram realizadas para aferir a mortalidade. Após o preparo da solução contendo o extrato, seis larvas foram transferidas para cada um dos recipientes, onde continhamos três concentrações do extrato e um recipiente controle onde continha apenas água deionizada. Para determinar a toxicidade em larvas do 4º estágio de *Aedes aegypti*, a taxa de mortalidade das mesmas foram observadas após a sua exposição por um período de 24 horas. A porcentagem de mortalidade foi calculada a partir de uma média de quadruplicatas que foram realizadas simultaneamente (WHO, 2005). A concentração letal que ocasiona 50% de mortes (CL50) também foi avaliada.

3.4. Bioensaio Adulticida

Os mosquitos utilizados para o bioensaio adúltica tinham entre 5 e 6 dias de idade, e foram selecionados aleatoriamente. Não houve preferência entre fêmeas ou machos. Para esse ensaio cada um dos tubos de testes continham seis mosquitos.

Os extratos aquoso e hidroalcoólico de *Curcuma longa* L. foram diluídos em água e testados em variadas concentrações. Após realizadas as diluições, os extratos foram impregnados em papéis filtro (14 mm x 12 mm) antes dos testes. Tiras de papel filtro embebidos apenas com etanol foram utilizados como controles. Os bioensaios foram realizados utilizando tubos de plástico de (125 mm x 44 mm) e os papéis impregnados foram laminados e colocados no fundo dos tubos para exposição e fechados com telas que permitiam trocas gasosas. A concentração letal que ocasiona 50% de mortes (CL50) foi avaliada, após vinte e quatro horas de exposição.

A umidade relativa do ar foi mantida entre 65-85 % e a temperatura em torno 27 °C $\pm$ 2 °C, com fotoperíodo de 12:12 (claro/escuro) (KOVENDAN et al., 2013).

3.5 Preparo das amostras para as análises por CLAE- DAD

Os extratos estudados de *C. Longa* injetados no cromatógrafo foram previamente submetidos ao *clean-up* em cartucho de extração em fase sólida de 1000 mg/6 mL (55 μ m, Strata-X, Phenomenex[®]) preenchidos com sílica de fase reversa C18, (1 mg da amostra para 10 mg de fase estacionária sílica C18). Os cartuchos foram primeiramente ativados com MeOH (100%, 2,0 mL, 3 vezes), 25 mg de cada um dos extratos foi solubilizado em 2,0 mL de MeOH a 100%. Os extratos foram aplicados no cartucho de SPE e eluídos com a mesma fase móvel utilizada nas etapas de ativação do cartucho e solubilização da amostra. O eluato foi solubilizado na concentração de 10 mg/mL (MeOH:H₂O, 7:3, v/v) e,

por fim, filtrado em membrana de PTFE de 0,22 µm (Millex[®], Merck Millipore), coletado em vial de 1,5 mL e analisado por CLAE- DAD.

3.6 Análises por CLAE- DAD no modo analítico

Para registrar os cromatogramas dos extratos de *C. longa*, utilizou-se cromatógrafo líquido de alta eficiência (analítico, gradiente quaternário) modelo PU-2089 (Jasco[®]), acoplado a detector de arranjo de fotodiodos (CLAE-DAD) com faixa de varredura de 195-650 nm e intervalo mínimo de 1 nm, modelo MD-2010 (Jasco[®]). Para a aquisição e processamento dos dados cromatográficos foi utilizado o software ChromNav (Jasco[®]). As análises foram realizadas utilizando uma coluna de fase reversa RP18, modelo Hypersil gold (Thermo[®]) de 250 x 4,6 mm d.i., apresentando partículas com tamanho médio de 5 µm protegidas com uma coluna de guarda (Phenomenex[®]) de 4 x 3 mm d.i. As substâncias foram injetadas por de um injetor Rheodyne[®] 7125 com um loop de 100 µL, volume de injeção de 20 µL.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análise química

A análise do perfil cromatográfico de cada extrato e dos espectros de violeta dos picos mais significativos presentes nos cromatogramas registrados em 250, 300 e 350nm, evidenciou a presença majoritária de compostos fenólicos: ácidos fenólicos, flavonóides e curcuminóides. Sendo que estas três classes de metabólitos químicos foram relatados nos estudos químicos do extrato metanólico de *C. longa* L. de (ABDEL-LATEEF et al., 2016) como as três classes de metabólitos secundários foram encontradas em maiores quantidades no extrato metanólico dessa espécie vegetal. Além disso, apresenta-se uma quantidade moderada de taninos, alcalóides, saponinas e esteróides.

Considerando a natureza de média a alta polaridade das substâncias presentes nos extratos preparados de *C. longa* L, os extratos, foram submetidos a análises por CLAE-DAD. Os perfis cromatográficos dos extratos foram comparados possibilitando verificar a semelhança e a variabilidade dos metabólitos presentes no extrato aquoso e hidroalcolico.

A figura 01 apresenta o cromatograma obtido por CLAE-DAD apresentando o perfil do extrato aquoso do rizoma de *C. longa* L. e o perfil de alguns espectros de absorção na região do UV, evidenciando a presença de ácidos fenólicos e flavonóides.

Os flavonóides são uma classe de substâncias comuns na espécie em estudo, sendo que vários flavonóides já foram isoladas e identificadas das espécies do gênero *Curcuma*. A natureza do flavonóide e seu padrão de oxigenação podem ser definidos pela posição e intensidades relativas dos máximos de absorção. O espectro no UV de um flavonóide possui dois máximos de absorção: a banda II, que se encontra em um intervalo de comprimento de onda de 240-285 nm e a banda I entre 300-550 nm. Percebe-se, portanto, que no perfil dos espectros no UV do extrato aquoso do rizoma de *C. longa* L., a presença evidente de

flavonóides (Pico 1, Tr = 23,78 min; Pico 2, Tr = 24,84 min). Os picos 3-7 presentes nos cromatogramas apresentaram espectro na região do UV característicos de derivados de compostos fenólico, com bandas de máximos de absorção em 215 e 240 nm (Figura 2). Sendo portanto, bastante evidente nos extratos de *C. longa* L.

Figura 01. Cromatogramas representativos do perfil cromatográfico do extrato aquoso de *C. longa* [Solvente A. H₂O + 0,1% TFA (ácido trifluoroacético); Solvente B. MeOH + 0,1 % TFA. Gradiente de 5-100 % de B em 60 min; vazão de 1,00 mL.min⁻¹; A) $\lambda_{\text{máx}}$ = 250 nm; B) $\lambda_{\text{máx}}$ = 300 nm; C) $\lambda_{\text{máx}}$ = 350 nm

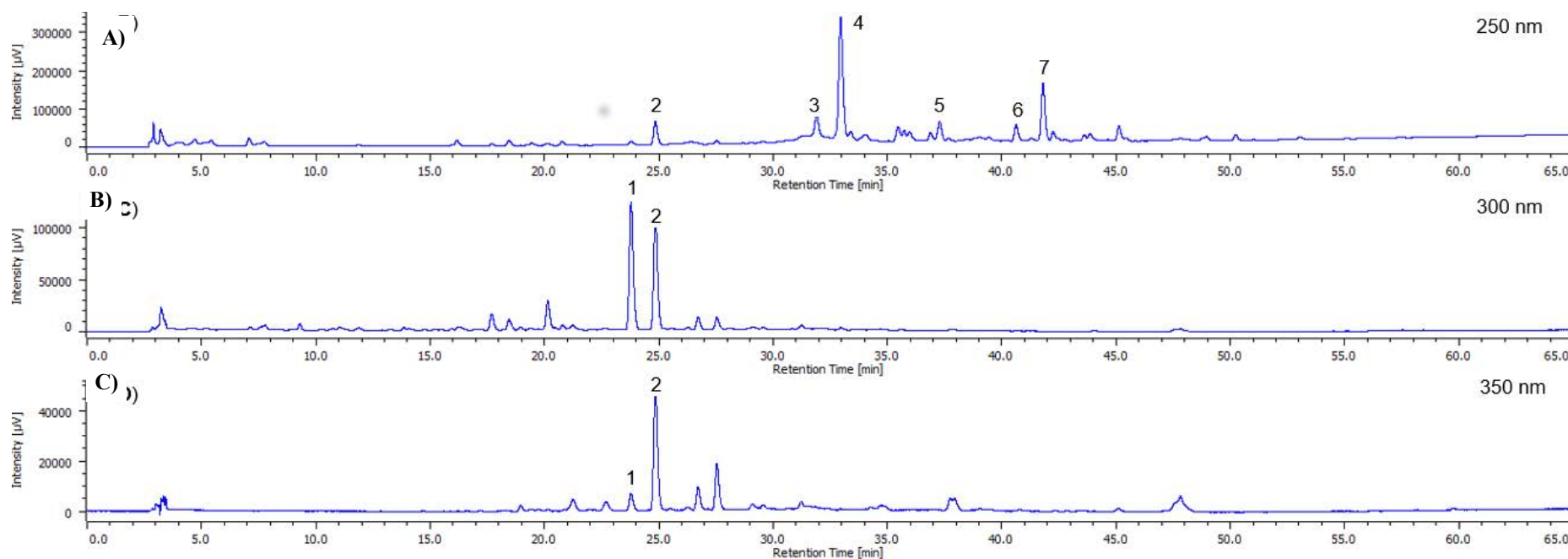
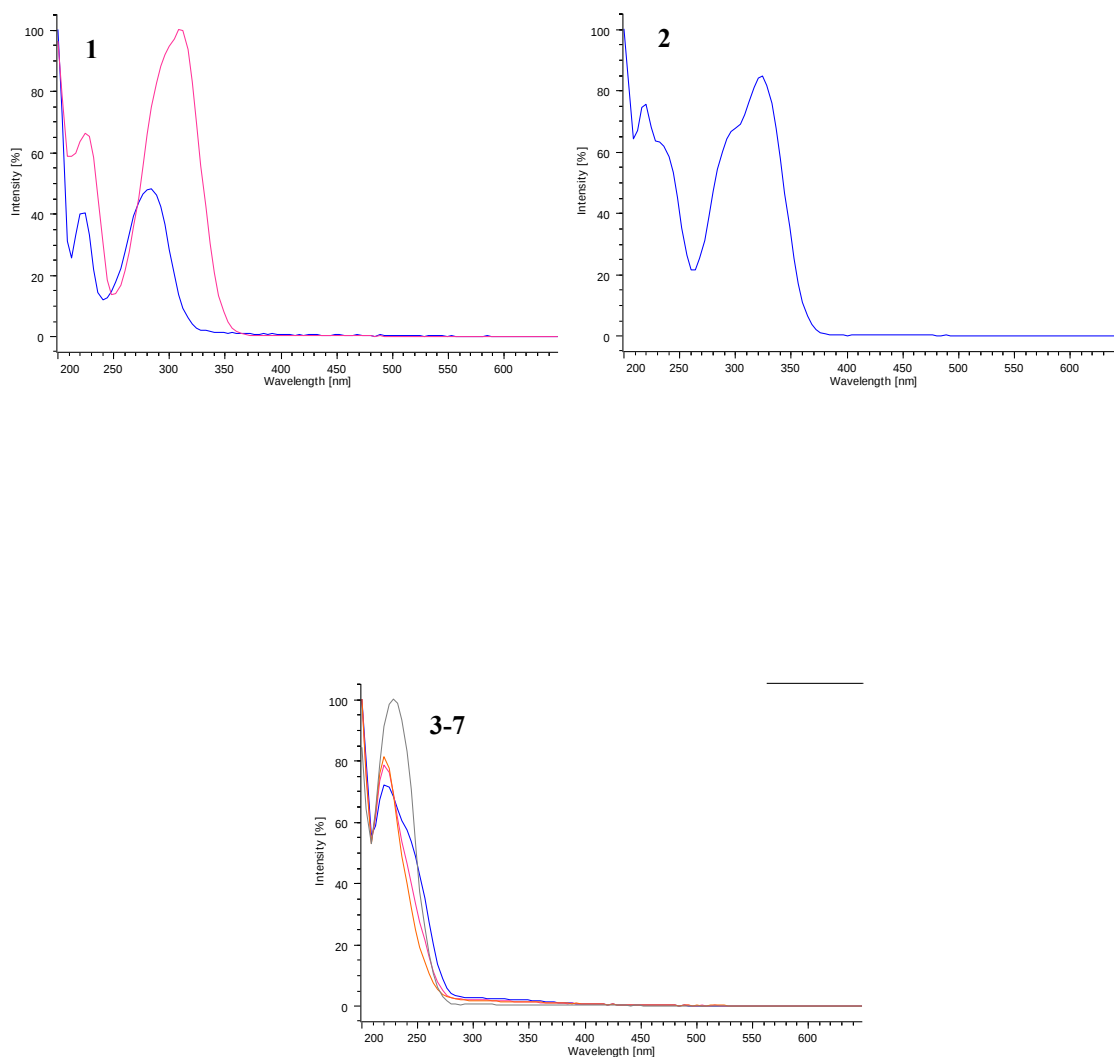


Figura 02. Espectros no UV referentes aos picos do cromatograma 1-7 do extrato aquoso de *C. longa* L.



Os principais compostos voláteis presentes no óleo essencial de *C. longa* L. são α -zingibereno (28-39%), α -turmerona (20-32%), β -sesquifelandreno (13-18%), β -tumerona (3,7-7,5%), α -turmerona (3-6%) e o β -bisaboleno (2,5-3,6%) (AUYSAWASDI; CHUNTRANULUCK; PHASOMKUSOLSIL, 2015).

O cromatograma (Figura 3) é representativo do extrato hidroalcoólico, onde podemos observar os picos de 1-7 sendo similares aos picos presentes no cromatograma do extrato aquoso. Após a análise, pode-se afirmar que possuem as mesmas características dos espectros referentes ao primeiro extrato, contendo portanto as mesmas características das classes de substâncias presentes. O extrato apresentou três picos distintos quando comparado ao aquoso, que na figura 3 estão representados dos picos 8 ao 10, sendo classes de substâncias diferentes na análise do extrato hidroalcoólico. Os picos 9 e 10 representam uma mesma classe de substâncias, que apresentam tempos de retenção de 17,340 e 23,297 minutos após a análise dos espectros de ambos.

O espectro de UV do pico 8 do cromatograma ($Tr = 47,225\text{min}$) apresenta $\lambda_{\text{máx}}$ semelhante à classe dos curcuminóides, pois apresenta um máximo de absorção muito semelhante ao relatado. Na literatura, tem sido descrito exhaustivamente que dentre os compostos isolados de *Curcuma* spp., os compostos por fenóis são os mais representativos, e que a principal classe dessa espécie é dos curcuminóides (VERMA, 2016). O espectro de UV (Figura 4) representativo dos curcuminóides possuem uma banda no espectro de UV em $\lambda_{\text{máx}}$ 420 nm (EREZ et al., 2014). Outros metabólitos secundários isolados da espécie vegetal em estudo minoritários são os terpenos conjugados com curcuminóides (QIAO et al., 2015).

Figura 03 - Cromatogramas representativos do perfil cromatográfico do extrato hidroalcolico de *C. longa* [Solvente A. H₂O + 0,1% TFA (ácido trifluoroacético); Solvente B. MeOH + 0,01 % TFA. Gradiente de 5-100 % de B em 60 min; vazão de 1,00 mL min⁻¹; A) $\lambda_{\text{máx}}$ = 250 nm; B) $\lambda_{\text{máx}}$ = 300 nm; C) $\lambda_{\text{máx}}$ = 350 nm

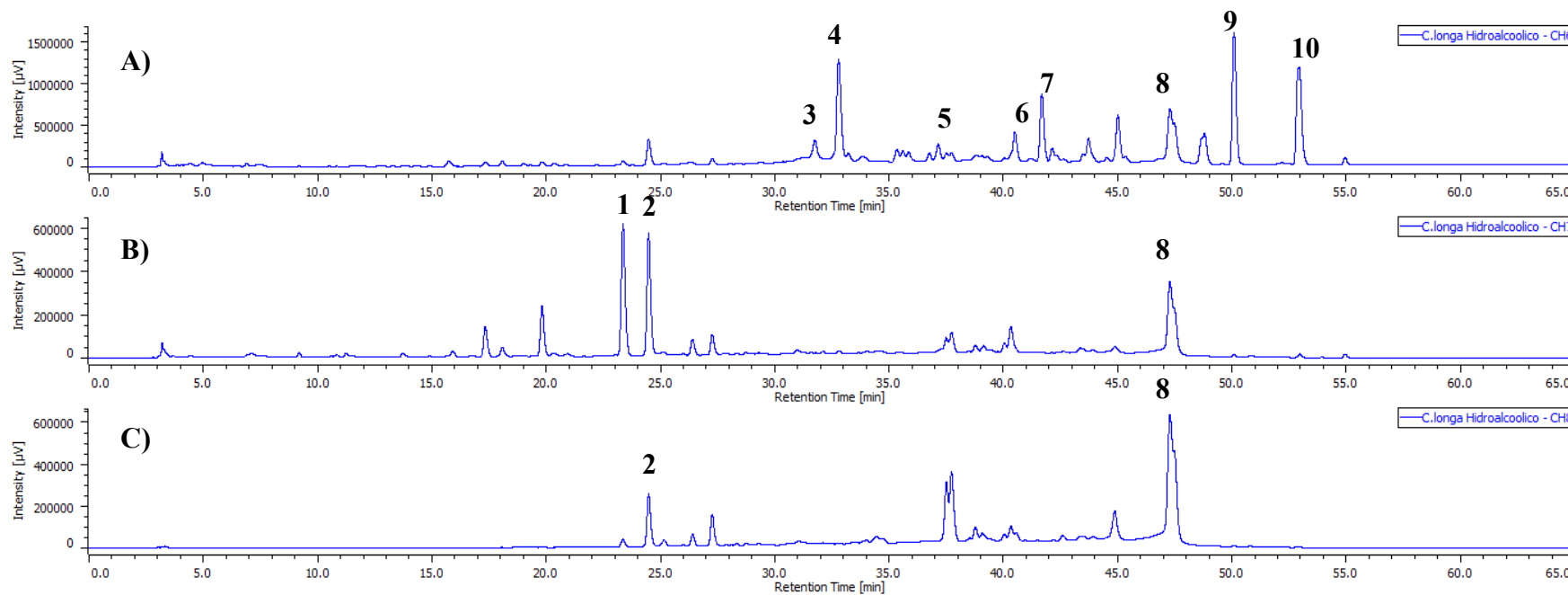
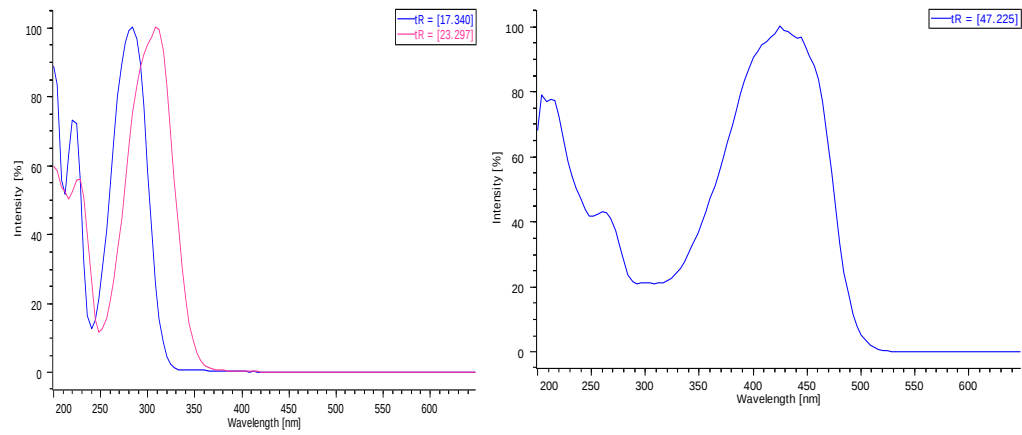


Figura 04 - Espectros no UV dos picos do extrato hidroalcólico de *C. longa* L.



A) $\lambda_{\text{max}} = 250 \text{ nm}$ e 420 nm

4.2. Análise biológica

A exposição das larvas de quarto estágio de *Aedes aegypti* a óleos essenciais de *C. longa* L. levaram ao aumento da mortalidade em comparação aos controles sem os extratos. A mortalidade larval mostrou ser diretamente dependente da concentração utilizada dos extratos. Os valores da CL50 da ação dos óleos essenciais de *C. longa* para ambos os extratos nos bioensaios larvicidas após vinte e quatro horas de exposição ao mesmo são demonstrados nas tabelas 1 e 2. Com o aumento das concentrações dos extratos, a taxa de mortalidade das larvas de quarto estágio aumenta.

Tabela 1. Ensaio larvicida extrato aquoso utilizando três concentrações médias, em

	Controle	[8 ppm]	[28 ppm]	[33 ppm]
Mortes	0/6	0/6	1/6	3/6
Percentual	100%	100%	16,66%	50%

quadruplicatas em larvas de *Aedes aegypti*.

Tabela 2. Ensaio larvicida extrato hidroalcolólico utilizando três concentrações médias, em quadruplicatas em larvas de *Aedes aegypti*.

	Controle	[9 ppm]	[30 ppm]	[35ppm]
Mortes	0/6	0/6	1/6	3/6
Percentual	100%	100%	16,66%	50%

A análise dos bioensaios para ambos os extratos mostraram que o extrato aquoso possui um potencial larvicida semelhante quando comparado ao hidroalcoólico. A concentração para se chegar a uma CL50 para o extrato aquoso foi ligeiramente menor quando comparada a concentração alcançada para se chegar ao mesmo resultado do extrato hidroalcoólico. Para chegar a CL50 a concentração utilizada do extrato aquoso foi de 33 ppm enquanto do extrato hidroalcoólico foi de 35 ppm.

Os extratos obtidos a partir *C. longa* L. demonstraram-se agentes larvicidas potencialmente eficazes contra *A. aegypti*, demonstrando toxicidade elevada em relação as larvas de quarto de estágio. Houve inibição do desenvolvimento pupal. Os mecanismos envolvidos no fenômeno não estão claros, mas podem estar relacionados a efeitos antiproliferativos (Zhou et al 2011).

Os extratos de plantas quando comparados a compostos purificados possuem preços bem menores e são também altamente eficazes para o controle de mosquitos (JANG et al., 2002). Os extratos vegetais podem ser uma fonte alternativa para o controle de larvas de mosquitos que são agentes etiológicos de doenças. Pois constituem uma fonte de quantidade de compostos bioativos que são degradados em compostos não tóxicos e de importância para programas de controle (KALAIVANI; SENTHIL-NATHAN, 2012).

O óleo essencial extraído do rizoma de *C. longa* demonstrou elevada toxicidade em relação as larvas de quarto estágio de *Ae. aegypti* no presente estudo, sendo as toxicidades dependentes das concentrações utilizadas. Esse fato também foi comprovado por Ajaiyeoba e colaboradores (2008) sendo o óleo essencial extraído do rizoma de *C. longa* um potencial agente larvicida quando testado contra larvas de *Anopheles gambiae*.

A maneira como os óleos essenciais de extratos vegetais agem sobre as larvas de mosquitos foi estudada (CORBET et al.,1995). Há suscetibilidade do sistema traqueal das

larvas e pupas dos mosquitos ao compostos e os óleos essenciais podem levar a um bloqueio traqueal, além de toxicidade química.

Foi relatada (ZHU et al., 2001) mortalidade entre 98-100% de larvas do quarto estágio tanto de *Ae. aegypti* como *Ae. albopictus* utilizando uma concentração de 200 ppm após vinte e quatro horas de exposição a derivados de *C. longa* L. (Komalamisra et al.,2005) relataram uma CL50 de 106,40 ppm de um extrato hidroalcolico de *C. longa* em relação as larvas de quarto estágio de *Ae. aegypti*.

Sendo a curcumina o composto majoritário da *C. longa*, ela pode apresentar isoladamente uma atividade larvicida em relação a larvas de *Ae. Aegypti*. A CL90 em concentração de 61,6 ppm foi relatada anteriormente (SAGNOU et al.,2012). Os óleos essenciais extraídos do rizoma de *C. longa* são formados por tumeronas (40,8%), mirceno (12,6%), 1,8-cineole (7,7%)e p-cimeno (3,8%). A combinação entre alfa tumerona e beta tumerona é provavelmente responsável pela toxicidade observada nos óleos essenciais nos ensaios larvicidas (AJAIYEGBA et al., 2008). Os resultados obtidos nos experimentos realizados em Araraquara corroboram e demonstram a importância e o potencial do produto natural como agente de controle de vetores.

C. longa possui uma vasta utilização em diversos tipos de alimentos, não possuindo toxicidade em relação aos mamíferos, o que a torna um produto seguro quando utilizada como bioinseticidas (WANG; KHAN, 2015).

Entretanto, após a realização do bioensaio adulticida, observou-se que tanto o extrato aquoso como o hidroalcolico de *C. longa* não apresentaram atividade biocida nos mosquitos adultos (5-6 dias de vida) de *Ae. aegypti*. Assim como no ensaio larvicida, foram testadas diferentes concentrações dos extratos e não houve atividade relevante. As concentrações 515 ppm, 580 ppm e 730 ppm, não apresentaram resultado expressivo. Tal observação pode estar relacionada ao fato de que a forma adulta já esteja com seus sistemas completamente

formados e os compostos não agiriam sobre o sistema traqueal dos adultos, como ocorre com larvas e pupas (CORBET et al., 1995). Além disso, a baixa biodisponibilidade do composto majoritário (Gao et al 2011) no sistema aéreo pode comprometer sua ação biocida.

Os óleos essenciais vegetais, como os obtidos a partir de *C. longa*, são derivados naturais com poderosa atividade biocida contra uma vasta gama de organismos, tais como bactérias, fungos, protozoários, insetos e vírus. Eles são caracterizados pela baixíssima toxicidade para animais homeotérmicos, alta volatilidade e alta toxicidade para insetos e pragas. Ultimamente, eles vem recebendo uma atenção especial, pois possuem compostos bioativos potencialmente úteis contra uma variedade de pragas (MANSOUR; ALY, 2015).

Respostas comportamentais dos culicídeos a produtos químicos fornecem subsídios para o delineamento de estratégias experimentais de avaliação de compostos. Entretanto, apesar das várias tentativas para testar atividades de produtos químicos contra vetores, nenhum sistema de teste único foi totalmente aceito (TISGRATOG et al., 2016).

A avaliação de novos compostos de origem vegetal visa reduzir a aplicação de inseticidas sintéticos e buscar compostos sustentáveis e ambientalmente seguros. Além disso, é capaz de auxiliar no controle do principal vetor do dengue. Uma vez que esses extratos possuem atividade contra um número limitado de espécies, possuindo alvos específicos como demonstrado em estudos anteriores por (SENTHIL-NATHAN, KALAIVANI, SEHOON, 2006 e SENTHIL-NATHAN ET AL., 2006) não impactando demasiadamente o ciclo de vida de outros seres vivos. Extratos de plantas podem ser bastante utilizados para aumentar a eficácia biológica de agentes de controle de agentes etiológicos, pois produzem uma variedade de compostos que podem controlar a infestação de insetos (SENTHIL-NATHAN et al., 2005).

5. CONCLUSÃO

Os extratos de *Curcuma longa* L. possuem uma variedade de substâncias em sua composição, e a vasta gama de componentes químicos pode ser utilizada amplamente. Ambos extratos de *Curcuma longa* L. demonstraram potencial larvicida nas larvas de quarto estágio do agente etiológico do dengue e em baixas concentrações. Contudo, os extratos e os compostos de *C. longa* podem ser uma alternativa aos produtos sintéticos disponíveis no mercado para compostos larvicidas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-LATEEF, E.; HAMMAM, O. Bioactive chemical constituents of *Curcuma longa* L. L. rhizomes extract inhibit the growth of human hepatoma cell line (HepG2). v. 66, p. 387–398, 2016.
- AGGARWAL, B. B.; SUNDARAM, C.; MALANI, N.; ICHIKAWA, H. Curcumin: The Indian solid gold. **The molecular targets and therapeutic uses in health and disease**, v. 595, PP 1-75, 2007.
- AJAIYEoba, E. O. et al. Larvicidal Activity of Turmerone-Rich Essential Oils of *Curcuma longa* L. Leaf and Rhizome from Nigeria on *Anopheles gambiae*. v. 46, n. 4, p. 279–282, 2008.
- AUYSAWASDI, N.; CHUNTRANULUCK, S.; PHASOMKUSOLSIL, S. Improving the effectiveness of three essential oils against *Aedes aegypti* (Linn .) and *Anopheles dirus* (Peyton and Harrison). 2015.
- BACK, A. T.; LUNDKVIST, A. Dengue viruses: an overview. **Infection Ecology and Epidemiology**. v. 3, 19839, 2013.
- BIANCHI, M. M. et al. How to bring orphan genes into functional families. **Yeast**, v. 15, n. 6, p. 513–526, 1999.
- CARRINGTON, L. B.; SIMMONS, C. P. Human to mosquito transmission of dengue viruses. **Frontiers in Immunology - Microbial Immunology**. v. 5, Article 290, 2014.
- CDS/WHOPES/GCDPP/2005.13
- CHANDRE, F. et al. Status of pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae sensu lato*. v. 77, n. 3, p. 230–234, 1999.
- CIOTA, A. T.; KRAMER, L. D. Insights into Arbovirus Evolution and Adaptation from Experimental Studies. **Viruses**. v. 2, p. 2594-2617, 2010.

- COFFEY, L. L.; FORRESTER, N.; TSETTSARKIN, K.; VASILAKIS, N.; WEAVER, S. C. Factors shaping the adaptive landscape for arboviruses: implications for the emergence of disease. **Future Microbiol.** v. 8, n. 2, p. 155–176, 2013.
- CORBET, S.A.; TILEY, C.; MOORHOUSE, T.; GIAM, C.; PURSGLOVE, S.; RABY, J.; RICH, M. Surface films as mosquito larvicides: partitioning the mode of action. **Entomologia experimentalis et applicata** 94:295–307, 2000.
- DAMALAS, C. A.; ELEFTHEROHORINOS, I. G. Pesticide Exposure, Safety Issues, and Risk Assessment Indicators. p. 1402–1419, 2011.
- EISEN, L.; LOZANO-FUENTES, S. Use of Mapping and Spatial and Space-Time Modeling Approaches in Operational Control of *Aedes aegypti* and Dengue. **PLoS Negl Trop Dis.** v. 3, n. 4, e411, 2009.
- EREZ, Y. et al. Effect of Acid on the Ultraviolet – Visible Absorption and Emission Properties of Curcumin. 2014.
- Evolutionary Trends. **Clinical Microbiology Reviews.** p. 608–637, 2005.
- FARAJOHALLI, A.; FONSECA, D. M.; KRAMER, L. D.; KILPATRICK, A. M. “Bird biting” mosquitoes and human disease: A review of the role of *Culex pipiens* complex mosquitoes in epidemiology. **Infections, Genetics and Evolution.** 1577–1585, 2011.
- FREDERICKS, A. C.; FERNANDEZ-SESMA, A. The Burden of Dengue and Chikungunya Worldwide: Implications for the Southern United States and California. **Tropical Medicine in the Era of Global Connectivity.** v. 80, n. 6, p. 466–475, 2014.
- FUNASA – FUNDAÇÃO NACIONAL DA SAÚDE. Dengue: Instruções para Pessoal de Combate ao Vetor - Manual de Normas Técnicas. **Ministério da Saúde, Fundação Nacional da Saúde.** 3 ed, 2001.

Gao Y., Li Z., Sun M., Guo C., Yu A., Xi Y., Cui J., Lou H., Zhai G. Preparation and characterization of intravenously injectable curcumin nanosuspension. *Drug Deliv.*, 18 (2011), pp. 131–142

GARCEZ, W. S.; GARCEZ, F. R.; SILVA, L. M. G. E.; SARMENTO, U. C.

GUBLER, DJ.; WILDER-SMITH, A. Geographic expansion of dengue: the impact of international travel. *Med Clin North Am.* 2008; 92(6): 1377-90.

JANG, Y. S.; BAEK, B. R.; YANG Y. C.; KIM, M. K.; LEE, H.S. Larvicidal activity of leguminous seeds and grains against *Aedes aegypti* and *Culex pipiens pallens*. **J Am Mosq Control Assoc** 2002; 18 : 210-3.

JIANG, Chia-Ling; TSAI, Sheng-Fa; LEE, Shoei-Sheng. Flavonoids from *Curcuma longa* L. leaves and their NMR assignments. **Natural product communications**, v. 10, n. 1, p. 63-66, 2015

KALAIIVANI, K.; SENTHIL-NATHAN, S. Biological activity of selected Lamiaceae and Zingiberaceae plant essential oils against the dengue vector *Aedes aegypti* L . (**Diptera : Culicidae**). p. 1261–1268, 2012.

KOMALAMISRA, N.; TRONGTOKIT, Y.; RONGSRIYAM, Y.; APIWATHNASORN, C. Screening for larvicidal activity in some Thai plants against four mosquito vector species. **Southeast Asian J Trop Med Public Health**, 36 (6): 1412-1422, 2005.

KOVENDAN, K.; MURUGAN, K.; WILLIAM, S. J. Ovicidal, repellent, adulticidal and field evaluations of plant extract against dengue, malaria and filarial vectors. v. 2007, p. 1205–1219, 2013.

KUNO, G.; CHANG, G. J. Biological Transmission of Arboviruses: Reexamination of and New Insights into Components, Mechanisms, and Unique Traits as Well as Their

LAMBRECHTS, L.; SCOTT, T. W.; GUBLER, D. J. Consequences of the Expanding Global Distribution of *Aedes albopictus* for Dengue Virus Transmission. **PLoS Negl Trop Dis**. v. 4, n. 5, e646, 2010.

MANSOUR, S. A.; ALY, A. R. Insecticidal Activity of Plant Oils, Bacterial Endotoxins and their Combinations against *Musca*. v. 1866, n. November, 2015.

MARQUES, G. R. A. M.; SERPA, L. L. N.; BRITO, M. *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*. Laboratório de Culicídeos. **SUCEN – Superintendência de controle de endemias** 2015.

MINISTERIO DA SAUDE. Dengue. Guia de Vigilância Epidemiológica. **Secretaria de Vigilância em Saúde - Departamento de Vigilância epidemiológica**. Normas e Manuais Técnicos. 7ª edição. Série A. p. 9-16, 2009a.

MOHIUDDIN, E.; ASIF, M.; SCIENCES, A. *Curcuma longa* L. and Curcumin : a Review Article. v. 55, n. 2, p. 65–70, 2010.

MURRAY, N. E. A.; QUAM, M. B.; WILDER-SMITH, A. Epidemiology of dengue: past, present and future prospects. **Clinical Epidemiology**. v. 5, p. 299–309, 2013.

Naturally Occurring Plant Compounds with Larvicidal Activity Against *Aedes aegypti*. **Rev. Virtual Quim**, 2013, 5 (3), 363-393.

NGOAGOUNIL, C.; KAMGANG, B.; NAKOUNÉ, E.; PAUPY, C.; KAZANJI, M. Invasion of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) into central Africa: what consequences for emerging diseases?. **Parasites & Vectors**. v. 8, p. 191, 2015.

Organização Mundial de Saúde. Weekly epidemiological record. N. 30, 2016, 91, 349–364. Source: <http://www.who.int/wer>. Acessado em 20/09/2016.

POWELL, J. R.; TABACHNICK, W. J. History of domestication and spread of *Aedes aegypti* - A Review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v. 108, n. I, p. 11-17, 2013.

QIAO, X. et al. Global profiling and novel structure discovery using multiple neutral loss /precursor ion scanning combined with substructure recognition and statistical analysis (

MNPSS): Characterization of terpene-conjugated curcuminoids in *Curcuma longa* L. as a case precursor ion scanning combined with substructure recognition and statistical analysis (MNPSS): Characterization of terpene-conjugated curcuminoids in *Curcuma longa* L. as a case. 2015.

RAO, M.; SAKARIAH, K. K. Chemistry and biological activities of *C. longa*. v. 16, p. 533–548, 2005.

REVATHY, S. et al. Isolation, Purification and Identification of Curcuminoids from Turmeric (*Curcuma longa* L. L .) by Column Chromatography. **Journal of Experimental Sciences**, v. 2, n. 7, p. 21–25, 2011.

Revathy, S.; Elumalai1, S.; Benny, M.; Antony, B. Isolation, Purification and Identification of Curcuminoids from Turmeric (*Curcuma longa* L. L.) by Column Chromatography. **Jounal of experimental sciences**. v.2, p. 21-25, 2011.

SAGNOU, M.; MITSOPOULOU, K. P.; KOLIOPOULOS, G.; PELECANOU, M.; COULADOUROS, E. A.; MICHAELAKIS, A. Evaluation of naturally occurring curcuminoids and related compounds against mosquito larvae. **Acta Trop** 123:190–195, 2012.

SCHAFFNER, F.; MEDLOCK, J. M.; VAN BORTE, W. Public health significance of invasive mosquitoes in Europe. **Clin Microbiol Infect**. v. 19, p. 685–692, 2013.

SENTHIL-NATHAN, S.; KALAIVANI, K.; MURUGAN, K.; CHUNG, P. G. Effects of neem limonoids on malarial vector *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae). **Acta Tropica** 96(1):47–55, 2005.

SENTHIL-NATHAN, S.; KALAIVANI, S.; SEHOON, K. Effects of *Dysoxylum malabaricum* Bedd. (Meliaceae) extract on the malarial vector *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae). **Biores Technol** 97(16):2077–2083, 2006a.

SENTHIL-NATHAN, S.; SAVITHA, G.; GEORGE, D. K.; NARMADHA, A.; SUGANYA,

L.; CHUNG P. G. Efficacy of *Melia azedarach* L. **extract on the malarial vector *Anopheles stephensi* Liston.** *Biores Technol* 97 (11):1214–1221, 2006b.

SIVAGNANAME, N.; GUNASEKARAN, K. Need for an efficient adult trap for the surveillance of dengue vectors. *Indian J Med Res.* v. 136, p. 739-749, 2012.

THAI, K. T. D.; ANDERS, K. L. The role of climate variability and change in the transmission dynamics and geographic distribution of dengue. *Exp Biol Med (Maywood).* v. 236, p. 944, 2011.

TISGRATOG, R. et al. Plants traditionally used as mosquito repellents and the implication for their use in vector control. *Acta Tropica*, 2016;157:136-44. doi: 10.1016/j.actatropica.2016.01.024.

VERMA, S. C. Development of a rapid separation process for curcumin from *Curcuma longa* L. L. rhizomes and its quantification by CLAE-PDA. n. January 2014, 2016.

VERMA, S. C.; JAIN, C. L.; RANI, R.; PANT, P.; SINGH, R.; PADHID, M. M.; DEVALLA R. B. Simple and Rapid Method for Identification of *Curcuma longa* L. Rhizomes by Physicochemical and HPTLC Fingerprint Analysis. *Chemical Science Transactions.* V.1, p. 709-715, 2012

WALDOCK, J.; CHANDRA, N. L.; LELIEVELD1, J.; PROESTOS, Y.; MICHAEL, E.; CHRISTOPHIDES, G.; PARHAM, P. E. The role of environmental variables on *Aedes albopictus* biology and chikungunya epidemiology. *Pathogens and Global Health.* v. 107, n. 5, 2013.

WANG, Y.; KHAN, I. A. Larvicidal and Biting Deterrent Activity of Essential Oils of *Curcuma longa* L., α -turmerone, and Curcuminoids Against *Aedes aegypti* and *Anopheles quadrimaculatus* (Culicidae : Diptera). 2015.

WEAVER, S. C.; VASILAKIS, N. Molecular Evolution of Dengue Viruses: Contributions of Phylogenetics to Understanding the History and Epidemiology of the Preeminent Arboviral Disease. **Infect Genet Evol.** v. 9, n. 4, p. 523–540, 2009.

WHO - World Health Organization. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control - New edition. **World Health Organization (WHO) and Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR)**. 2009. ISBN 978 92 4 154787 1.

WHO. Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides. 2005. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/69101/1/WHO_CDS_WHOPES_GCDPP_2005.13.pdf

Zhou H, Beevers C.S., Huang S.. The targets of curcumin. *Curr. Drug Targets*, 12 (2011), pp. 332–347

ZHU, B.C.R., HENDERSON, G., CHEN, F., FEI, H., LAINE, R.A., 2001. Evaluation of vetiver oil and seven insect-active essential oils against the Formosan subterranean termite. **J. Chem. Ecol.** 27, 1617–1625.

De acordo,

Prof. Dr. Adriano Mondini

Gustavo Chagas Lutfala Paulino