

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS - UEA  
ESCOLA SUPERIOR CIÊNCIAS DA SAÚDE - ESCS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS REGIONAIS  
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS NATURAIS

AÇÃO LARVICIDA DE ESPÉCIES DA FAMÍLIA PIPERACEAE EM  
*Anopheles* sp E *Culex quinquefasciatus* (DIPTERA: CULICIDAE).

RACHEL GEBER CORRÊA

MANAUS – AMAZONAS

2007

RACHEL GEBER CORRÊA

AÇÃO LARVICIDA DE ESPÉCIES DA FAMÍLIA PIPERACEAE EM  
*Anopheles* sp E *Culex quinquefasciatus* (DIPTERA: CULICIDAE).

Orientador: Dr. Wanderli Pedro Tadei  
Co-orientador: Dr. Sergio Massayoshi Nunomura

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Regionais, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais da Universidade do Estado do Amazonas.

Manaus – Amazonas  
2007

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus pais, Leimar Geber Corrêa e Aládio Corrêa Júnior pelo amor puro, apoio, segurança doados a mim e por me ensinarem a viver em paz.

Aos meus irmãos que fazem minha vida todo dia mais feliz e mais digna.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por me salvar e me dar a oportunidade de viver.

Ao Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia – INPA pela possibilidade de trabalho.

A Universidade do Estado do Amazonas, pelo curso de pós-graduação gerando oportunidade de estudo.

Ao Centro de Biotecnologia da Amazônia (CBA) pelas análises compartilhadas.

Ao Programa de Financiamento do Estado, FAPEAM.

A Fundação de Vigilância da Saúde (FVS) por me ajudar nas coletas.

Ao meu orientador Doutor Wanderli Pedro Tadei, por me aceitar como orientada e oportunizar o trabalho construtivo.

Ao meu co-orientador Doutor Sergio Massayoshi Nunomura, por ter muita paciência e me ensinar com detalhes os procedimentos usados neste trabalho.

Às amigas de toda a vida Melissa Chalco Fernandez e Caroline Dantas de Oliveira por me apoiarem e suportarem ao meu lado as provas da vida com amor, reflexões, choros e risos, muitos risos.

Aos amigos queridos Ricardo Passos e Fábio Costa por me ajudarem na correção da dissertação, por discussões científicas e pela amizade e preocupação incondicionais.

Aos companheiros do Laboratório de Química em Produtos Naturais, Dra. Rita Saraiva, Msc. Zelina Torres, Andreza Barreto, Dulcimar Quadros, Orivaldo Lacerda, Banny Silva por sempre dividirem o trabalho e torcerem pelo término dessa dissertação e, em especial, aos amigos Magno Perêa, Viviane Guedes e Gisele Stark pelas longas conversas, sendo estas produtivas ou não, pelo desejo de vitória e pela amizade verdadeira.

Aos amigos do Laboratório de Malária e Dengue – INPA, Doutora Iléia Brandão, Gláubio Fernandes da Silva, Carlos Praia, Waléria Dasso, Maria Adelina e Maria do Desterro por me ajudarem sem reclamações ou empecilhos.

Ao primo Roger Gonçalves por me ajudar a decifrar outras línguas.

## EPIGRAFE

*“Embora tenha passado por tudo que passei não me arrependo dos problemas em que me meti – porque foram eles que me trouxeram até onde eu desejei chegar. Agora, tudo que tenho é esta espada, a entrega para todo aquele que desejar seguir sua peregrinação. Levo comigo as marcas e cicatrizes dos combates – elas são testemunhas do que vivi, e recompensas do que conquistei. São estas marcas e cicatrizes queridas que vão me abrir as portas do Paraíso. Houve época em que vivi escutando histórias de bravura. Houve época em que vivi apenas porque precisava viver. Mas agora vivo porque sou uma guerreira, e porque quero um dia estar na companhia Daquela por quem tanto lutei”.*

*John Bunyan*

## RESUMO

Extratos de oito espécies vegetais da família Piperaceae foram utilizados para avaliar a atividade larvicida contra larvas de 3<sup>o</sup> estágio de *Culex quinquefasciatus* e *Anopheles* sp. O material vegetal, pertencente ao gênero *Piper* foi coletado em dois locais: *Piper hostmanianum*, *P. dilatatum* e *P. tuberculatum*, foram coletadas no campus principal do INPA – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, em Manaus, capital do Amazonas. As demais espécies, *P. amapense*, *P. cyrtopodon*, *P. capitarianum*, *P. baccans* e *P. erectipillum*, foram coletadas na Reserva Adolpho Ducke situada na periferia de Manaus.

Os extratos foram obtidos a partir de um procedimento padronizado que envolveu a extração do material previamente moído e seco, em aparelhagem do tipo Soxhlet por 18 h com metanol, substituindo o solvente extrator a cada 6 h. Os extratos avaliados foram obtidos a partir de diferentes partes das plantas - frutos, folhas, galhos e raízes.

Os testes biológicos foram realizados em réplicas de 3 em copos descartáveis de 50 mL, contendo 10 mL de água destilada, em concentrações que variaram de 0,008 a 1000 µg/mL fazendo-se a leitura da mortalidade em 24 h. O extrato mais ativo foi fracionado por meio de técnicas cromatográficas e os testes de biomonitoramento permitiram isolar os componentes principais, pelitorina e piplartina, que foram identificados por meio de técnicas de ressonância magnética nuclear monodimensionais (RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C). Os estudos da atividade larvicida com as frações e a substância isolada, pelitorina, indicaram um efeito sinérgico entre elas.

Registraram-se também dados de alterações morfológicas externas e comportamentais de larvas de 3<sup>o</sup> estágio de *A. nuneztovari* em contato com os extratos de fruto hexânico e clorofórmico de *Piper tuberculatum*.

## ABSTRACT

Extracts from eight species of the Piperaceae family were utilized to evaluate the larvicidal activity against 3<sup>rd</sup> instar larvae 3<sup>rd</sup> of *Culex quinquefasciatus* e *Anopheles* sp. Plant material that belongs to the *Piper* genera were collected from two places: *Piper hostmanianum*, *P. dilatatum* e *P. tuberculatum* were collected at the main campus of INPA – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, in Manaus, capital of the Amazonas State. The remaining species *P. amapense*, *P. cyrtopodon*, *P. capitarianum*, *P. baccans* e *P. erectipillum* were collected at the Adolpho Ducke reserve located at peripheric area of Manaus.

The extracts were obtained from a standardized procedure that involved the extraction of the dried material in a Soxhlet apparatus for 18 h with methanol replacing the solvent every 6 hours. The evaluated extracts were obtained from different parts of plants – fruits, leaves, stems and roots.

The biologic tests were made in rejoinders of 3 inside dismissable 50 mL cups containing 10 mL of distilled water within variable concentrations of 0,008 to 1000 µg/mL by making the mortality reading in 24 h. The most active extract was fractioned by the means of chromatographic techniques and the biomonitoring test enabled to isolate the main pelitorina e piplartina components that were identified by the means of monodimensioned nuclear magnetic resonance (RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C). The studies of the larvicidal activity with the fractions and the isolated substance indicated a synergistic effect among them.

There were also registered external and behavior morphologic alterations of the 3<sup>rd</sup> instar larvae of *A. nuneztovari* in contact with the hexanic and chloroformic fruit extracts of *Piper tuberculatum*.

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	10
1 MALÁRIA NO MUNDO E NO BRASIL .....	10
1.2 SITUAÇÃO DA MALÁRIA NO ESTADO DO AMAZONAS .....	13
1.3 ASPECTOS GERAIS DA FAMÍLIA CULICIDAE .....	14
1.4 PADRÕES COMPORTAMENTAIS .....	15
1.5 FORMAS DE CONTROLE DOS MOSQUITOS VETORES DE DOENÇAS .....	16
1.6 INSETICIDAS QUÍMICOS UTILIZADOS NO COMBATE A MALÁRIA .....	18
1.7 O PROBLEMA DA RESISTÊNCIA .....	19
1.8 PRODUTOS NATURAIS NO CONTROLE DE INSETOS .....	20
1.9 CARACTERÍSTICAS GERAIS DA FAMÍLIA PIPERACEAE E DO GÊNERO <i>Piper</i> .....	21
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	24
Capítulo 01 .....	33
Screening de plantas da família Piperaceae contra larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> (Say, 1823), <i>Anopheles nuneztovari</i> Gabaldón, 1940 e <i>Anopheles albitarsis</i> Lynch – Arribalzaga, 1878.....	33
INTRODUÇÃO.....	34
1 DESCRIÇÃO DAS ESPÉCIES.....	39
2 OBJETIVOS.....	41
2.1 GERAL.....	41
2.2 ESPECÍFICOS .....	41
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	42
3.1 MATERIAL VEGETAL .....	42
3.2 EQUIPAMENTOS .....	42
3.3 SECAGEM DO MATERIAL VEGETAL .....	43
3.4 OBTENÇÃO DE <i>Culex quinquefasciatus</i> .....	44
3.5 OBTENÇÃO DE <i>Anopheles</i> sp.....	45
3.6 BIOENSAIOS .....	47
3.7 DETERMINAÇÃO DA CL <sub>50</sub> .....	48
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
4.1 SCREENING DAS ESPÉCIES DE <i>Piper</i> .....	49
4.2 CONCENTRAÇÃO LETAL MEDIANA (CL <sub>50</sub> ) DOS EXTRATOS DE <i>P. tuberculatum</i> PARA LARVAS DE <i>Anopheles nuneztovari</i> .....	52
4.3 CONCENTRAÇÃO LETAL MEDIANA (CL <sub>50</sub> ) DOS EXTRATOS DE <i>P. tuberculatum</i> PARA LARVAS DE <i>A. albitarsis</i> .....	58
CONCLUSÕES.....	65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	66
Capítulo 02 .....	72
Estudo biomonitorado do extrato clorofórmico de fruto de <i>Piper tuberculatum</i> Jacq.....	72
INTRODUÇÃO.....	73
1 QUÍMICA DA ESPÉCIE <i>Piper tuberculatum</i> .....	73
1.1 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS .....	76
2 OBJETIVOS.....	78
2.1 GERAL.....	78
2.2 ESPECÍFICOS .....	78
3 MATERIAL E MÉTODO .....	79
3.1 SOLVENTES .....	79
3.2 EQUIPAMENTOS .....	79
3.3 REVELADORES .....	80
3.4 COLETA DO MATERIAL VEGETAL DE <i>Piper tuberculatum</i> .....	80
3.5 BIOMONITORAMENTO.....	80
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	81
4.1 PRÉ-FRACIONAMENTO DO EXTRATO CLOROFÓRMICO DO FRUTO DE <i>P. tuberculatum</i> .....	81
4.2 SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA DA FRAÇÃO RG 22-1.....	82

4.3 SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA DA FRAÇÃO RG27–13.....	85
4.4 PURIFICAÇÃO DAS FRAÇÕES RG44–19 E RG44–24 POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) .....	86
CONCLUSÕES .....	98
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	99
ANEXO A .....	103
ANEXO B .....	109
ANEXO C .....	112
ANEXO D .....	116
Capítulo 3 .....	119
Análise do efeito sobre alterações comportamentais e morfológicas externas de <i>Anopheles nuneztovari</i> na presença dos extratos vegetais de <i>Piper tuberculatum</i> .....	119
INTRODUÇÃO.....	120
1 OBJETIVOS.....	123
1.1 GERAL.....	123
1.2 ESPECÍFICOS .....	123
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	124
2.1 COLETA DE <i>Anopheles nuneztovari</i> .....	124
2.2 OBTENÇÃO DE LARVAS .....	124
2.3 EXTRATOS VEGETAIS.....	124
2.4 MONTAGEM DOS BIOENSAIOS .....	124
2.5 LEITURA DOS TESTES BIOLÓGICOS .....	125
2.6 EQUIPAMENTOS .....	125
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	126
3.1 OBSERVAÇÕES APÓS 1 h DA APLICAÇÃO (TABELA 1) .....	126
3.2 OBSERVAÇÕES APÓS 2 h DA APLICAÇÃO (TABELA 2) .....	127
3.3 OBSERVAÇÕES APÓS 3 h DA APLICAÇÃO (TABELA 3) .....	128
3.4 OBSERVAÇÕES APÓS 4 h DA APLICAÇÃO (TABELA 4) .....	129
3.5 OBSERVAÇÕES APÓS 12 h DA APLICAÇÃO (TABELA 5) .....	130
3.6 OBSERVAÇÕES APÓS 24 h DA APLICAÇÃO (TABELA 6) .....	131
CONCLUSÕES .....	133
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	134

## INTRODUÇÃO

Ao longo da história, as grandes endemias têm prejudicado as populações humanas, ocasionando grandes perdas sociais, principalmente nas camadas mais desfavorecidas das comunidades. As doenças tropicais continuam sendo verdadeiros desafios à ocupação da região tropical, pois não só apenas se dispersaram sobre milhões de pessoas, como também têm sido capazes de resistir às modernas tecnologias. Atualmente, essas doenças concentram-se nos países subdesenvolvidos, como uma indicação de que a evolução tecnológica e da ciência também pode participar do processo de exclusão de pessoas e populações (NAKAJIMA, 1989). Quanto ao significado social, mais da metade da população do planeta encontra-se sob ameaça das doenças tropicais (REMME *et al.*, 1993).

Dentro da entomologia médica, a família Culicidae é a que mais tem atraído à atenção da saúde pública. Isso se deve à circunstância de que esta família está envolvida na transmissão de múltiplas infecções ao homem e aos animais domésticos (FORATTINI, 2002). De acordo com El Hag *et al.* (1999 e 2001) insetos vetores, especialmente mosquitos, são responsáveis por difundir sérias doenças humanas como malária, encefalite, febre amarela, dengue, filariose, dentre outras.

### 1 MALÁRIA NO MUNDO E NO BRASIL

A malária é causada por protozoários do gênero *Plasmodium*, do qual quatro espécies infectam o homem: *P. falciparum* Welch, *P. vivax* Grassi & Feletti, *P. ovale* Stephens e *P. malariae* Laveran. A transmissão da infecção ocorre quando os parasitos são ingeridos por fêmeas de mosquitos do gênero *Anopheles* e são transmitidos ao homem, através da picada do mosquito adulto. O ciclo de vida do plasmódio envolve uma fase no vetor e outra no hospedeiro que pode ser humano ou animal. A doença destrói as hemácias, encontradas no sangue, tornando as pessoas anêmicas.

A doença acomete o homem desde a pré-história apresentando-se como uma das principais dificuldades para a humanidade. Originada provavelmente no Continente Africano, que é entendido como o "Berço da Humanidade" acompanhou a migração do ser humano pelas regiões do Mediterrâneo, Mesopotâmia, Índia, e Sudeste Asiático (SUCEN, 2001).

No mundo, há pelo menos 107 países e territórios endêmicos de malária. O maior foco de transmissão é a África Sub-sahariana onde ocorrem 90% dos casos do planeta. A malária é endêmica em 53 países na África, dos quais oito deles ficam ao sul. Nas Américas, é endêmica em 21 países, já na Europa em quatro e 14 na região leste do Mediterrâneo, e no sudeste Asiático. Estima-se que a cada ano cerca de 110 milhões de casos novos de malária e um a dois milhões de óbitos ocorram em todo mundo. (WHO, 1991 e 2005). A situação epidemiológica da malária vem agravando-se com o acréscimo de casos em áreas urbanas (TADEI *et al.*, 2007).

As maiores taxas de incidência são observadas na África, na Ásia e nas Américas. O número de indivíduos infectados é avaliado em 270 milhões de pessoas, a maioria presente na África (NAJERA *et al.*, 1991).

Apesar desses números impressionantes, a malária é hoje uma doença focal, na maior parte do mundo (TADEI *et al.*, 2007). Apenas algumas regiões, em cada país, continuam apresentando transmissão natural da infecção. É uma doença que está presente nas regiões tropicais e subtropicais do planeta, com um elevado índice de morbidade afetando cerca de 300 a 500 milhões de pessoas a cada ano, e contribuindo com uma elevada mortalidade, estimada em cerca de um milhão de óbitos anualmente (WHO, 2005). Por dia, quase 3 mil crianças morrem no continente africano. Esses óbitos ocorrem em áreas remotas com difícil acesso aos serviços de saúde. Dos 25 a 30 milhões de pessoas que viajam para áreas endêmicas, entre 10 a 30 mil contraem malária (CAMARGO, 2003).

Durante os primeiros anos do século XX, a transmissão da malária ocorreu em toda a América, desde o Canadá até Argentina e continua a existir nas Américas calculando-se que 175 milhões de pessoas vivem em zonas com algum risco, onde 58% habitam em zonas de baixo risco, 24% em zonas de risco

moderado e 18% em zonas de alto risco. Dentre eles 11 estão na América do Sul: Argentina, Bolívia, Brasil, Colômbia, Equador, Guiana Francesa, Guiana, Paraguai, Peru, Suriname e Venezuela. Os outros 10 países são: Belize, Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras, México, Nicarágua e Panamá, junto com República Dominicana e Haiti. Aproximadamente 87 milhões de pessoas vivem em zonas onde a transmissão ocorreu anteriormente e na atualidade há um risco muito baixo e cerca de 70 milhões de pessoas vivem em áreas de risco onde ocorre transmissão de malária, envolvendo nove países que compartilham a selva pluvial amazônica (Bolívia, Brasil, Colômbia, Equador, Guiana Francesa, Guiana, Peru, Suriname e Venezuela) (OPS, 2004).

No Brasil, no período anterior a 1940, a malária atingia grande parte do território nacional e se constituía um desafio à ocupação não apenas para a Amazônia, mas em várias áreas litorâneas do sudeste e de áreas da bacia dos rios Paraná-Prata (estado do Paraná), São Francisco e Doce (estado de Minas Gerais), no Planalto Central (PESSOA, 1946).

Foi adotada pelo Brasil, em 1965, a estratégia de erradicação da malária preconizada pela Organização Mundial de Saúde – OMS - baseada na ação intradomiciliar do diclorodifeniltricloroetano (DDT) contra os anofelinos transmissores e no uso de drogas antimaláricas para esgotamento das fontes de infecção (seres humanos parasitados pelos plasmódios). Esta estratégia foi capaz de eliminar a malária de extensas áreas do território brasileiro (regiões Nordeste, Sudeste, Centro-Oeste e Sul) onde uma parcela significativa da nossa população vivia sob o risco de contrair a doença (LOIOLA *et al.* 2002).

A partir da década de 70 do século XX, os projetos de desenvolvimento da Amazônia, com abertura de estradas, construções de hidroelétricas, expansão de áreas de garimpo, entre outros, promoveram uma grande migração interna no território brasileiro, com alterações ambientais importantes e exposição de grande contingente populacional à área malarígena. Essa situação provocou a dispersão da infecção pelas regiões Norte e Centro-Oeste, com um aumento significativo do número de casos, passando-se a alcançar níveis de 450 a 500 mil casos anuais. As novas fronteiras para o desenvolvimento da Amazônia provocaram profundas

alterações ambientais, suportadas em um modelo econômico de crescimento que falhou em assegurar ao homem os mecanismos de proteção social (TADEI *et al.*, 2007).

A malária é a primeira endemia a surgir em áreas alteradas e o risco da transmissão está relacionado com características sociais, econômicas e ecológicas da zona onde as pessoas vivem (BOYD, 1949; MEIRA *et al.*, 1980; MORAN, 1981; TADEI, 1986 e TADEI *et al.*, 1993). Isso acontece principalmente pela distribuição dos vetores nas áreas alteradas e susceptibilidade das populações imigrantes.

A malária urbana e peri urbana se constituem em um problema de mais alta relevância na Amazônia. A transmissão da doença é intensa na periferia dessas regiões, decorrente da proximidade com a mata marginal, e a intensidade vai se reduzindo à medida que se aproxima dos centros das cidades. A migração de populações entre áreas endêmicas e não endêmicas de malária, associada às condições socioeconômicas, contribuem com o aumento da incidência em áreas urbanas (TADEI, 1993; 2001; TADEI & DUTARY THATCHER, 2000; ROCHA, 2002; TADEI *et al.*, 1998; 2007).

## **1.2 SITUAÇÃO DA MALÁRIA NO ESTADO DO AMAZONAS**

O contingente populacional gerado, na sua maioria, pela invasão de terras, ocupou a cidade que estava desprovida de serviços essenciais urbanos para recebê-lo, formando bairros superpopulosos e favelas, com graves problemas de infra-estrutura. Além das ocupações desordenadas, há uma conseqüente destruição de florestas consideradas primárias, levando à perda de toda a informação sobre a vida natural existente no terreno, assim como de dados sobre a biodiversidade. Tal processo gerou, ainda, elevação da temperatura em decorrência da falta de vegetação e a proliferação de doenças como a malária.

No estado do Amazonas, o índice de malária é crescente ao longo dos anos, com a ampliação dos espaços de transmissão, inclusive invadindo áreas historicamente de baixa prevalência. No período de 1999-2003, o comportamento

da malária oscilou entre avanços e recuos. Em 2004 e 2005 houve um incremento no estado do índice de notificação da doença, apresentando os seguintes números de casos: 1999, 167.722; 2000, 96.026; 2001, 48.385; 2002, 70.223; 2003 140.642; 2004, 147.349; 2005, 222.545 e em 2006 51.225 (SIVEP, 2006).

No ano de 2006, no mês de abril, houve uma redução de 42% nos casos de malária, o que significa que 15 mil pessoas deixaram de adoecer, mesmo assim ainda foram registrados 540.000 casos na Amazônia Legal (TADEI *et al.*, 2007).

No município de Manaus, a malária apresentou os seguintes índices: 1999, 41.195 casos; 2000, 26.416 casos; 2001, 10.038 casos e 2002 apresentou 21.652 casos. Em 2003 foram registrados 77.267 casos dos quais aproximadamente 45% ocorreram na área urbana. Desse total de casos informados, 70% correspondem às notificações da cidade de Manaus (Ministério da Saúde/Boletim Epidemiológico da Malária nº 01/2003).

### 1.3 ASPECTOS GERAIS DA FAMÍLIA CULICIDAE

O gênero *Anopheles* compreende cerca de 400 espécies, das quais apenas um número reduzido tem importância para a epidemiologia da malária, em cada região brasileira. Cinco espécies são consideradas como vetores principais no Brasil (TADEI, 1993; CABIANCA *et al.*, 2000):

- *Anopheles* (Nyssorhynchus) *darlingi* – Root, 1926
- *Anopheles* (Nyssorhynchus) *albitarsis* – LynchArribalzaga, 1878
- *Anopheles* (Nyssorhynchus) *aquasalis* – Curry, 1932
- *Anopheles* (Kerteszia) *cruzi* – Dyar e Kanab, 1908
- *Anopheles* (Kerteszia) *bellator* - Dyar e Kanab, 1908

Comumente chamados de mosquitos, muriçocas, carapanãs e pernilongos, esses organismos se desenvolvem por metamorfose completa (holometabolía), apresentando os seguintes estágios: ovo, larva, pupa e adulto.

São quatro estágios larvais (L1, L2, L3 e L4) com quatro ecdises larvais e uma pupal. Os adultos são dióicos. Todos os estágios são aquáticos, com exceção do último (adulto). Cada espécie de culicídeo comporta-se como se representasse duas populações distintas, ocupando ecótopos diferentes. Na fase adulta, ocorre a reprodução e dispersão. (FORATTINI, 2002).

#### 1.4 PADRÕES COMPORTAMENTAIS

Dados sobre a incidência e distribuição das espécies, aspectos ecológicos, sazonalidade, preferências alimentares, conhecimentos sobre a hematofagia, estrutura etária, entre outros, são fundamentais para uma melhor implementação das medidas de controle (TADEI *et al.*, 1998; 2007).

As fêmeas saem em busca de suas fontes alimentares, vertebrados (incluindo seres humanos), no período crepuscular. As espécies que procuram principal ou unicamente o sangue de animais (mamíferos e aves, por exemplo) são qualificadas pela maioria dos especialistas como “zoófilas”, enquanto as que picam freqüente ou preferencialmente o ser humano são ditas antropófilas. A antropofilia é condição fundamental para que uma espécie de anofelinos seja considerada vetora em potencial de malária humana. Anofelinos que costumam penetrar nas habitações humanas participam mais ativamente da transmissão da malária do que as espécies que permanecem de preferência no exterior. Esse traço de comportamento, qualificado como domesticidade ou endofilia da espécie, é tomado em consideração nos estudos epidemiológicos, fornecendo um dos parâmetros para medir a eficiência dessa espécie como vetora da doença e ajudando a planejar a aplicação de inseticidas no interior das casas (TADEI, 1988; 1993; CABIANCA *et al.*, 2000).

Tadei & Dutary Thatcher (2000), estudaram várias espécies de *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) na Amazônia a fim de se determinar sua importância na transmissão da malária. Das 33 espécies de *Anopheles* de ocorrência conhecida na Amazônia, apenas 8 foram encontradas infectadas por *Plasmodium*. O principal vetor, *A. darlingi*, é antropofílico com um ciclo contínuo de atividade que dura a

noite inteira, mas que tem picos ao anoitecer e ao amanhecer. *A. nuneztovari* mostrou-se ser zoofílico, crepuscular e peridomiciliar. Esses hábitos podem mudar dependendo de uma série de fatores externos, especialmente aqueles relacionados com as atividades humanas.

## 1.5 FORMAS DE CONTROLE DOS MOSQUITOS VETORES DE DOENÇAS

A maioria dos programas de controle de vetores tem como alvo usar inseticidas para o estágio larval nos seus locais de criação, pois usar inseticidas para o estágio adulto reduz a população dos insetos temporariamente (EL HAG *et al.*, 1999, 2001).

Uma atividade para o controle dos criadouros de mosquitos constitui o que é parte do procedimento geral e atualmente denominado de controle integrado, onde pode ser entendido como aplicação de medidas, quando e onde couber, seja separada ou conjuntamente, de meios objetivando reduzir, ou mesmo interromper, o controle entre as populações humanas e as de vetores de infecções. O tratamento do ambiente, a aplicação de substâncias químicas e a utilização de inimigos naturais são classificados por Forattini (2002) como medidas básicas de controle de insetos, considerando cada uma delas como um conjunto de procedimentos técnicos, chamados de controle ambiental, químico e biológico.

Mais especificamente, o controle ambiental, de acordo com Ault (1994), define-se pelo conjunto representado pelas atividades de planejamento, organização, execução e vigilância das modificações do ambiente que objetivam torná-lo pouco propício à sobrevivência da população de mosquitos. Há que planejá-lo adequadamente e operacionalizá-lo de maneira a poder pesar os benefícios obtidos em relação aos custos demandados.

O controle químico é enunciado como o uso de substâncias químicas para o combate a mosquitos. A elas se dá o nome genérico de inseticidas e, no caso de se pretender atingir as formas imaturas, larvicidas. Não obstante, o uso desses compostos tem merecido ultimamente algumas restrições, face à circunstância de contribuírem para a poluição ambiental. Contudo constituem ainda parte

importante do controle integrado e sua utilização não pode deixar de ser considerada.

Inseticidas organoclorados começaram a ser utilizados após a descoberta da efetividade do DDT em 1939. Esta descoberta foi revolucionária e a partir de 1942 falava-se da “era dos pesticidas orgânicos” passando a ser chamada mais tarde de “era do DDT”.

Hoje se empregam compostos organofosforados, carbamatos e piretróides. Algumas substâncias que inibem o desenvolvimento do estágio larval, como o Altosid (metoprene) ou que afetam o processo de quitinização, como o Dimilin (difluorbenzofurona) também são usadas (FORATTINI, 2002). O grupo que pertence o Dimilin, chama-se de IGRs (“Insect Grow Regulator”) ao qual possui ação mais específica e menor toxicidade para mamíferos e outros animais (MARTINEZ, 1999).

Pode-se chamar de controle biológico o uso de mecanismos, envolvendo organismos vivos como bactérias, predadores, fungos ou vírus para redução ou regulação da população de pragas nocivas, destrutivas ou perigosas, que reduzem a população dos hospedeiros sem prejuízo ao meio ambiente (RODRIGUES, 1996; ALVES, 1998; TADEI & RODRIGUES, 2002). Esse controle vem sendo realizado atualmente por meio de bactérias entomopatogênicas principalmente por *Bacillus thuringiensis* que apresenta toxicidade contra larvas de mosquito do gênero *Aedes* e por *Bacillus sphaericus* que apresenta toxicidade contra larvas de mosquitos dos gêneros *Culex* e *Anopheles* (HABIB, 1989; GERMANI, 1993; ALVES & PEREIRA, 1998). Experimentos feitos com larvas de 2º e 3º estádios de *Anopheles nuneztovari*, *A. darlingi* e *A. braziliensis* foram submetidas à ação de *B. sphaericus* estirpe 2362, mostrando que as duas primeiras espécies são menos susceptíveis às bactérias que a última (RODRIGUES *et al.*, 1999). É de grande importância o uso de bioinseticidas bacterianos para o controle de malária na região Amazônica, quando se considera a preservação do meio ambiente (TADEI & RODRIGUES, 2002).

O caminho mais eficiente para o controle da doença, teoricamente, é a eliminação dos mosquitos vetores por meio da extinção dos seus criadouros com

uso de inseticidas e larvicidas químicos, peixes larvófagos e controle com agentes. De acordo com a WHO (2001), os esforços para controlar os vetores passam por dificuldades pelas razões abaixo descritas:

a) a resistência do vetor aos inseticidas, o custo e toxicidade dos inseticidas alternativos e o comportamento exofílico de certas espécies, faz com que a aplicação do inseticida internamente dos estabelecimentos (residências, por exemplo) seja ineficiente;

b) resistência do parasito e o constante aumento do custo das drogas antimaláricas;

c) falta de acesso de grandes grupos populacionais (por razões como clima ou geografia).

d) migrações populacionais;

e) conhecimento inadequado da população sobre a doença;

f) e em muitos países em desenvolvimento, poucos insumos direcionados à saúde no geral e particularmente à malária, com recursos básicos deficientes e pouco pessoal treinado para combater a doença.

## **1.6 INSETICIDAS QUÍMICOS UTILIZADOS NO COMBATE A MALÁRIA**

Os programas de controle da malária da Organização Mundial de Saúde (OMS) estão apoiados, principalmente, nas ações combinadas de métodos contra o vetor e contra os parasitos (FORATTINI, 1962; WHO, 2005; HAWORTH, 1989). Na luta contra os transmissores da malária, para proteger o homem e evitar a inoculação dos plasmódios, a principal intervenção tem sido a pulverização intradomiciliar do DDT (diclorodifeniltricloroetano). Essa atividade apresentou excelentes resultados nos anos 60, reduzindo o impacto da malária em vários países, na década de 70, contudo, iniciou-se o registro de novos focos em áreas anteriormente consideradas praticamente controladas. Dentre as causas deste fato, foram detectadas razões técnicas e econômicas, além dos focos de resistência dos anofelinos (TAUIL, 1992).

O DDT, assim como o aldrin, o dieldrin e outros organoclorados migram lentamente no solo, sendo muito persistentes. A maior crítica atribuída aos seus usos é exatamente o fato de deixarem resíduos tóxicos do próprio produto acumulados nos tecidos adiposos de muitos animais. Tais resíduos podem causar alterações fisiológicas de efeitos graves e até mesmo mortais. Normalmente, encontra-se, com mais freqüência, resíduos de organoclorados no solo, sendo o DDT e o dieldrin os mais comuns. Os inseticidas de outros grupos se degradam mais rapidamente e muito dificilmente podem ser medidos vários meses após sua aplicação. Dentre os inseticidas alternativos, existe a classe dos piretróides, originariamente extraídos das flores de crisântemo. Posteriormente, foram sintetizadas substâncias análogas às piretrinas naturais, tais como aletrina, bioaletrina, permetrina, cipermetrina, lambdacialotrina e deltametrina (BARRETO, 1975).

## 1.7 O PROBLEMA DA RESISTÊNCIA

O recente interesse em componentes inseticidas de plantas é o resultado de muitos problemas associados ao uso extensivo de inseticidas sintéticos provocando resistência dos insetos e um grande risco à saúde humana.

Desde que o DDT e outros inseticidas sintéticos passaram a ser utilizados em programas de erradicação da malária, observou-se o controle do vetor com sucesso em diferentes partes do mundo. Entretanto, em algumas localidades da Ásia e da América Latina, onde a malária esteve próxima da erradicação, foram registradas evidências de seu ressurgimento. No Brasil o uso do DDT foi proibido desde 1985 (WHO, 1986; OPS, 1986). A contínua aplicação dos inseticidas, em larga escala, levou as espécies de *Anopheles* a desencadearem o processo de resistência aos diferentes inseticidas, em diversos lugares do mundo. O primeiro caso foi observado em 1951, com *A. sacharovi*, na Grécia. A OMS, em 1958, listou 18 espécies resistentes ao DDT em todo o mundo (BROWN, 1986).

## 1.8 PRODUTOS NATURAIS NO CONTROLE DE INSETOS

A busca de novos inseticidas de origem vegetal tem sido incentivada pela própria população que acredita que os produtos naturais são menos agressivos, e tóxicos ao meio ambiente que os sintéticos. De uma forma geral, os inseticidas naturais não são persistentes, ou seja, degradam-se com maior velocidade que os sintéticos; não deixando resíduos no alimento ou no ambiente (FERREIRA, 2001).

Nessa busca por novas alternativas de combate aos insetos vetores, substância extraídas de plantas têm recebido especial atenção. Vários estudos vêm sendo realizados com plantas como forma de controle de espécies de mosquitos. (PIZZARRO *et al.*, 1999; AGUILERA *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2004; CAVALCANTI *et al.*, 2004; SIMAS *et al.*, 2004).

Para um inseticida natural ser comercialmente viável, ele não pode ser apenas eficaz, mas deve preencher uma série de requisitos, como: seletividade contra inimigos naturais (baixa toxicidade ambiental), baixa toxicidade em mamíferos, biodegradabilidade e ausência de fitotoxicidade. Entre os critérios práticos que devem ser preenchidos, tem-se: fonte de matéria-prima abundante, baixo custo, facilidade para padronização dos compostos ativos em variedades naturais da planta-fonte e potencial para patentear a tecnologia de obtenção dos compostos inseticidas. Esses inseticidas têm amplo espectro de atividade e exterminam indiscriminadamente insetos considerados pestes como também aqueles benéficos ao homem (FERREIRA, 2001). Um exemplo de inseticida natural amplamente utilizado é o óleo de Nim, extraído da espécie *Azadirachta indica* A. Juss., da família Meliaceae, sendo este um inseticida biodegradável, com ação repelente, inibidor alimentar, acaricida, fungicida, nematicida, reguladora do crescimento e inseticida (MARTINEZ, 2002).

As plantas contêm inseticidas naturais que são encontrados predominantemente em moléculas do metabolismo secundário produzidas por elas mesmas contra o herbivorismo dos insetos. Roark, em 1947, publicou uma revisão voltada para a agricultura onde foram descritas 1200 espécies de plantas que apresentaram um grande potencial inseticida. Este estudo deu suporte a um

grande espectro de substâncias de origem botânica que contêm moléculas bioativas contra fungos, nematódeos, ácaros, insetos e células carcinogênicas.

## 1.9 CARACTERÍSTICAS GERAIS DA FAMÍLIA PIPERACEAE E DO GÊNERO *Piper*

A flora brasileira, em particular da região Amazônica, é caracterizada pela sua alta diversidade. Em todo o Brasil, há 40-50 mil espécies de plantas e somente 10% dessas foram estudadas, onde cerca de 2.000 são usadas na medicina popular. Dentre essa diversidade de plantas, a família Piperaceae é notável pelo seu largo uso na medicina popular (DI STASI *et al.*, 1994).

Segundo o sistema taxonômico de Cronquist de 1988 (RIBEIRO *et al.*, 1999; AGAREZ, RIZZINI E PEREIRA, 1994; WEBERLING E SHWANTES, 1986), a família Piperaceae está classificada de acordo com a tabela 1.

Tabela 1. Taxonomia da Família Piperaceae.

<b>Categorias</b>	<b>Táxon</b>
Divisão	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida (Dycotiledoneae)
Subclasse	Magnoliideae
Superordem	Nymphaeiflorae
Ordem	Piperales
Família	Piperaceae
Gêneros	<i>Arctotonia</i> , Trel. <i>Macropiper</i> Miq. <i>Manekia</i> Trel. <i>Peperomia</i> Ruiz & Pav. <b><i>Piper</i> L.</b> <i>Pothomorphe</i> Miq. <i>Sarcorhachis</i> Trel. <i>Trianaeopiper</i> Trel. <i>Verhuellia</i> Miq. <i>Zippelia</i> Blume

**FONTE:** BRUMMITT, 1992 (Royal Botanic Gardens, Kew).

Quanto ao número de gêneros, há controvérsia nesta família. Existem fontes que reconhecem 8 gêneros (RIBEIRO *et al.*, 1999), 5 gêneros (SANTOS *et*

*al.*, 2001) e 10-12 gêneros (RORIG e POSER, 1991). Segundo BRUMMITT (1992) do Royal Botanic Gardens em Kew (Inglaterra) essa família apresenta 10 gêneros (Tabela 1). Os gêneros *Piper* L., *Peperomia* Ruiz & Pav, *Ottonia* Spreng., *Sarcorrhachis* Trel. e *Pothomorphe* Miq., ocorrem no Brasil (YUNCKER, 1973). As estimativas do número de espécies na família Piperaceae variam de cerca de 1.400 (MOREIRA, KAPLAN e GUIMARÃES, 1995; RODRIG e POSER, 1991) até 2.000 (EVANS, 1996; TUCKER, 1982), com distribuição em regiões pantropicais. Os quatro maiores gêneros são: *Piper*, *Peperomia*, *Sarcorrhachis* e *Ottonia* (PARMAR *et al.*, 1997).

O gênero *Piper* possui mais de 700 espécies distribuídas nos dois hemisférios, mas principalmente encontradas nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. As espécies dessa família podem apresentar folhas alternas, opostas, verticiladas ou basais, simples, inteiras, pecioladas, raramente sésseis, glabras ou pilosas, palmadas ou peninervadas, estípulas presentes, frequentemente apresentam glândulas contendo óleo aromático. Possuem caule comumente nodoso, feixe vascular marginal, às vezes disposto como nas monocotiledôneas e geralmente apresentam bainha recobrindo o caule (RIBEIRO *et al.*, 1999).



Figura 1. Arbusto da família Piperaceae do gênero *Piper*

A inflorescência é basicamente uma espiga pedunculada, simples, axilar ou terminal, solitária ou múltipla, oposta à folha, de comprimento variado, ocasionalmente numeroso e umbelado, organizado em um pedúnculo comum (RIBEIRO *et al.*, 1999; CRONQUIST, 1988). As flores são pequenas, sem perianto, unissexuadas ou hermafroditas, frequentemente esbranquiçadas ou

amareladas, raramente vermelhas ou escuras (AGAREZ, RIZZINI e PEREIRA, 1994; WEBERLING e SCHWANTS, 1986), protegidas por brácteas que são mais ou menos peltadas, glabras, pubescentes ou fimbriadas; possuem 1-10 estames (2-6 em espécies brasileiras) livres ou perto da base do ovário. O ovário apresenta de 2 a 5 carpelos, sésseis ou menos frequentemente com estiletes, 1 a 5 estigmas com formatos variados e 1 óvulo. Os frutos se apresentam na forma de drupas, carnosos ou secos, com sementes pequenas, endosperma, amplo perisperma e embrião diminuto (RIBEIRO *et al.*, 1999).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGAREZ, F.V.; RIZZINI, C. M.; PEREIRA, C. **Botânica: taxonomia, morfologia e reprodução chave para determinação das famílias**. 2ª. Ed. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural, p. 198, 1994.

AGUILERA, L. *et al.* **Efecto letal de myrtaceas cubanas sobre *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)**. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 55: 100-104, 2003.

ALVES, S. B. **Controle Microbiano de Insetos**. 2º ed. Capítulo 1 e 4. Editora FEALQ, Piracicaba – São Paulo. 407 p, 1998.

ALVES, S. B. & PEREIRA, R. M. **Distúrbios fisiológicos provocados por entomopatógenos**. In Alves, S. B. 1998 Controle Microbiano de Insetos. 2º ed. Capítulo 1 e 4. Editora FEALQ, Piracicaba – São Paulo. 39 p, 1998.

ATAL, C. K., DHAR, K. L. e SINGH, J. **The chemistry of Indian *Piper* species**. *Lloydia*, v. 38, n. 3, p, 256-264, 1975.

AULT, S. K. **Environmental management: a reemerging vector control strategy**. *American Journal of Tropical and Medicine Hygiene*, 50:35-49, 1994.

BARRETO, A. M. M. **Determinação de resíduos de mandioca organoclorados em feijão e farinha de mandioca vendidos nos supermercados de Goiânia, Salvador e Belém**. São Paulo: USP, 1975. Tese de mestrado, Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, 1975.

BOYD, M.F. **Epidemiology of malaria: factors related to the intermediate**.

BOYD, M.F. (ed) *Malariology*. W.B. Saunders, Phyladelphia. v. 1, p. 5, 1949.

BROWN, A. W. A. **Insecticide resistance in mosquitoes: a Pragmatic review.** *Journal of the American Mosquito Control Association*, v. 2, n. 2, p. 123-140, 1986.

BRUMMITT, R. M. **Vascular Plant Families and Genera.** *Royal Botanic Gardens*, Kew, p. 804, 1992.

CABIANCA, A. *et al.* **Introdução á malária e a doença no homem.** Disponível em: [http://estudmed.com.sapo.pt/trabalhos/malaria\\_0.htm](http://estudmed.com.sapo.pt/trabalhos/malaria_0.htm). Acesso: 19/03/2007, 2000.

CAMARGO, E.P. **Malária, maleita, paludismo.** *Ciência e Cultura* [on line]. Jan.mar. 2003, v. 55, n.01, [citado 03 de abril de 2006], p. 26-29. Disponível em: <http://www.cienciaecultura.bvs.br/scielo.php>.

CAVALCANTI, E.S.B. *et al.* **Larvicidal activity of essential oils from Brazilian Plants against *Aedes aegypti* L.** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 99: 541-544, 2004.

CRONQUIST, A. **The Evolution and Classification of Flowering Plants.** 2a. ed. Bronx: The New York Botanical Garden, p. 280-282, 1988.

CROSSKEY, R.W. **Old tools and new taxonomic problems in Bloodsucking insects.** In: SERVICE, M.W. (ed). *Biosystematics of Haematophagous Insects.* Oxford, Clarendon Press, pp. 1-18, 1988.

DI STASI, L. C. *et al.* **Medicinal plants popularly used in Brazilian Amazon.** *Fitoterapia*, v. LXV, n. 6, p. 529-540, 1994.

EL HAG, E.A. *et al.* **Toxic and growth retarding effects of three plant extracts *Culex pipiens* larvae (Diptera: Culicidae).** *Phytotherapy. Res.* 13, 388-392, 1999.

\_\_\_\_\_. 2001. **Effects of methanolic extracts of neem seeds on egg hatchability and larval development of *Culex pipiens* mosquitoes.** *Indian Veterinary Journal*, 78, 199-201.

EVANS, W.C. **Trease and Evans' Pharmacognosy.** 14<sup>a</sup> ed. London: WBSaunders Company, p. 38, 1996.

FERREIRA, J.T.B. **Produtos naturais no controle de insetos** / José Tércio B. Ferreira, Arlene G. Corrêa, Paulo Cezar Vieira. São Carlos: EduFSCar. 176p, 2001.

FORATTINI, O. P. **Entomologia Médica.** São Paulo: Fac. Hig. Saúde Publ. Da Univ. São Paulo. v. 1, 662p, 1962.

FORATTINI, O. P. **Culidologia Médica, vol.2: Identificação, Biologia, Epidemiologia.** São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2002.

GERMANI, J. C. **Estudos de produção de *Bacillus sphaericus* S2 com matérias-primas regionais e de avaliação da atividade larvicida.** Porto Alegre: UFRGS, 1993. Tese de Doutorado, Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1993.

HABIB, M. E. M. **Utilização de bactérias no controle de dípteras de importância médica.** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 84 (3): p. 31-34, 1989.

HAWORTH, J. **Malaria in man: its epidemiology, clinical aspects and control.** *Tropical Diseases Bulletin*, vol. 86, n. 10, p. R1-R66, 1989.

KIRTIKAR, K. R. e BASU, B. D. **Indian Medicinal Plants**, v. III, 2130, 1933.

JACOBSON, M. e CROSBY, D. G. **Naturally Occurring Inseticides** (Marcel Dekker), 144, 226, 1971.

LOIOLA, C.C.P. *et al.* **Malaria control in Brazil: 1965 to 2001.** *Revista Panamericana de Salud Publica*, v. 11, n. 4, p.235-244. ISSN 1020-4989, 2002.

MARTINEZ, A.F. **Inhibidores de síntesis de quitina: Control de poblaciones de mosquitos com productos biorracionales.** Ver. *Sociedad Entomológica Argentina*, 58: 232-237, 1999.

MARTINEZ, S.S. **O Nim – *Azadirachta indica* – um inseticida natural.** 2002. Disponível em: [http://www.iapar.br/zip\\_pdf/nim2.pdf](http://www.iapar.br/zip_pdf/nim2.pdf). Acessado em: 08/05/2007.

MEIRA, D.A. *et al.* **Malária no município de Humaitá, Estado do Amazonas, I. Alguns aspectos epidemiológicos e clínicos.** Ver. *Instituto de Medicina Tropical*, São Paulo, 22 (3): 124-134, 1980.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim Epidemiológico da Malária nº 01/2003. SVS, Brasília, 2003.** Disponível em:[http://drt2001.saude.gov.br/svs/epi/be\\_malaria\\_01\\_2003.pdf](http://drt2001.saude.gov.br/svs/epi/be_malaria_01_2003.pdf)>. Acesso em: 20/01/2006.

MORAN, E.F. **Developing the Amazon.** Indiana University Press, Bloomington. 202 p, 1981.

MOREIRA, M.S., KAPLAN, M.A.C. e GUIMARAES, E.F. **Constituintes químicos de *Piper solmsianum* C.DC. (Piperaceae).** *Revista Brasileira de Farmácia*, v. 74, n. 4, p. 106-109, 1995.

MORS, W. B.; RIZZINI, C. T. e PEREIRA, N. A. **Medicinal Plants of Brazil.** Medicinal Plants of the World. Michigan: Reference Publications, Inc., n. 6, p. 272-273, 2000.

NAKAJIMA, H. **Conference to health educators. In: Biomedical Science and the Third World: Under the Volcano** (B.R. Bloom & A. Cerami, eds.), New York: Annals of the New York Academy Sciences, v. 589, 1989.

NAJERA, J.; LIESE, B. & HAMMER, J.S. **Health Sector Priorities Review: Malaria.** Washington, DC: The World Bank, 1991.

OPS (Organización Panamericana de la Salud), 2004. **Informe de la Situación de los Programas de Malaria en las Américas:** baseado en dados de 2002.

PARMAR, V.S. *et al.* **Phytochemistry of the genus *Piper*.** *Phytochemistry.* 46, 597-673, 1997.

PESSOA, S. **Parasitologia médica.** (1ª ed.). Editora Guanabara, São Paulo – S.P., 1946.

PIZZARRO, A.,P.B. *et al.* **O aproveitamento do resíduo do sisal no controle de larvas de mosquitos.** *Revista da Sociedade Brasileirad de Medicina Tropical*, 32: 23-29, 1999.

REMME, J.H.F.; DE RAADT, P. & GODAL, T. **The burden of tropical diseases.** *Medical Journal of Australia*, 158:465-468, 1993.

RIBEIRO, J. E. L. da S. *et al.* **Flora da Reserva Ducke:** guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central. Manaus: INPA, DFID, p. 181, 1999.

ROARK, R.C. **Some promising insecticidal plants.** *Economic Botany*, 1:437 [Cited in: Curtis, C.F.; Lines, J.D.; Baolin, L.; Renz, A. Natural and synthetic repellents. 75-79. In: Curtis, C.F.;ed *Appropriate Technology in Vector Control* [Florida: CRS Press; 1990], 1947.

ROCHA, R.C. **Malária urbana: fatores entomológicos envolvidos na dinâmica de transmissão e controle na cidade de Coari-AM, Brasil.** Manaus: INPA, 2002. Dissertação de Mestrado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, 2002.

RORIG, L.R. & POSER, G.L.V. **Investigação fitoquímica em espécies de Piperaceae.** *Revista Brasileira de Farmácia*, v. 72, n. 1, p. 15-17, 1991.

RODRIGUES, R. M. **A Flora da Amazônia.** In:\_\_\_\_. Flora (nome, classificação científica e descrição detalhada dos arbustos, plantas, etc). Belém: CEJUP, cap. 2, p. 23-205, 1989.

RODRIGUES, I. B. **Controle de malária: Atividade larvicida de onze estirpes de *Bacillus sphaericus* contra *Anopheles nuneztovari*, *Anopheles darlingi* e *Anopheles braziliensis*.** Manaus: INPA, 1996. Dissertação de mestrado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, 1996.

RODRIGUES, I.B.; TADEI, W.P. e DIAS, J.M.C.S. **Larvicidal activity of *Bacillus sphaericus* 2362 against *Anopheles nuneztovari*, *Anopheles darlingi* e *Anopheles braziliensis* (Diptera: Culicidae).** *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 41 (2): 101-105, 1999.

SANTOS, P.R.D. *et al.* **Essential oil analysis of 10 Piperaceae species from the Brazilian Atlantic forest.** *Phytochemistry*, v. 58, n. 4, p. 547-551, oct. 2001.

SILVA, E.M.J. & MACHADO, S.R. **Estrutura e desenvolvimento dos tricomas secretores em folhas de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *regnellii* (Piperaceae).** *Revista Brasileira de Botânica*, 22(2): 117-124, 1999.

SILVA, H.H.G. *et al.* **Atividade larvica de taninos isolados de *Magonia pubescens* St. Hil. (Sapindaceae) sobre *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae).** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*: 37: 396-399, 2004.

SIMAS, N.K. *et al.* **Produtos naturais para o controle da transmissão da dengue – atividade larvica de *Myrozylon balsamum* (óleo vermelho) e de terpenóides e fenilpropanóides.** *Química Nova* 27: 46-49, 2004.

SIVEP. **Sistema de Vigilância Epidemiológica do Ministério da Saúde.** Disponível em: <http://www.sna.saude.gov.br/?id=2900>, 2006. Acesso em: 07/05/2006.

SUCEN. **Superintendência de Controle de Endemias.** Disponível em: [http://www.sucen.sp.gov.br/doencas/malaria/texto\\_malaria\\_pro.htm](http://www.sucen.sp.gov.br/doencas/malaria/texto_malaria_pro.htm), 2001. Acessado em: 05/07/2005.

SUSAM. **Relatório de Gestão de 1999.** Manaus p. 99-103, 1999.

TADEI, W.P. *et al.* **Estratificação de populações de Anopheles para preferências alimentares.** *Ciência e Cultura*, 38(7): 891, 1986.

TADEI, W.P. *et al.* **Biologia de Anofelinos Amazônicos.** XII Ocorrência de espécies de *Anopheles*, dinâmica da transmissão e controle da malária na zona urbana de Ariquemes (Rondônia). Ver. *Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 30, n.3, p.221-251, 1988.

TADEI, W.P. *et al.* **Incidência, distribuição e aspectos ecológicos de espécies de Anopheles (Diptera: Culicidae), em regiões naturais e sob impacto ambiental da Amazônia Brasileira.** In: Bases científicas para estratégias de preservação e desenvolvimento da Amazônia, Ferreira, E.J.G.; Santos, G.M.; Leão, E.L.M.; Oliveira, L.A., (Eds). Vol, 2. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus. P. 167-196, 1993.

TADEI, W.P. *et al.* **Ecologic observations on anopheline vectors of malaria in the brazilian Amazon.** *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 59(2): 325-335, 1998.

TADEI, W.P. & DUTARY-THATCHER, B. **Anopheles do subgênero Nyssorhynchus, vetores da malária na Amazônia brasileira.** *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, São Paulo, v. 42, n. 2, 2000.

TADEI, W.P. **Controle da malária na Amazônia. Anais/ Resumo da 7 Reunião Especial da SBPC [CD ROOM].** Manaus: Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, 1-6, 2001.

TADEI, W.P. & RODRIGUES, I.B. **Anais do 1º Congresso Brasileiro de Entomologia Médica [CD ROOM].** Manaus: Sociedade Brasileira de Entomologia. v. 1, p. 1-6 , 2002.

TADEI, W.P. *et al.* **O Papel da Entomologia no Controle da Malária.** In: X reunião Nacional de Pesquisa em Malária. *Revista Brasileira de Medicina Tropical*, v. 40 (Suplemento II), p. 22-26, 2007.

TAUIL, P.T. **Intervention possibilities on the biologic cycle of malaria towards endemism control.** *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 34, supl. 9, abr, p. S21-S23, 1992.

TUCKER, S.C. **Inflorescence and flower development in the Piperaceae III.** Floral ontogeny of *Piper*. *American Journal of Botany*, v. 69, n. 9, p. 1389-1401, 1982.

WARD, R.A. Culicidae. In: Hurlbert, S.H. & Villalobos-Figueroa, A. (eds.). ***Aquatic biota of Mexico, Central America and the West Indies***. San Diego, Ca., San Diego State University, 1982.

WEBERLING, F.; SCHWANTS, H. O. **Taxonomia Vegetal**. São Paulo: Pedagógica e Universitária, p. 64-65, 1986.

WHO. **World Malaria Report**. Global Malaria Situation. Disponível em: <http://www.who.int/wmr2005/html/1-1.htm>, 2005. Acesso em: 06 de fevereiro de 2006.

YUNCKER, T. G. **The Piperaceae of Brazil II:** Piper- group V; Ottonia, Pothomorphe; Sarcorrhachis. Hoehnea, Instituto de Botânica de São Paulo, p. 144-148, 1973.

## Capítulo 01

**Screening de plantas da família Piperaceae contra larvas de *Culex quinquefasciatus* (Say, 1823), *Anopheles nuneztovari* Gabaldón, 1940 e *Anopheles albitarsis* Lynch – Arribalzaga, 1878.**

## INTRODUÇÃO

A região Amazônica representa quase 60% do território brasileiro, possuindo uma das maiores biodiversidades do planeta, gerando assim grande interesse econômico na comunidade mundial, fazendo-se necessário um rápido avanço do conhecimento científico sobre a composição e ecologia das espécies endêmicas. Nesse contexto, considera-se o termo bioprospecção ou prospecção química, que é definido como método ou forma de localizar, avaliar e explorar legalmente a diversidade biológica, ou seja, seus recursos genéticos e bioquímicos de valor comercial usando para isso o conhecimento de comunidades indígenas ou tradicionais (PÉRET de SANT'ANA, 2002).

Ou ainda, de acordo com Enríquez (2005), define-se como: pesquisa de recursos biológicos e genéticos e dos conhecimentos a eles associados capaz de proporcionar benefícios para a humanidade, ao mesmo tempo em que auferir valor comercial para as indústrias química, farmacêutica, cosmética e alimentar, tendo como objetivo básico o descobrimento de organismos que possibilitem o desenvolvimento de novos produtos. Divide-se em três partes principais: inventário e coleta de amostras, preparação de extratos e determinação das propriedades.

Algumas vantagens podem ser destacadas no processo de bioprospecção tais como: conhecimento da biodiversidade e seu potencial, fornecendo com isso substâncias biológicas importantes para o homem, estudos sobre o meio ambiente ajudando na preservação e melhora o nível científico do país favorecendo o crescimento econômico (SANTOS, 2007). Quignard *et al.* (2003) afirmam que para muitas plantas não existe literatura relevante disponível para determinar as atividades biológicas, portanto estas devem ser encontradas usando métodos diretos como testes farmacológicos ou indiretos.

Em 1958 nos Estados Unidos, iniciou-se um programa de busca de substâncias anticancerígenas através do screening de 35 mil espécies de plantas pelo Instituto Nacional de Câncer (NCI) e pelo Departamento de Agricultura americanos. Na década de 60, pesquisadores encontraram na casca da árvore de “Yem” da espécie *Taxus brevifolia* L. do Pacífico, uma substância capaz de curar o câncer de mamas e de ovários, chamada taxol. A molécula descoberta pôde então

ser sintetizada em laboratório em 1971 e é utilizada atualmente no tratamento clínico de diferentes tipos de câncer (STEPHENSON, 2002).

O screening é uma das etapas mais importantes na descoberta de princípios ativos e é iniciado pela seleção de plantas. As principais formas de seleção são:

- Etnobotânica/Etnofarmacológica;
- Quimiosistemática;
- Aleatória (ramdômica);
- Ecologia química.

As duas primeiras são baseadas nas observações curativas ou medicinais de plantas na natureza ou para o homem. A quimiosistemática é aquela baseada na seleção de plantas por causa de sua constituição química e taxonômica. A aleatória ou ao acaso é aquela que não usa nenhuma dessas formas de seleção.

As espécies da família Piperaceae são importantes econômica e medicinalmente. O interesse pela química dessa família evoluiu bastante ao longo dos anos devido ao grande número de espécies estudadas e compostos isolados com importante valor farmacológico, listados em aproximadamente 600 compostos bioativos (PARMAR *et al.*, 1997). A química desta família revela que as espécies deste grupo se especializaram em produzir primordialmente amidas, fenilpropanóides, lignanas, neolignanas, ácido benzóico, esteróides, chalconas, flavonas e alcalóides (KATO & FURLAN, 2007; PARMAR *et al.*, 1997).

A tabela 1 mostra alguns exemplos de substâncias encontradas no gênero *Piper*, com suas atividades biológicas contra organismos danosos ao homem, especialmente mosquitos.

Tabela 1. Algumas espécies do gênero *Piper* e suas atividades biológicas contra mosquitos vetores de doenças tropicais.

<b>Espécies</b>	<b>Atividade biológica</b>	<b>Classe de substância ativa</b>	<b>Referência</b>
<i>P. aduncum</i> L.	<i>Aedes atropalpus</i> Coq.	Fenilpropanóide	Bernard <i>et al.</i> , 1995.
<i>P. falconeri</i>	<i>Musca domestica</i> L. <i>Aedes aegypti</i> L..	Amida	Parmar <i>et al.</i> , 1993.
<i>P. guanacastensis</i>	<i>Aedes atropalpus</i> Coq.	Derivado do ácido benzóico	Bernard <i>et al.</i> , 1997
<i>P. longum</i>	<i>A. aegypti</i> L.	Alcalóide	Yang <i>et al.</i> , 2002
<i>P. nigrum</i> L.	<i>A. togoi</i> Theob. <i>A. aegypti</i> L. <i>Culex pipiens pallens</i> L	Amidas	Park <i>et al.</i> , 2002
<i>P. fimbriulatum</i>	<i>Aedes aegypti</i> L.	Lignana	Solis <i>et al.</i> , 2005
<i>P. nigrum</i>	<i>A. aegypti</i> <i>Anopheles stephensi</i> Liston	Amidas	Siddiqui <i>et al.</i> , 2005

A pressão seletiva de inseticidas convencionais está aumentando a resistência das populações de mosquitos em uma taxa alarmante (BROWN, 1986), com isso há um aumento no desenvolvimento de novos produtos seguros, com alvos específicos e degradáveis. Inseticidas naturais como os piretróides,

rotenona e nicotina, dentre outros, têm sido extensivamente usados para o controle de mosquitos (BALANDRIN, 1985).

Para o desenvolvimento desses novos produtos de origem vegetal observam-se vantagens e desvantagens. Como vantagens podem-se citar o grande número de espécies pouco estudadas da flora brasileira, o conhecimento popular e científico agregados a estas, a disponibilidade de tecnologia e o interesse empresarial neste ramo. Por outro lado, há a destruição do meio ambiente em ritmo acelerado, migrações de populações indígenas ocasionando a perda do conhecimento etnobotânico das espécies vegetais que se quer estudar, além da falta de fiscalização sanitária para os produtos vendidos ou distribuídos no mercado brasileiro (FERREIRA *et al.*, 1998).

No contexto para se tentar descobrir um novo produto de origem vegetal, com efeito larvicida, fez-se um screening de oito espécies de plantas da família Piperaceae, pertencentes ao gênero *Piper*, avaliando a efetividade larvicida de diferentes partes (galho, folha, raiz e fruto) contra larvas de *C. quinquefasciatus*, *Anopheles nuneztovari* e *A. albitarsis*.

A redução dos criadouros de imaturos é ideal para o controle de mosquitos, pois estes estão em áreas definidas e são eliminados antes de atingirem o estágio adulto, responsável pela transmissão da doença (MALARIA, 2006; TADEI *et al.*, 2007).

Extratos de plantas apresentam potenciais fontes larvicidas naturais para o controle de mosquitos vetores sendo revisadas na publicação de Sukamar *et al.* (1991) onde foram identificadas mais de 300 espécies de plantas com esta característica. Outros estudos de atividade larvicida de extratos de plantas para larvas de *Aedes* sp. de diferentes partes do mundo, como a América do Norte (BERGERON *et al.*, 1996), Argentina, Bolívia Brasil e Peru (CHANTRAINE *et al.*, 1998; CICCIA *et al.*, 2000; MACEDO *et al.*, 1997) Trinidad e Tobago (CHARIANDY *et al.*, 1998), Mali (DIALLO *et al.*, 2001) e África (MARSTON *et al.*, 1993), entre outros, foram publicados e revelaram exemplos numerosos princípios ativos em diversos grupos taxonômicos.

Extratos etanólicos de exocarpos de *Ginkgo biloba* L. (Ginkgoaceae) mostraram efeito larvicida contra *C. pipiens pallens* de acordo com Don *et al.*, (2006). Gusmão *et al.* (2002) observaram que extratos metanólicos da raiz e da casca da árvore de *Derris urucu* KILLIP *et* SMITH (Leguminosae) foram efetivos contra larvas de *A. aegypti*, numa concentração de 250 µg/mL.

Na procura de produtos naturais que podem ser usados para o controle vetorial de doenças tropicais, 23 extratos de plantas medicinais do nordeste brasileiro foram testadas em atividade moluscicida contra *Biomphalaria glabrata* Say, e em atividade larvicida contra *A. aegypti* e *Artemia salina* L. Dentre as espécies testadas, o extrato da folha de *P. arboreum* Aubl., na concentração de 500 µg/mL, foi avaliada, não apresentando resultados satisfatórios contra larvas de *A. aegypti* e *B. glabrata*. Mas para *A. salina*, o extrato mostrou uma mortalidade de 83% (LUNA *et al.*, 2005).

Bernard *et al.* (1995) compararam o extrato alcoólico de folhas de dezesseis espécies de *Piper* e o extrato de *P. aduncum* L. apresentou a maior atividade inseticida, com 92% de eficiência no controle de larvas de 2º estágio de *A. atropalpus* à concentração de 1 ppm (ou 1 µg/mL). O extrato metanólico do fruto de *P. longum* L. apresentou 100% de mortalidade contra larvas de *A. aegypti*, observada no trabalho de Yang *et al.* (2002).

O gênero *Piper* é descrito como: arbustos, subarbustos ou arvoretas, geralmente variando entre 1 a 10 m de altura, mais ou menos lignificados, ramosos, não raro nodosos. Folhas alternas, forma e tamanho variáveis. Espigas opostas às folhas, pedunculadas; raque sulcada, lisa, papilosa ou fimbriada; bractéolas variando em forma e tamanho, às vezes côncavas, concheiformes, não raro cuculadas, glabras, pilosas ou fimbriadas. Flores aperiantadas, densamente congestas ou laxas. Estames 2 a 5. ovário de forma variável, glabro ou apresentando tricomas; estigmas 3, raro 2 a 4, sésseis ou não, persistentes no fruto. Drupas de forma variável, com pericarpo pouco espessado (GUIMARAES e GIORDANO, 2004).

As oito espécies estudadas deste gênero são: *P. hostmanianum* Miq., *P. dilatatum* Rich. e *P. tuberculatum* Jacq, *P. amapense* Yunck, *P. cyrtopodon* C. DC., *P. capitarianum* Yunck, *P. baccans* (Miq.) C. DC. e *P. erectipillum* Yunck.

## 1 DESCRIÇÃO DAS ESPÉCIES

*Piper hostmanianum* é um arbusto com folhas de bases irregulares. Frequentemente encontrada em platôs da Amazônia brasileira. *Piper baccans* é um subarbusto com folhas maleáveis com pubescência levemente esbranquiçada. Também freqüente em platôs. *Piper cyrtopodon* de aspecto arbustivo com folhas variáveis de elípticas a cordadas, com brilho e característica semi-suculenta e muito pubescente. Apresenta pêlos macios. A estípula persiste somente nos ramos muito jovens. *Piper erectipillum*: arbusto, folhas subsésseis, semi-coriáceas com estípulas visíveis na base das folhas. *Piper amapense*: arbusto, com folhas amplamente ovalada e venação secundária esparsada. Presente em vertente. (RIBEIRO *et al.*, 1999).

*Piper tuberculatum*: trepadeira, caule nodoso; folhas oval-alongadas, de base desigual; flores miúdas, em espigas roliças; fruto pequenino, baga angulosa (PIO CORRÊA, 1974). *Piper dilatatum*: Arbusto com 1 a 2 cm de altura, de pubescente e glabrescente; ramos estriados. Folhas com bainha abaixo da porção mediana do pecíolo, esse com 0,5 a 1 cm de comprimento; lâmina rômbrica ou elíptica, às vezes obovada ou ovada, 11 a 21 x 7,5 a 10,5 cm de largura, base assimétrica, cordada, obtusa ou aguda, ápice acuminado ou falcado, membranácea, escabrosa, crespo-pubescente e glabrescente na face adaxial; nervuras secundárias 5 a 6, ascendentes, geralmente puberulentas, dispostas até a porção mediana da principal. Espigas retas ou curvas, obtusas ou apiculadas, 6,5 a 12 cm de comprimento; pedúnculo, 1 a 2 cm de comprimento, de glabro a pubescente; bractéolas arredondado-peltadas, fimbriadas na margem. Estames 4. Drupa obpiramidal-trigonal, papiloso-puberulenta no ápice, 3 estigmas sésseis (GUIMARAES e GIORDANO, 2004).

*Piper capitarianum*: arbusto de 1.20 a 1.50 m de altura, flores brancas, inflorescência verde, espiga para cima (MARTINIANO e MOURA, 2003; TEIXEIRA *et al.*, 1983 e VIEIRA *et al.*, 1979).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 GERAL

- Avaliar a atividade larvicida de extratos de espécies da família Piperaceae contribuindo para a implementação de medidas de controle vetorial na região.

### 2.2 ESPECÍFICOS

- Screening de extratos metanólicos de diferentes espécies da família Piperaceae em larvas de *Culex quinquefasciatus* e *Anopheles* sp;
- Obter a concentração letal mediana (CL<sub>50</sub>) dos extratos mais ativos para as larvas de *Anopheles nuneztovari* e *A. albitarsis* e comparar a atividade larvicida.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 MATERIAL VEGETAL

O material vegetal das espécies de *Piper* foi coletado em dois locais: *Piper hostmanianum*, *P. dilatatum* e *P. tuberculatum*, foram coletadas no campus principal do INPA – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, em Manaus, capital do Amazonas. As demais espécies, *P. amapense*, *P. cyrtopodon*, *P. capitarianum*, *P. baccans* e *P. erectipillum*, foram coletadas na Reserva Adolpho Ducke que está situada na periferia de Manaus, coordenadas 02° 53' de latitude S e 59° 58' de longitude W. O acesso à estação científica se dá pela rodovia AM 010 (Manaus-Itacoatiara) no km 26.

Utilizaram-se as diferentes partes das espécies vegetais: galho, raiz, folha e frutos de diferentes épocas de maturação.



Figura 1. Frutos de *P. tuberculatum* em diferentes épocas de maturação (grande, médio e pequeno).

#### 3.2 EQUIPAMENTOS

- Balança Analítica Ohaus Adventurer AR2140;
- Banho de ultra-som Unique USC 1400;
- Banho de ultra-som Bransonic 1510R-MT;

- Transferidor automático de soluções Eppendorf Varispenser plus;
- Micropipetadores automáticos Eppendorf (P50 e P1000);
- Extrator Soxhlet Fisatom;
- Moinho de facas tipo Willye, TE – 650 Tecnal;
- Evaporador rotativo Fisatom 802, modelo 550;
- Vidraria diversa.

### 3.3 SECAGEM DO MATERIAL VEGETAL

O material vegetal passou pelo processo de secagem ao ar, nas dependências do laboratório da CPPN do INPA. Utilizou-se para auxiliar na secagem a estufa com temperatura controlada a 60° C. Depois de seco, o material foi moído em moinho de facas utilizando peneira com Mesh 30, para a obtenção das serragens.

Os extratos utilizados fazem parte do Banco de Extratos do grupo de pesquisa do Dr. Sergio Nunomura. Esses foram obtidos a partir de um procedimento padronizado de extração que envolve a extração do material previamente moído e seco, em aparelhagem do tipo Soxhlet por 18 h com metanol, substituindo o solvente extrator a cada 6 h.

Para os extratos de frutos de *P. tuberculatum*, a extração seqüencial ocorreu em extrator do tipo Soxhlet, seguindo a ordem de polaridade dos solventes: hexano, clorofórmio, metanol e água, por 4 h cada extrato, em separado. Os solventes utilizados foram destilados anteriormente. Ao final, os extratos são reunidos, concentrados em evaporador rotativo, sob pressão reduzida e armazenados em frascos âmbar codificados em freezer a -21°C.

### 3.4 OBTENÇÃO DE *Culex quinquefasciatus*

#### 3.4.1 Obtenção dos ovos

Os ovos foram obtidos a partir de coletas feitas no campus do INPA. Em pequenos baldes foram deixadas folhas e água para que as fêmeas colocassem seus ovos. A identificação dos ovos de *Culex* é característica de ovos em jangada (Figura 2).



Figura 2. Ovos em jangada de *C. quinquefasciatus*.

#### 3.4.2 Obtenção das larvas

Os ovos foram coletados e colocados em cubas metálicas com água de torneira para que pudessem eclodir no insetário do laboratório de Malária e Dengue no INPA. Após a eclosão, as larvas foram alimentadas com uma mistura de farinha de peixe e pó de fígado. Quando as larvas atingiram o 3º estágio (Figura 3), pôde-se usá-las nos bioensaios.



Figura 3. Larvas de *C. quinquefasciatus* em 3º estágio. FONTE: [pt.wikipedia.org/wiki/Culex](http://pt.wikipedia.org/wiki/Culex)

### 3.5 OBTENÇÃO DE *Anopheles* sp

#### 3.5.1 Coleta de adultos

A coleta dos adultos de *Anopheles* sp (Figura 4) foi feita nos arredores da cidade de Manaus - AM, no bairro de Puraquequara, no sítio Santa Helena, próxima a currais bovinos. Os mosquitos foram coletados, já ingurgitados, com o auxílio de um capturador manual entomológico, entre 18:00 a 20:00 h, e colocados em copos parafinados e telados. Cada copo continha 50 mosquitos. Estes foram transportados em caixas térmicas até o Laboratório de Malária e Dengue, da CPCS, localizado no Instituto de Pesquisas da Amazônia – INPA.



Figura 4. Coleta de adultos de *Anopheles* sp, próxima a currais bovinos, com o auxílio de um capturador manual entomológico.

Em laboratório, os mosquitos foram transferidos individualmente, para copos plásticos individuais de 100 mL, forrados com um chumaço de algodão e papel filtro no fundo (Figura 4).



Figura 4. Copos plásticos individuais para a oviposição das fêmeas de *Anopheles* sp.

Estes copos também foram telados e umidificados para que as fêmeas colocassem seus ovos (Figura 5).



Figura 5. Ovos de *Anopheles* depositados em papel filtro. Fonte: C, F.M (2006).

### 3.5.2 Obtenção de larvas de *Anopheles* sp

Após a oviposição, cada mosquito foi identificado em laboratório de acordo com a chave taxonômica de Gorhan (1967) para a confirmação da espécie. Os ovos foram transferidos para novos copos plásticos de 100 mL, contendo papel filtro e água para não desidratá-los.

Posteriormente à eclosão dos ovos, as larvas foram mantidas em cubas metálicas com água de poço artesiano e alimentadas com uma mistura de pó de fígado e farinha de peixe até atingirem o 3º estágio para serem usadas nos testes biológicos (bioensaios) (Figura 6). Usaram-se larvas de 3º estágio por serem mais resistentes.



Figura 6. Larva de *A. nuneztovari* em 3º estágio. FONTE: C, F.M.

### 3.6 BIOENSAIOS

Os bioensaios tanto para *C. quinquefasciatus* e *Anopheles* sp, foram montados com as mesmas características, de acordo com Meyer, *et al.* (1982).

Utilizaram-se copos descartáveis de 50 mL, em triplicatas, contendo 10 mL de água destilada medidos com transferidor automático. Foram colocadas em cada copo 10 larvas. Adicionou-se mistura de pó de fígado e farinha de peixe em pó para a alimentação dos indivíduos.

Os extratos foram pesados em balança analítica e dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO), com auxílio de banho de ultra-som para a total solubilização. Os testes foram feitos em triplicata (Figura 7).



Figura 7. Bioensaio da atividade larvicida.

Para os testes iniciais do screening, a concentração adotada para todos os extratos foi de 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Os extratos foram adicionados com auxílio de uma pipeta automática com um volume fixo de transferência de 50  $\mu\text{L}$ .

A observação da mortalidade do bioensaio foi feita 24 h após a aplicação do extrato, contando o número de larvas mortas. Após a observação as larvas vivas são descartadas, jogando-as na terra para evitar a proliferação de mosquitos.

### 3.7 DETERMINAÇÃO DA CL<sub>50</sub>

Para o cálculo da CL<sub>50</sub> dos extratos ativos, os valores das concentrações foram transformados em logaritmos decimais Litchfield and Fertig (1941) e as porcentagens das mortalidades transformadas em valores de Probit (Finney, 1971). Esses valores foram plotados em gráficos, onde se calculou a regressão linear dos pontos para determinar o valor da CL<sub>50</sub> (Probit=5) e a confiabilidade dos resultados.

Equação de reta do tipo:  $y = ax + b$ , onde

y = valores das mortalidades transformados em Probit

x = valores das concentrações em logaritmos

a e b = coeficientes variáveis

Este tipo de análise permite determinar a relação positiva ou negativa existente entre as variáveis dependente (y) e independente (x) (MOTTA e WAGNER, 2003).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 SCREENING DAS ESPÉCIES DE *Piper*

Na tabela 1 estão os resultados do screening de extratos metanólicos de espécies de *Piper* com a porcentagem de mortalidade para duas espécies de mosquitos: *Anopheles* sp e *Culex quinquefasciatus*, na concentração-teste inicial de 250 µg/mL, após 24 h.

Tabela 1. Porcentagem de mortalidade de *Culex quinquefasciatus* e *Anopheles* sp. de diferentes extratos metanólicos de *Piper* a 250 µg/mL.

Parte da planta	Espécies de <i>Piper</i>	<i>Anopheles</i> sp	<i>Culex quinquefasciatus</i>
Folha	<i>Piper amapense</i>	47	13
Galho	<i>Piper amapense</i>	0	0
Raiz	<i>Piper amapense</i>	2	63
Folha	<i>Piper baccans</i>	0	0
Galho	<i>Piper baccans</i>	1	0
Folha	<i>Piper capitarianum</i>	40	6
Galho	<i>Piper capitarianum</i>	0	10
Raiz	<i>Piper capitarianum</i>	1	40
Folha	<i>Piper cyrtopodon</i>	1	0
Raiz	<i>Piper cyrtopodon</i>	53	7
Galho	<i>Piper cyrtopodon</i>	0	0
Galho	<i>Piper dilatatum</i>	50	0
Raiz	<i>Piper dilatatum</i>	1	0
Folha	<i>Piper dilatatum</i>	0	26
Folha	<i>Piper erectipillum</i>	0	0
Raiz	<i>Piper erectipillum</i>	1	33
Galho	<i>Piper erectipillum</i>	0	13
Galho	<i>Piper hostmanianum</i>	47	20
Folha	<i>Piper hostmanianum</i>	0	36
Fruto	<i>Piper tuberculatum</i>	100	100
Galho	<i>Piper tuberculatum</i>	100	100
Folha	<i>Piper tuberculatum</i>	100	100

Os resultados mostraram que a espécie *Piper tuberculatum* foi a mais ativa contra as larvas de *C. quinquefasciatus* e *Anopheles* sp. Os extratos metanólicos da folha, do galho e do fruto dessa planta, na dose de 250 µg/mL mataram 100% das larvas de terceiro estágio de *C. quinquefasciatus* e *Anopheles* sp. em 24 horas. Estes resultados foram similares àqueles observados anteriormente pelo grupo de pesquisa para *Aedes aegypti* (Pohlit *et al.*, 2004).

Quignard *et al.* (2003) observaram que *P. tuberculatum* e *Minqartia guianensis* foram as espécies mais ativas contra larvas de *Artemia salina* numa concentração de 500 µg/mL.

Navickiene *et al.* (2007) afirmaram que extratos de sementes, folhas e galhos de *P. tuberculatum* possuem atividade inseticida contra *Anticarsia gemmatilis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), matando 100% das lagartas, observando que o extrato da semente foi o mais efetivo.

Extratos das espécies *Piper amapense* (raiz), *P. capitarianum* (raiz), *P. erectipillum* (raiz) e *P. hostmanianum* (folha) apresentaram atividade larvicida moderada (de 30 a 60% de mortalidade) para *C. quinquefasciatus*. Para *Anopheles* spp, as espécies que apresentaram atividade fraca foram: *P. amapense* (folha), *P. capitarianum* (folha), *P. cyrtopodon* (raiz), *P. dilatatum* (galho) e *P. hostmanianum* (galho) em 24 h. Os demais extratos apresentaram baixa porcentagem de mortalidade para esses insetos alvo.

O extrato da raiz de *Piper amapense* apresentou um efeito larvicida maior que os extratos da folha e do galho respectivamente para *C. quinquefasciatus*. Contudo, para *Anopheles* spp, o extrato da folha foi mais ativo que os extratos da raiz e do galho, nesta ordem.

*Piper baccans* apresentou o mesmo efeito para os dois extratos (galho e folha) em *C. quinquefasciatus*. Em *Anopheles* spp, o extrato do galho foi mais ativo que o extrato da folha.

A atividade dos extratos *Piper capitarianum* em *C. quinquefasciatus* deu-se seguindo a ordem decrescente: raiz, galho e folha. Em *Anopheles* spp, o extrato mais ativo foi da folha, seguido por raiz e galho.

*P. cyrtopodon* e *P. erectipillum* expuseram o mesmo resultado para os dois gêneros de mosquitos: o extrato da raiz foi mais efetivo que galho e folha.

O extrato do galho de *P. dilatatum* foi mais ativo que raiz e folha, em *Anopheles* sp. Em *Culex quinquefasciatus* a folha apresentou melhor resultado que raiz e galho.

O extrato do galho de *P. hostmanianum* em larvas de *C. quinquefasciatus* foi mais efetivo que folha. O resultado em *Anopheles* sp foi o oposto.

O extrato da raiz de *P. amapense* apresentou um efeito larvicida maior que os extratos da folha e do galho respectivamente para *C. quinquefasciatus*. Contudo, para *Anopheles* spp, o extrato da folha foi mais ativo que os extratos da raiz e do galho, respectivamente.

*P. baccans* apresentou o mesmo efeito para os dois extratos (galho e folha) em *C. quinquefasciatus*. Em *Anopheles* spp, o extrato do galho foi mais ativo que o extrato da folha.

Na concentração teste inicial, os extratos de *P. tuberculatum* (fruto, galho e folha) mostraram-se iguais para os dois gêneros de mosquitos, observando-se 100% de mortalidade dos indivíduos. Em virtude desses resultados, decidiu-se por determinar a atividade larvicida pela determinação da concentração letal mediana (CL<sub>50</sub>) tanto para larvas de *Anopheles nuneztovari* e *A. albistarsis*.

Foram avaliados:

- 1) Extratos metanólicos obtidos de diferentes partes da espécie *P. tuberculatum*;
- 2) Diferentes extratos obtidos de frutos de *P. tuberculatum*;
- 3) Extratos metanólicos obtidos de frutos de *P. tuberculatum* com diferentes estágios de crescimento.

## 4.2 CONCENTRAÇÃO LETAL MEDIANA (CL<sub>50</sub>) DOS EXTRATOS DE *P. tuberculatum* PARA LARVAS DE *Anopheles nuneztovari*

Os extratos obtidos de frutos foram os mais ativos, resultado semelhante observado por Navickiene *et al.* (2003) para lagartas de *Anticarsis gemmatalis*.

Tabela 2. Valores de CL<sub>50</sub> de diferentes partes da espécie *P. tuberculatum* para as larvas de *A. nuneztovari*.

Parte da planta	CL <sub>50</sub> (µg/mL)	n	R <sup>2</sup>	Faixa de concentração (µg/mL)
Extratos metanólicos				
Fruto	48,2	5	0,9509	15,62 a 250,00
Galho	87,3	3	0,8533	15,62 a 250,00
Folha	96,3	5	0,9552	15,62 a 250,00

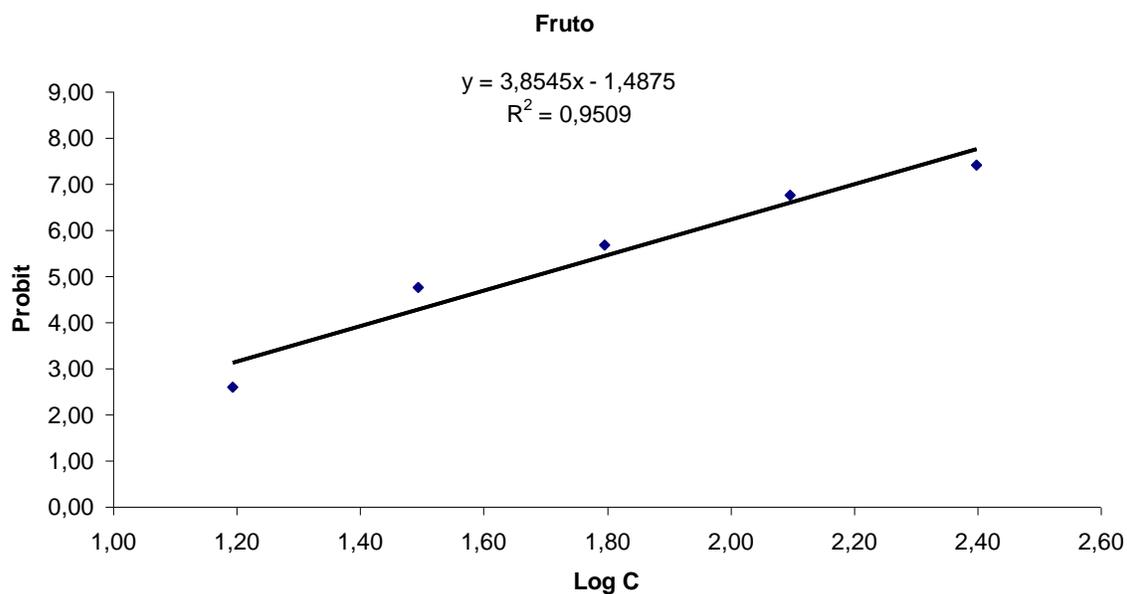


Gráfico 1. Determinação da CL<sub>50</sub> do extrato metanólico de fruto em *A. nuneztovari*.

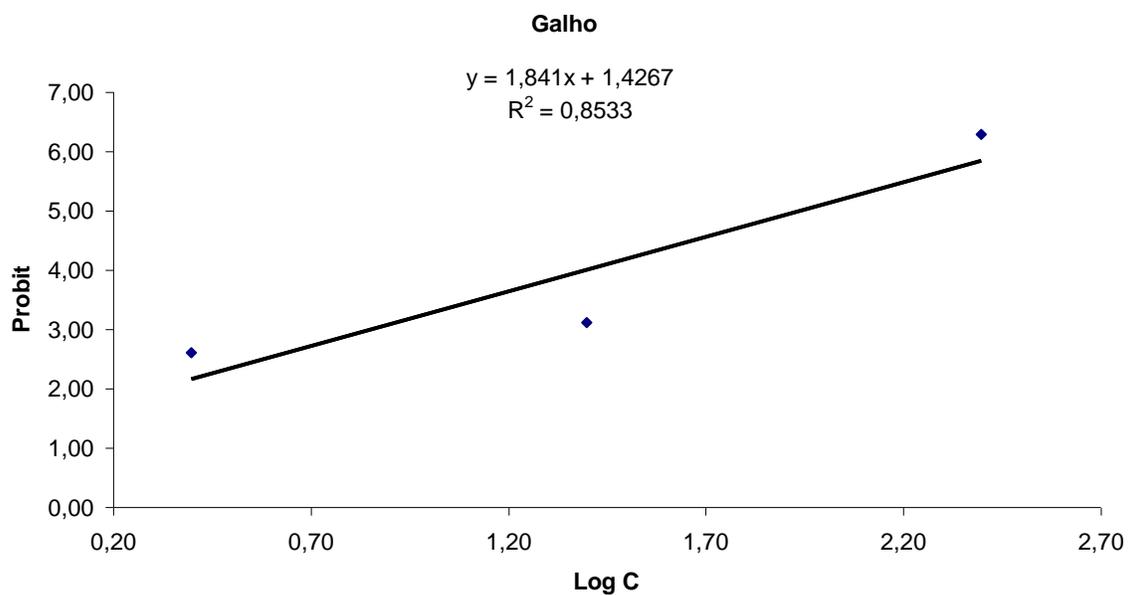


Gráfico 2. Determinação da  $CL_{50}$  do extrato metanólico de galho em *A. nuneztovari*.

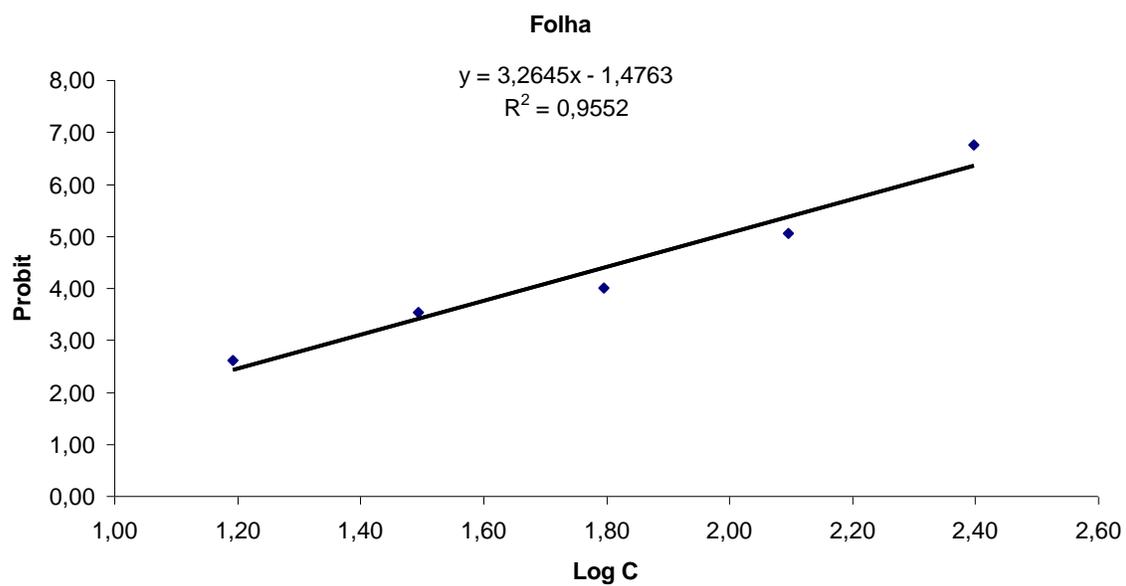


Gráfico 3. Determinação da  $CL_{50}$  do extrato metanólico de folha em *A. nuneztovari*.

Tabela 3. Valores de CL<sub>50</sub> de diferentes extratos do fruto de *P. tuberculatum* para larvas de *A.nuneztovari*

Diferentes extratos de fruto	CL <sub>50</sub> (µg/mL)	n	R <sup>2</sup>	Faixa de concentração (µg/mL)
Hexânico	4,0	3	1	20 a 0,80
Clorofórmico	8,7	3	0,8484	20 a 0,80
Metanólico	30,4	3	0,9526	50 a 12,5
Aquoso	506,3	4	0,9924	125 a 1000

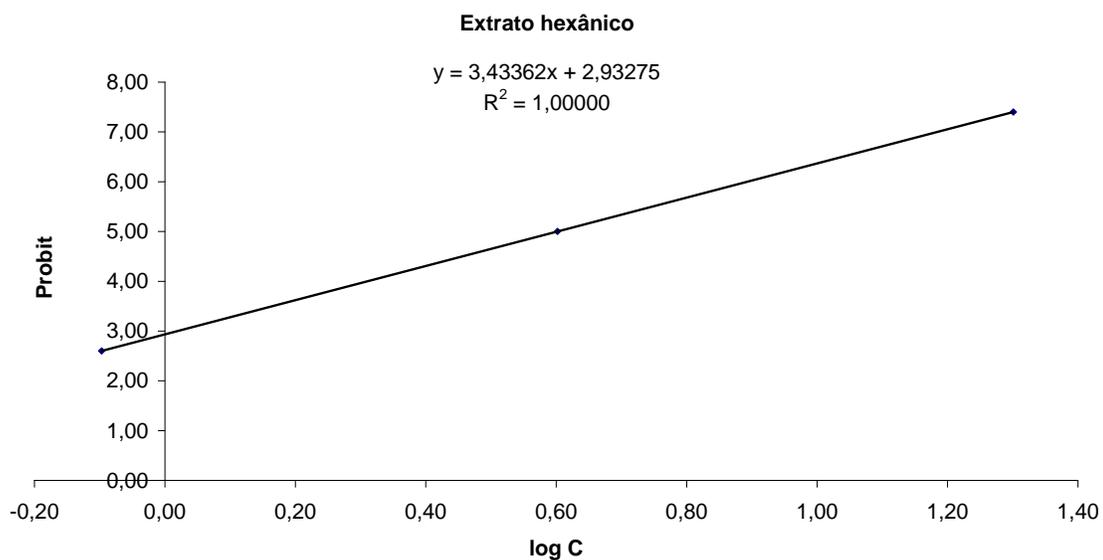


Gráfico 4. Determinação da CL<sub>50</sub> do extrato hexânico em *A. nuneztovari*.

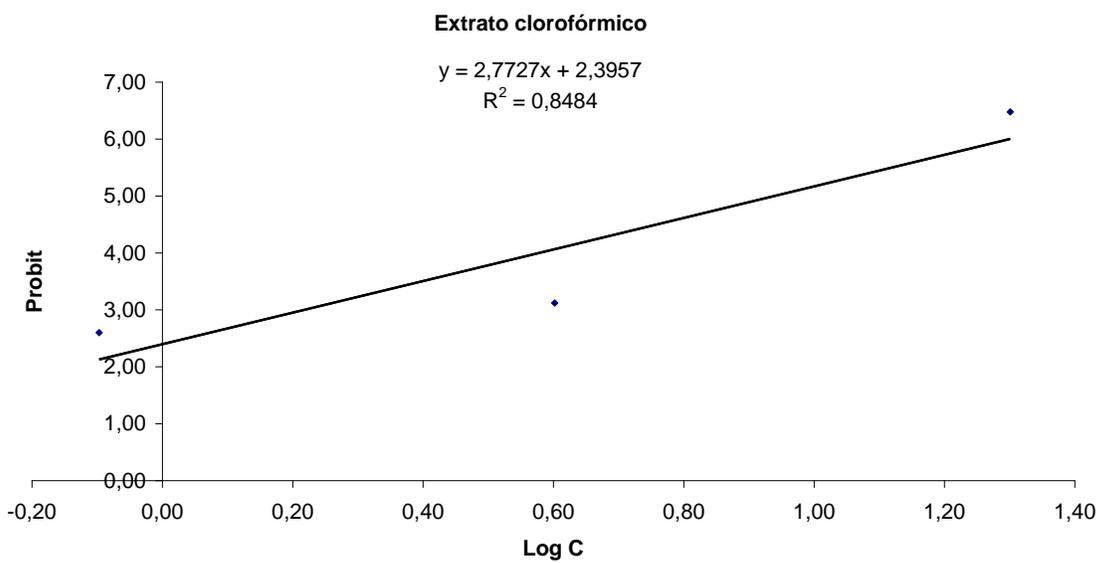


Gráfico 5. Determinação da  $CL_{50}$  do extrato clorofórmico em *A. nuneztovari*.

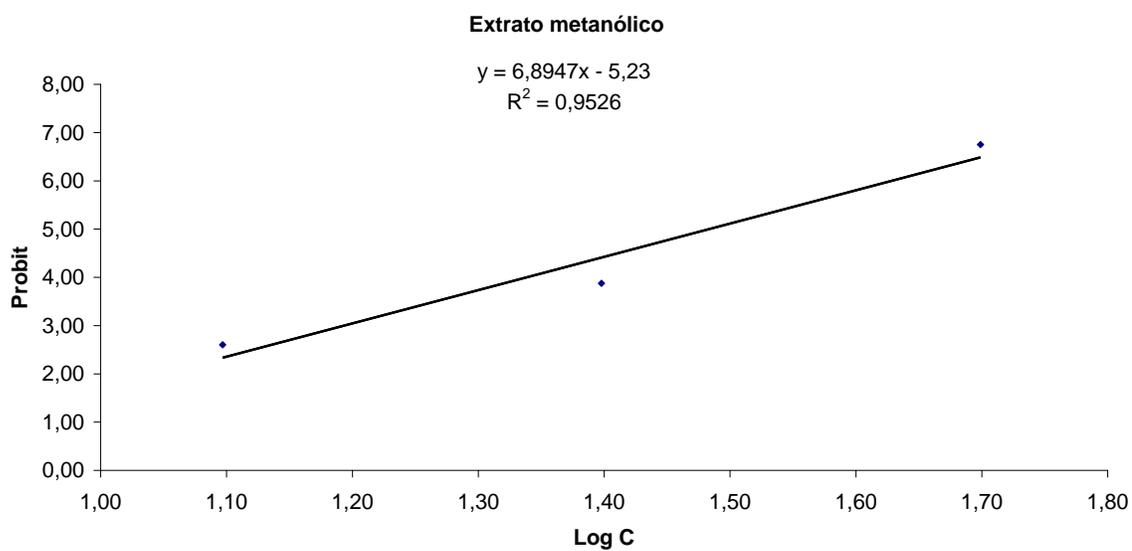


Gráfico 6. Determinação da  $CL_{50}$  do extrato metanólico em *A. nuneztovari*.

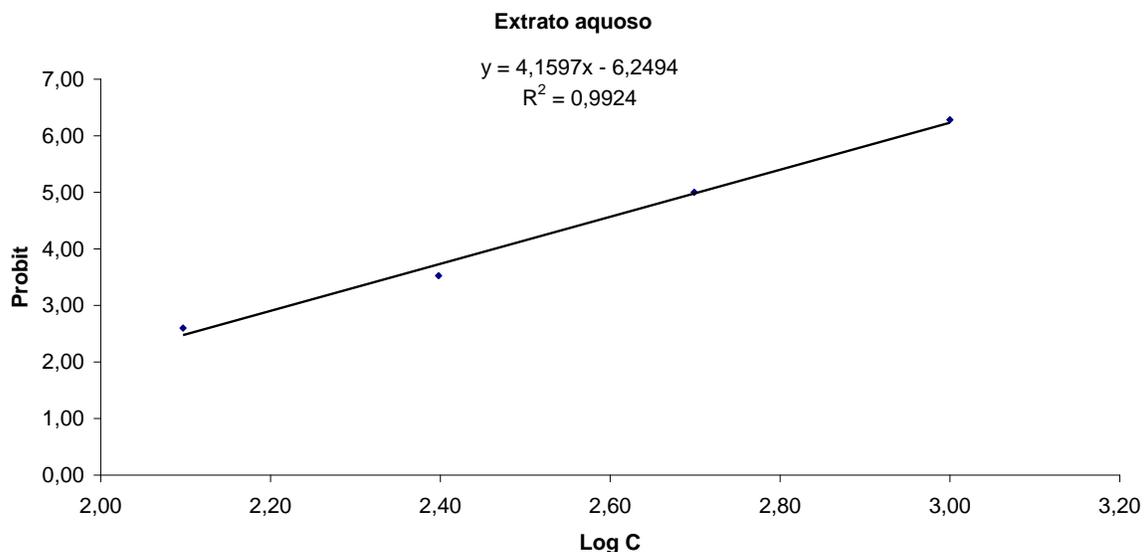


Gráfico 7. Determinação da  $CL_{50}$  do extrato aquoso em *A. nuneztovari*.

Os extratos mais apolares, hexânico e clorofórmico, foram os mais ativos, indicando que os princípios ativos larvicidas devam ser constituintes de baixa polaridade, assemelham-se a Scott *et al.* (2002).

Tabela 4. Valores da  $CL_{50}$  de extratos obtidos do fruto de *P. tuberculatum* diferentes fases de maturação para larvas de *A. nuneztovari*

Diferentes fases de maturação	$CL_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	n	$R^2$	Faixa de concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )
Grande	6,4	3	0,9316	25 a 1
Médio	11,4	4	0,9460	100 a 0,80
Pequeno	26,6	3	0,9131	100 a 4

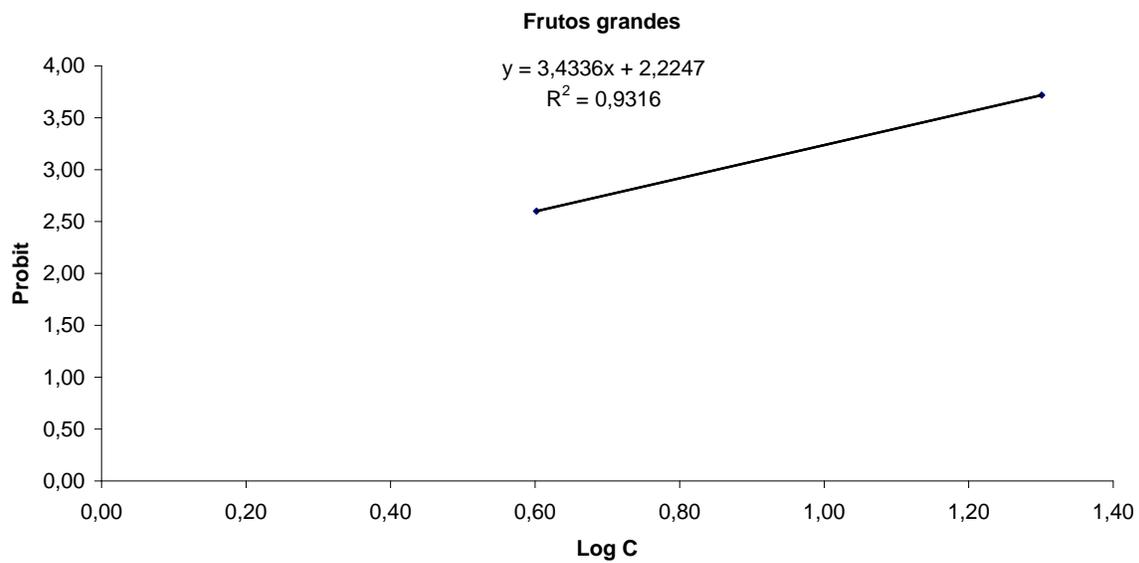


Gráfico 8. Determinação da  $CL_{50}$  de frutos grandes em *A. nuneztovari*

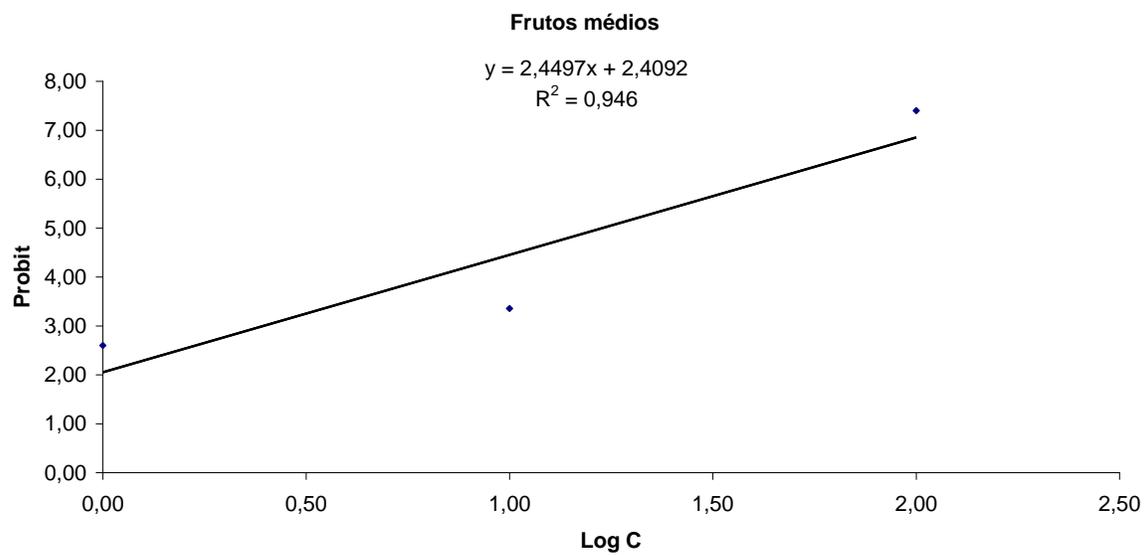


Gráfico 9. Determinação da  $CL_{50}$  de frutos médios em *A. nuneztovari*

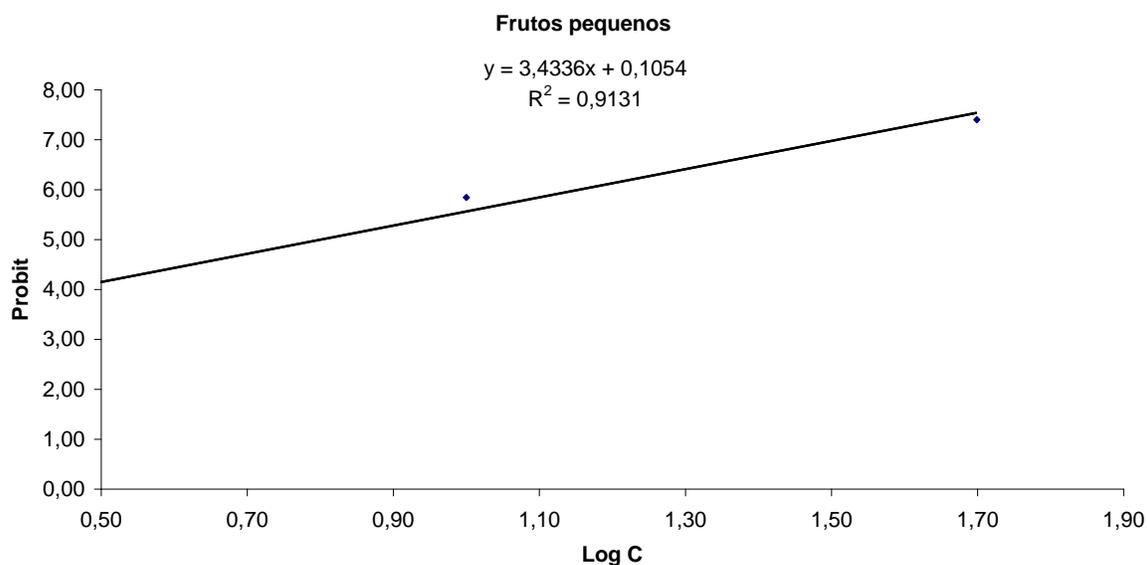


Gráfico 10. Determinação da  $CL_{50}$  de frutos pequenos em *A. nuneztovari*.

Observou-se claramente que a fase de maturação dos frutos está correlacionada com a produção e o acúmulo dos princípios ativos larvicidas. O extrato obtido de frutos grandes é mais de quatro vezes ativo que o de frutos pequenos.

#### 4.3 CONCENTRAÇÃO LETAL MEDIANA ( $CL_{50}$ ) DOS EXTRATOS DE *P. tuberculatum* PARA LARVAS DE *A. albitarsis*

Tabela 5. Valores da  $CL_{50}$  de diferentes partes da espécie de *P. tuberculatum* para larvas de *A. albitarsis*

Parte da planta	$CL_{50}$	n	$R^2$	Faixa de concentração
Extratos metanólicos	( $\mu\text{g/mL}$ )			( $\mu\text{g/mL}$ )
Fruto	28,9	4	0,9403	250 a 2
Galho	37,7	3	0,9131	250 a 2,5
Folha	35,2	3	0,8203	250 a 2,5

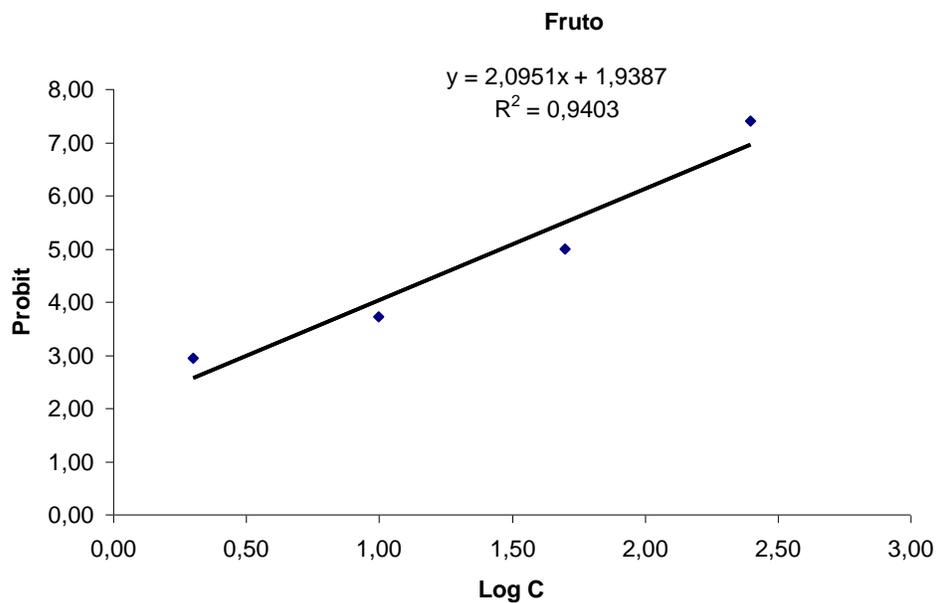


Gráfico 11. Determinação da  $CL_{50}$  do extrato metanólico de fruto em *A. albicansis*.

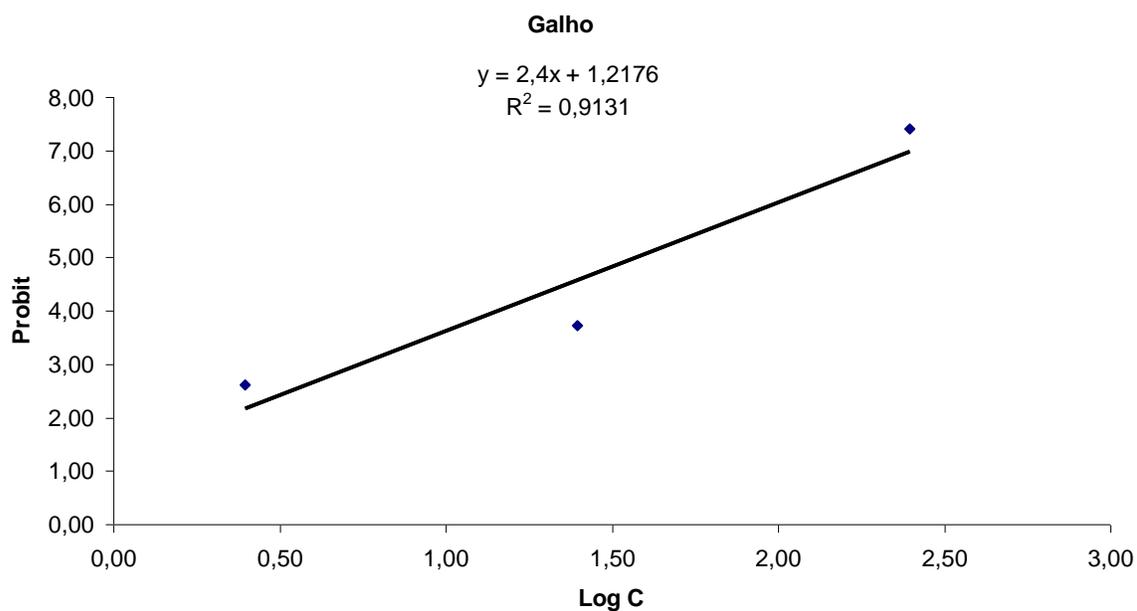


Gráfico 12. Determinação da  $CL_{50}$  do extrato metanólico de galho em *A. albicansis*.

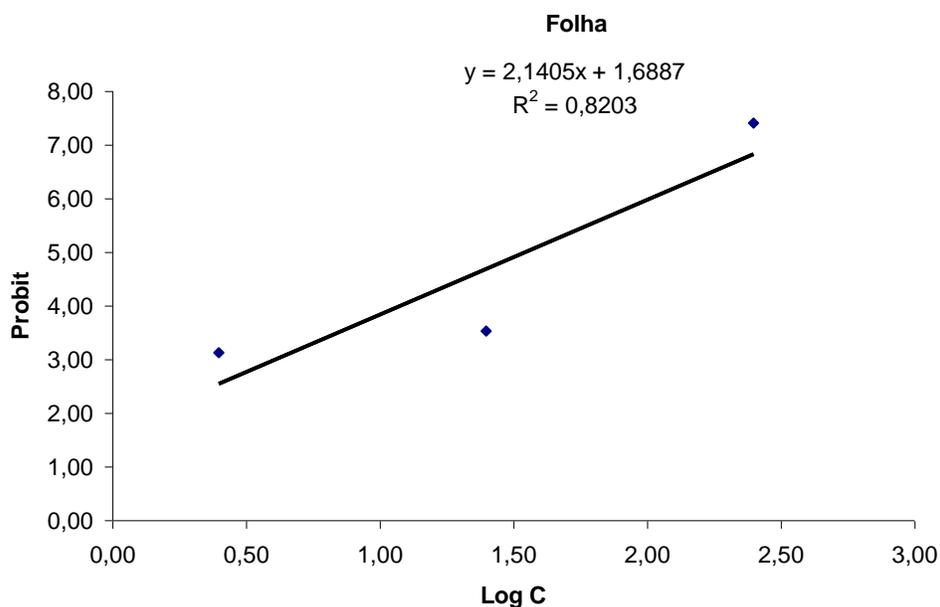


Gráfico 13. Determinação da  $CL_{50}$  do extrato metanólico de folha em *A. albitarsis*.

O extrato obtido a partir dos frutos, foi o mais ativo para *A. albitarsis*, assemelhando-se os resultados de *A. nuneztovari*, apresentados neste trabalho.

Tabela 6. Valores da  $CL_{50}$  dos diferentes extratos de fruto de *P. tuberculatum* para larvas de *A. albitarsis*

Diferentes extratos de fruto	$CL_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	n	$R^2$	Faixa de concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )
Hexânico	3,565	3	0,9997	6 a 1,5
Clorofórmico	10,659	3	0,9936	31.25 a 4
Metanólico	78,491	3	0,9981	250 a 100
Aquoso	284,254	4	0,8519	1000 a 125

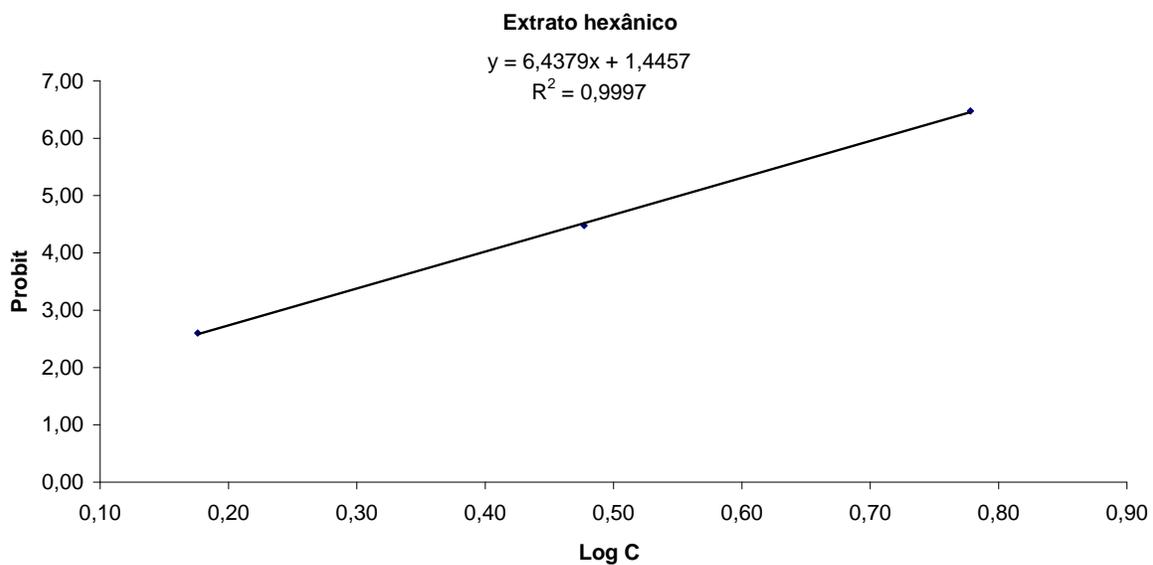


Gráfico 14. Determinação da  $CL_{50}$  do extrato hexânico em *A. albicans*.

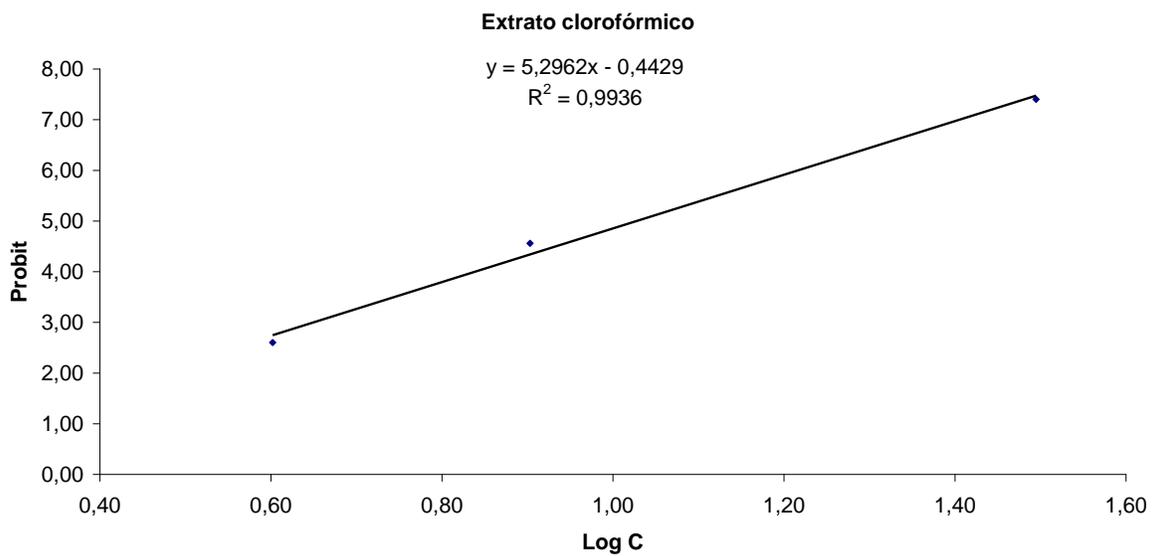


Gráfico 15. Determinação da  $CL_{50}$  do extrato clorofórmico em *A. albicans*.

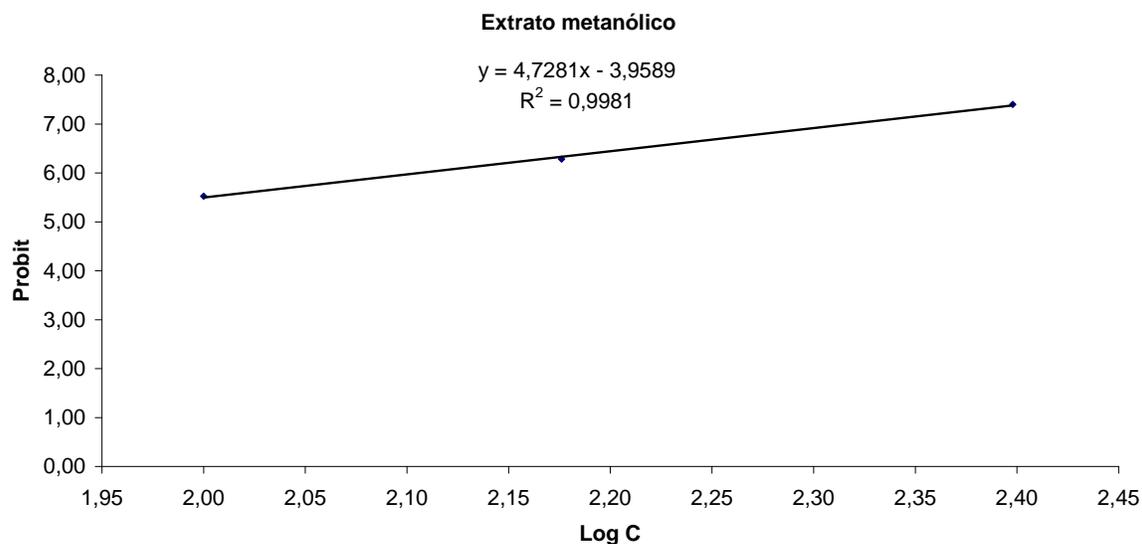


Gráfico 16. Determinação da  $CL_{50}$  do extrato metanólico em *A. albitarsis*.

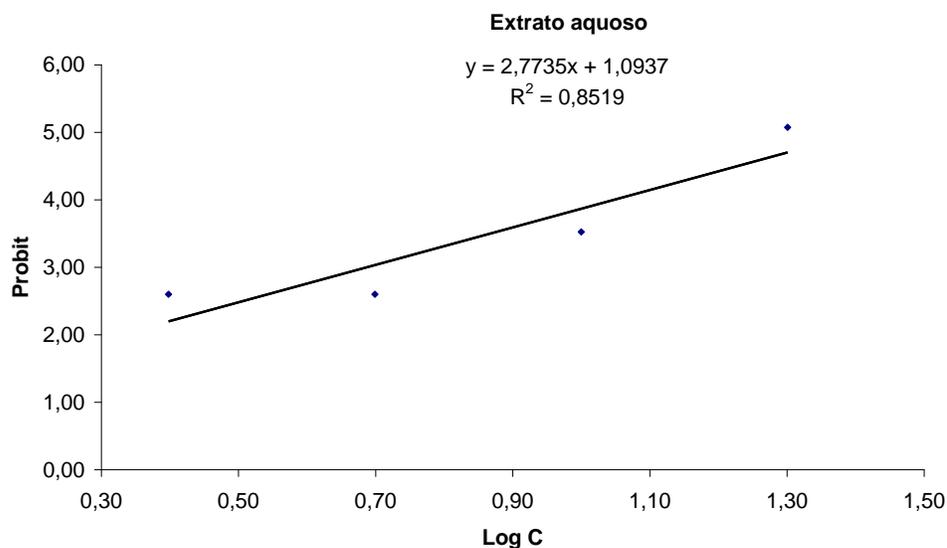


Gráfico 17. Determinação da  $CL_{50}$  do extrato aquoso em *A. albitarsis*.

Seguindo a ordem de polaridade, os extratos menos polares, hexânico e clorofórmico, foram os mais ativos, igualando-se aos resultados obtidos para *A. nuneztovari* deste trabalho.

Tabela 7. Valores da CL<sub>50</sub> de diferentes fases de maturação do fruto de *P. tuberculatum* para larvas de *A. albitarsis*.

Diferentes fases de maturação	CL <sub>50</sub> (µg/mL)	n	R <sup>2</sup>	Faixa de concentração (µg/mL)
Grande	25,6	4	0,9799	20 a 2,5
Médio	28,9	4	0,9403	250 a 2
Pequeno	45,0	4	0,8658	250 a 2

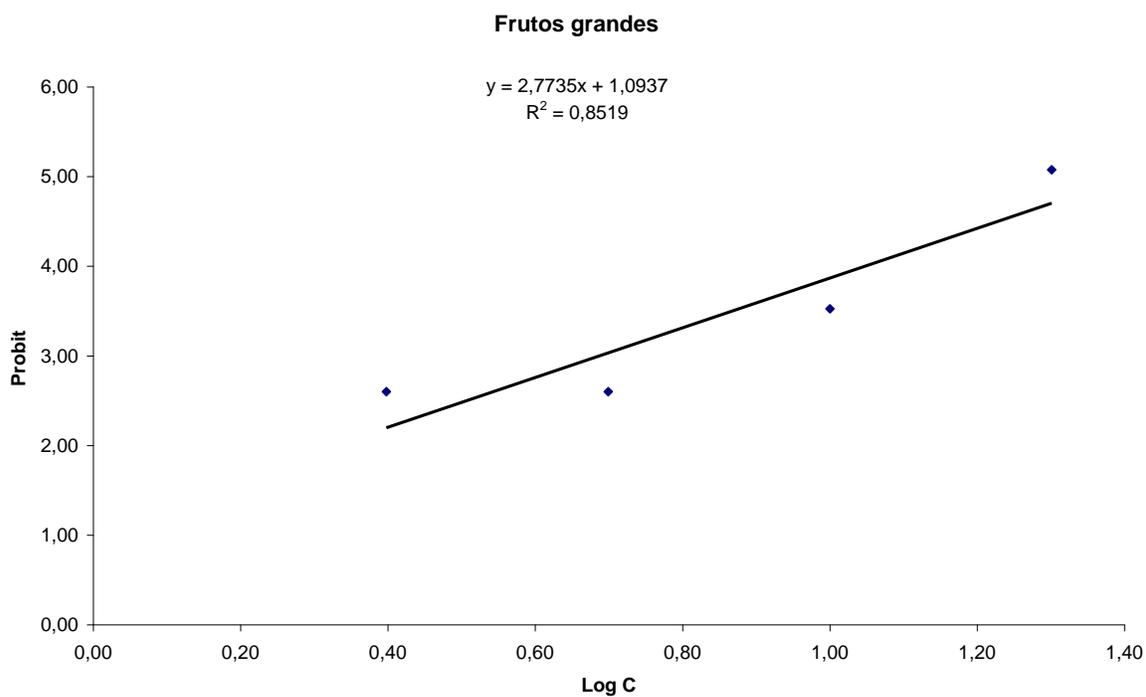


Gráfico 18. Determinação da CL<sub>50</sub> de frutos grandes em *A. albitarsis*.

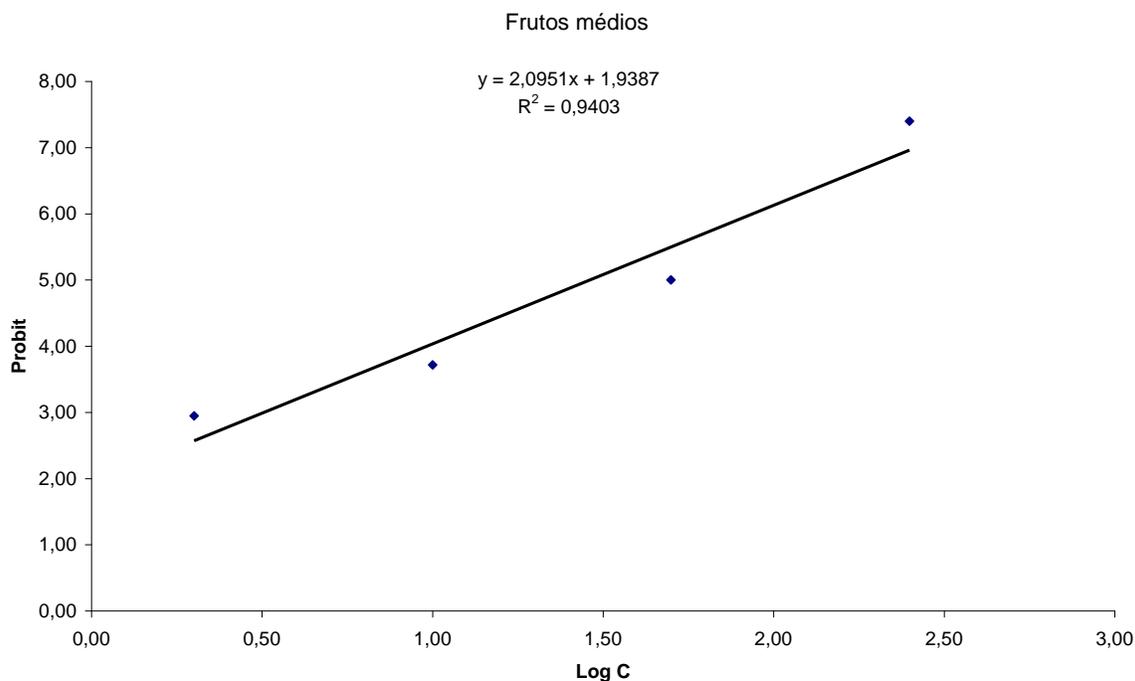


Gráfico 19. Determinação da  $CL_{50}$  de frutos médios em *A. albitarsis*.

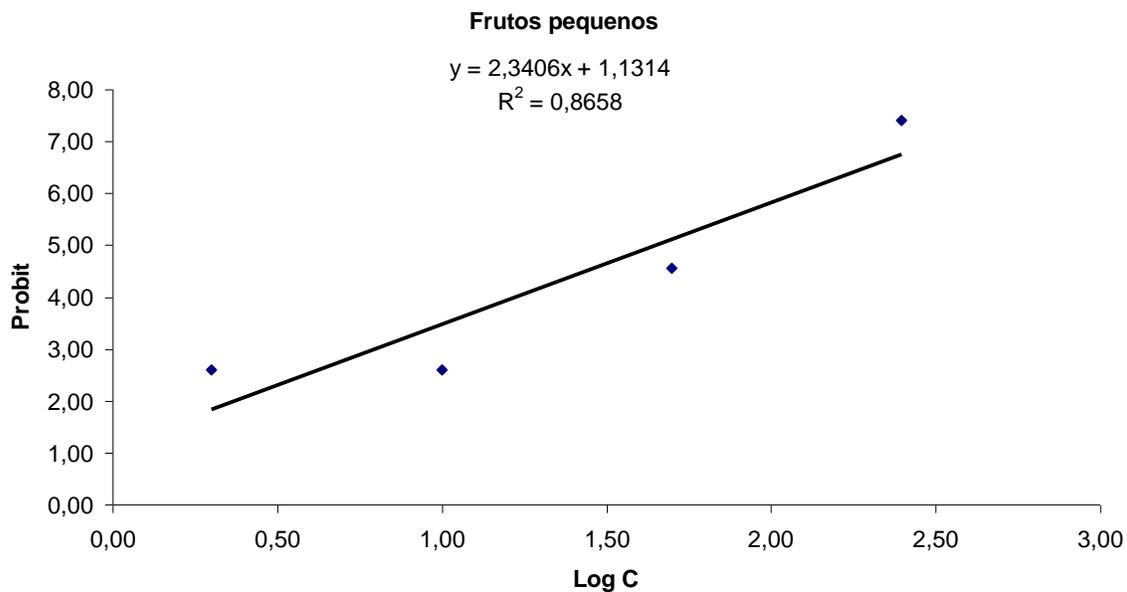


Gráfico 20. Determinação da  $CL_{50}$  de frutos pequenos em *A. albitarsis*.

O extrato obtido de frutos grandes é mais ativo, podendo-se fazer a mesma observação feita para *A. nuneztovari*. Nota-se que quanto mais maduro o fruto, maior sua atividade larvicida conta as larvas.

## CONCLUSÕES

Dentre os 22 extratos metanólicos testados da família Piperaceae, os extratos mais efetivos contra larvas de 3<sup>o</sup> estágio de *C. quinquefasciatus* e *Anopheles* sp foram os extratos de galho, fruto e folha de *P. tuberculatum*.

Dentre as diferentes partes da planta (fruto, galho e folha), o extrato mais ativo de *P. tuberculatum* contra larvas de *A. nuneztovari* e de *A. albitarsis* foi o de fruto. Comparando os diferentes extratos de frutos (hexânico, clorofórmico, metanólico e aquoso), o extrato hexânico exibiu maior atividade larvicida para as duas espécies de mosquitos.

Para as diferentes fases de maturação dos frutos (frutos pequenos, médios e grandes), o extrato de frutos grandes foi o mais efetivo contra larvas das espécies de mosquitos estudadas.

As larvas de *A. albitarsis* mostraram-se mais susceptíveis aos extratos metanólicos que *A. nuneztovari* quando as diferentes partes de *P. tuberculatum* (galho, folha e fruto) foram avaliadas.

Extratos mais polares mostraram-se menos ativos contra as duas espécies de mosquitos seguindo a ordem decrescente de polaridade: aquoso, metanólico, clorofórmico e hexânico.

Nas espécies de mosquitos testadas, o extrato de fruto foi bastante ativo, indicando a sua potencialidade na produção de um inseticida natural a partir de uma fonte renovável.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILERA, L. *et al.* **Efecto letal de myrtaceas cubanas sobre *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae).** *Revista Cubana de Medicina Tropical* v. 55, n. 2, 2003.

BALANDRIN, M.F. **Natural Plant Chemicals: Sources of Industrial and Medicinal Materials.** *Science* 228: 1154-1160, 1985.

BERGERON, C. *et al.* **Screening of plants used by North American indians for antifungal, bactericidal, larvicidal, and molluscicidal activities.** *International Journal Pharmacognosy*, v. 34(4):233-242, 1996.

BERNARD, C.B. *et al.* **Insecticidal defenses of Piperaceae from the Neotropics.** *Journal of Chemical Ecology*, v. 21, n. 6, 1995.

BROWN, A.W.A. **Insecticide resistance in mosquitos: a pragmatic review.** *Journal of the American Mosquito Control Association*, v. 2, 123-139, 1986.

CHANTRAINE, J.M. *et al.* **Insecticidal activity of essential oils on *Aedes aegypti* larvae.** *Phytotherapy Research*, v. 12 (5):350-354, 1999.

CHARIANDY, C.M. *et al.* **Screening of medicinal plants from Trinidad and Tobago for antimicrobial and insecticidal properties.** *Journal of Ethnopharmacology*, v. 64(3):265-270, 1999.

CICCIA, G. *et al.* **Insecticidal activity against *Aedes aegypti* larvae of some medicinal South American plants.** *Journal of Ethnopharmacology*, v. 72(1-2): 185-189, 2000.

COSTA, F.M. Banco de dados pessoal, 2006.

DIALLO, D. *et al.* **Screening of Malian medicinal plants for antifungal, larvicidal, molluscicidal, antioxidant and radical scavenging activities.** *Phytotherapy Research*, 15(5):401-406, 2001.

DON, H; *et al.* **Larvicidal Activity of Extracts of *Ginkgo biloba* Exocarp for Three Different Strains of *Culex pipiens pallens*.** *Journal of Medical Entomology*, v. 43, Number 2, pp, 258-261(4), 2006.

DUCKE, J.A. & VASQUEZ, R. **Amazonian ethnobotanical dictionary.** Florida, United States: CRC Press, 1994, 215 p.

ENRIQUÉZ, GONZALO. **Os caminhos da bioprospecção para o aproveitamento comercial da biodiversidade na Amazonia.** Disponível em: <http://www.comciencia.br/reportagens/2005/04/10.shtml>. 2005. Acesso em: 10/05/2007.

FERREIRA, S.H. *et al.* **Medicamentos a partir de plantas medicinais no Brasil.** – Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 1998.

FINNEY, DJ. **Probit analysis.** Cambridge (UK): Cambridge University Press, 1971, 333 p.

GORHAN, J.R., STOJANOVICH, C.J. e SCOTT, H.G. **Chave ilustrada para los mosquitos anofelinos de Sudamerica oriental.** US Department of Health, Education and Welfares. Atlanta, Geórgia, 1967.

GUIMARAES, E.F. e GIORDANO, L.C.S. **Piperaceae do Nordeste brasileiro I: estado do Ceará.** *Rodriguésia*, v. 55 (84): 21-46, 2004.

GUSMÃO, D.S. *et al.* ***Derris* (*Lonchocarpus*) *urucu* (Leguminosae) extract modifies the peritrophic matrix structure of *Aedes aegypti* (Diptera:**

**Culicidae).** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 97(3): 371-375, 2002.

KATO, M.J. & FURLAN, M. **Chemistry and evolution of the Piperaceae.** *Pure Appl. Chem.*, v. 79, nº 4, 2007, pp. 529-538.

LITCHFIELD, J.T., Jr., e FERTIG, J.W. *Bulletin of the Johns Hopkins Hospital*, 69:276, 1941.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil.** Editora Plantarum, Nova Odessa (SP), Brazil, 1998, 352 p.

LUNA, J. de S, *et al.* **A study of larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil.** *Journal of Ethnopharmacology*, v. 97, pp. 199-206, 2005.

MALARIA. Centers of Disease Control and Prevention (CDC). Disponível em:[http://www.cdc.gov/malaria/control\\_prevention/vector\\_control.htm](http://www.cdc.gov/malaria/control_prevention/vector_control.htm), 2006.

MACEDO, M. E. *et al.* **Screening of Asteraceae (Compositae) plant extracts for larvicidal activity against *Aedes fluviatilis* (Diptera: Culicidae).** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 92(4):565-570, 1997.

MARSTON, A. *et al.* **Search for antifungal, molluscicidal and larvicidal compounds from African medicinal plants.** *Journal of Ethnopharmacology*, 38(2-3):215-233, 1993.

MARTINIANO, T.M. e MOURA, N.T., 132. **Herbário Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA.** Registro: 213.809 (2003).

MEYER, B.N. *et al.* **Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents.** *Planta Medica*, v. 45 , 31-34, 1982.

MOTTA, V.T. e WAGNER, M.B. **Bioestatística.** Caxias do Sul: Educs, São Paulo: Robe Editorial, 2003, 201 p.

NAVICKIENE, H.M.D. *et al.* **Toxicity of extracts and isobutyl amides from *Piper tuberculatum*: potent compounds with potential for the control of velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatilis*.** *Pest Management Science*, 63: 399-403, 2007.

PARMAR, V.S. *et al.* **Phytochemistry of the genus *Piper*.** *Phytochemistry*, v. 46, 597-673, 1997.

PÉRET de SANT'ANA, P.J. **A bioprospecção no Brasil – contribuições para uma gestão ética.** Brasília: Paralelo 15, 220 p., 2002.

PIO CORRÊA. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas por Pio Corrêa.** Ministério da Agricultura. Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, Rio de Janeiro. v. V, 1974.

POHLIT, A.M. *et al.* **Screening of plants found in the State of Amazonas, Brazil for activity against *Aedes aegypti* larvae.** *Acta Amazonica*, Manaus, v. 34, n. 1, 2004.

QUIGNARD, E.L.J. *et al.* **Screening of plants found in Amazonas state for lethality towards brine shrimp.** *Acta Amazonica*, 33 (1): 93-104, 2003.

REVILLA, J. **Apontamentos para a Cosmética Amazônica.** SEBRAE-AM / INPA, Manaus. 532 p., 2002.

SANTOS, A.S.R. **Biodiversidade, bioprospecção, conhecimento tradicional e futuro da vida.** Disponível em: <http://www.ccuec.unicamp.br/revista/infotec/artigos/silveira.html>. Acesso em: 10/05/2007.

SCHULTES, R.E., RAFFAUF, R.F. **The Healing Forest: Medicinal and Toxic Plants of the Northwest Amazonia.** Dioscorides Press, Oregon, United States. 484 p., 1990.

SCOTT, I.M. *et al.* **Insecticidal activity of *Piper tuberculatum* Jacq. Extracts: synergistic interaction of piperamides.** *Agricultural and Forest Entomology*, v. 4, 137-144, 2002.

SIDDIQUI, B. S. *et al.* **Phytochemical studies on the seed extract of *Piper nigrum* Linn.** *Natural Product Research* (2005), 19(7), 2005.

SILVA, M.F., LISBÔA, P.L.B., LISBÔA, R.C.L. **Nomes vulgares de Plantas Amazônicas.** INPA, Manaus. 222 p, 1977.

SOLIS, P.N. *et al.* **A new larvicidal lignan from *Piper fimbriulatum*.** *Pharmaceutical Biology* (Philadelphia, PA, United States), 43(4), 378-381, 2005.

STEPHENSON, F. **A tale of taxol.** Disponível em: <http://www.rinr.fsu.edu/fall2002/taxol.html>. Acessado em: 09/06/2007, 2002.

SUKAMAR, K., PERICH, M.J., BOOBAR, L.R. **Botanical derivatives in mosquito control: a review.** *Journal of the American Mosquito Control Association*, 7:210-237, 1991.

TADEI, W.P. *et al.* **O Papel da Entomologia no Controle da Malária.** In: X reunião Nacional de Pesquisa em Malária. *Revista Brasileira de Medicina Tropical*, v. 40 (Suplemento II), p. 22-26, 2007.

TEIXEIRA, L.O.A. *et al.*, 1582. Herbário Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA. Registro: 111.921 (1983).

VIEIRA, G. *et al.*, 48 Herbário Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA. Registro: 88401 (1979).

VIEIRA, I.C.G.; SILVA, J.M.C.; TOLEDO, P. **Mann de. Estratégias para evitar a perda de biodiversidade na Amazônia.** *Estud. av.*, São Paulo, v, 19, n. 54, 2005.

Yang, S. Lee *et al.* **A piperidine amide extracted fro Piper longum L. fruit shows activity against Aedes aegypti mosquito larvae.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*,v. 50, pp. 3765–3767, 2002.

## Capítulo 02

**Estudo biomonitorado do extrato clorofórmico de fruto de *Piper tuberculatum* Jacq.**

## INTRODUÇÃO

### 1 QUÍMICA DA ESPÉCIE *Piper tuberculatum*

A procura por substâncias biologicamente ativas, isoladas de espécies vegetais, fez avançar as técnicas utilizadas para se comprovar o efeito sobre organismos. Nos últimos anos ela vem sendo feita por um processo longo e multidisciplinar, onde cada etapa realizada é testada através de bioensaios, resumida na figura 1 (McLAUGHLIN *et al.*, 1991).

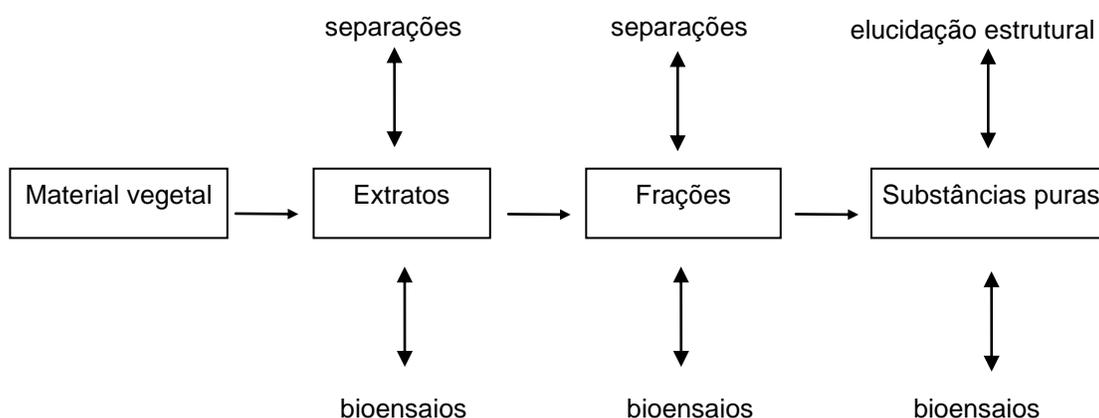


Figura 1. Etapas realizadas na procura de substâncias bioativas.

Uma alternativa aos produtos químicos convencionais utilizados no combate a organismos nocivos ao homem é o emprego de extratos vegetais, pois apresentam vantagens importantes como o baixo impacto ambiental. Por exemplo, as isobutilamidas demonstraram atividade inseticida contra *Diatraea saccharalis* Frabr. (Lepidoptera: Pyralidae) e *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) (NAVICKIENE, dados não publicados), *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae) (GBEWONYO e CANDY, 1992), *Ostrinia nubilalis* Hübner (Lepidoptera: Pyralidae) e propriedades de inibição alimentar (MATSUI e MUNSKATA, 1975; MIYAKADO *et al.*, 1989; BERNARD *et al.*, 1995).

A família Piperaceae vem atraindo atenção nos últimos anos por possuir substâncias inseticidas. Nas espécies da família Piperaceae, pode-se encontrar um grande número de metabólitos, tais como: fenilpropanóides, lignanas,

terpenos, esteróides, chalconas, flavonas, alcalóides e amidas, produzidos em resposta a herbivoria dos insetos (PARMAR *et al.*, 1997).

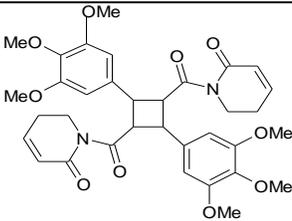
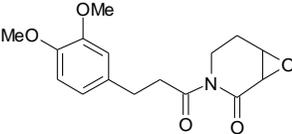
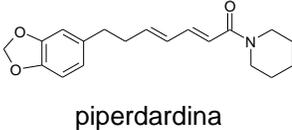
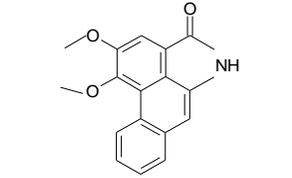
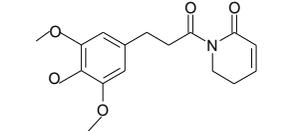
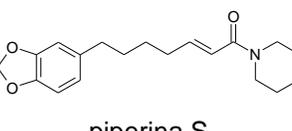
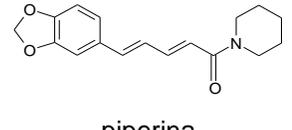
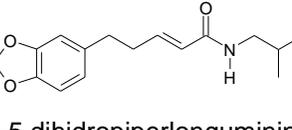
A espécie estudada, *Piper tuberculatum*, se distribui no continente americano e Antilhas. No Brasil está presente nos estados do Amazonas, Pará, Maranhão, Piauí, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Rio de Janeiro e Mato Grosso (GUIMARAES & GIORDANO, 2004).

Muitas amidas insaturadas vêm sendo identificadas nas espécies do gênero *Piper* de todas as regiões tropicais do mundo, sendo identificadas de maneira geral como piperamida, termo proposto para os componentes encontrados de *Piper*, descrevendo todas as moléculas que possuem um grupo aromático e um grupo amida (KIUCHI *et al.*, 1988). Como exemplo, observa-se a piperina que foi a primeira amida a ser isolada dos frutos de *Piper* (PARMAR *et al.*, 1997).

Neste trabalho, todas as substâncias fracionadas a partir do extrato bruto de *Piper tuberculatum*, foram biomonitoradas em ensaios com larvas de terceiro estágio de *Anopheles nuneztovari* e *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae).

A tabela 1 apresenta algumas substâncias isoladas de *Piper tuberculatum*, encontradas nas diversas partes da planta (Tabela 1).

Tabela 1. Substâncias isoladas de *Piper tuberculatum* em diversas partes da planta.

Parte da Planta de <i>P. tuberculatum</i>	Substância isolada	Referência
Raiz		Braz-Filho <i>et al.</i> , 1981.
Folha	<p data-bbox="786 531 987 560">dímero-piplartina</p> 	Capron e Wiemer, 1996
Galho		Araújo-Júnior <i>et al.</i> , 1996.
Galho		Araújo-Júnior <i>et al.</i> , 1999.
Semente		Navickiene <i>et al.</i> , 2000
Fruto		Chaves <i>et al.</i> , 2003
Folha		Scott <i>et al.</i> , 2005
Semente		Navickiene <i>et al.</i> , 2007.
	4-5 dihidropiperlonguminina	

As amidas mostraram atividades antifúngicas contra *Cladosporium sphaerospermum* e *C. cladosporium* (ALÉCIO *et al.*, 1998; NAVICKIENE *et al.*, 2000; SILVA *et al.*, 2002) e atividade moluscicida contra o vetor da esquistossomose, *Biomphalaria glabrata* Say (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) (ISAO, 1984).

## 1.1 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

O termo cromatografia foi primeiramente utilizado em 1906 e sua utilização é atribuída a um botânico russo, Michael Tswett, ao descrever suas experiências na separação dos pigmentos de extratos de folhas. De uma forma geral, a cromatografia é um método que utiliza diversas técnicas para a separação de substâncias de uma mistura, com fins analíticos ou preparativos e não implica em reações químicas entre os compostos envolvidos. Todas as técnicas cromatográficas utilizam uma fase estacionária e uma fase móvel. A fase estacionária é formada de um material escolhido para reter de forma diferenciada os componentes da amostra que se deseja separar. A fase móvel é o material que se desloca pela fase estacionária, arrastando os componentes da amostra. Após deslocar pela fase estacionária, por um percurso de distância adequadamente escolhida, os componentes da amostra separam-se.

Os métodos cromatográficos subdividem-se em diferentes formas:

- Cromatografia gasosa
- Cromatografia líquida
- Cromatografia em coluna
- Cromatografia planar

Para o isolamento de substâncias bioativas, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é aquela que tem sido empregada com maior êxito.

### **1.1.1 - Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)**

É a técnica mais nova e mais importante de separação existente. Utiliza pequenas colunas, empacotadas com materiais especialmente preparados e uma fase móvel que é eluída em altas pressões. Ela tem a capacidade de realizar separações e análises quantitativas de uma grande quantidade de compostos presentes em vários tipos de amostras com alto grau de pureza, em escala de tempo de poucos minutos, com alta resolução, eficiência e sensibilidade (COLLINS *et al.*, 1993).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 GERAL

- Isolar substâncias com atividade larvívica do extrato clorofórmico dos frutos de *P. tuberculatum* empregando métodos cromatográficos;

### 2.2 ESPECÍFICOS

- Monitorar o fracionamento do extrato pelo bioensaio da atividade larvívica com *Anopheles* sp e *Culex quinquefasciatus*;
- Elucidar as substâncias isoladas por meio de análises espectroscópicas;
- Determinar a atividade larvívica para cada uma das substâncias isoladas.

### **3 MATERIAL E MÉTODO**

#### **3.1 SOLVENTES**

Os solventes (LabSynth) utilizados para análise em CCD e CC foram purificados por destilação e secos com sulfato de sódio anidro, quando necessário. Os solventes utilizados em CLAE foram de grau cromatográfico ultrafiltrados (EM Science).

#### **3.2 EQUIPAMENTOS**

- Balança analítica Ohaus, modelo Adventurer AR2140;
- Balança semi-analítica Ohaus, modelo Adventurer ARC120;
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência, Shimadzu LC-20 Prominence, equipado com uma bomba quaternária LC-10AT e sistema de degaseificação DGU – 20A, sistema de injeção automático SIL20A e detetor de arranjo de diodos SPD-M20A, software de monitoramento e tratamento de dados LC-Solution version 1.11 SP1;
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência, modelo LC-6 AD, marca Shimadzu, equipado com detetor ultravioleta/visível, modelo SCL-10AVP, com duplo canal, software de monitoramento e tratamento dos dados Class VP 6.13 SP2;
- Placas aquecedoras, modelo 753 A Fisatom;
- Evaporador rotativo Fisatom 802;
- Banho de ultra-som Unique USC 1400;
- Banho de ultra-som Branson 1510R-MT;
- Micropipetadores automáticos Eppendorf (P50 e P1000);

- Transferidor automático de soluções Eppendorf Varispenser plus;

### 3.3 REVELADORES

- Câmera de revelação de CCD com lâmpadas de UV a 245 nm e 366 nm;
- Reagente de Barton modificado: a) 25% de ácido tricloroacético em clorofórmio; b) ferrocianeto de potássio 1% e cloreto de ferro III a 5% (WAGNER & BLADT, 1996);
- Anisaldeído: 0,5 mL de anisaldeído misturado com 10 mL de ácido acético glacial, seguido por 85 mL de metanol e 5 mL de ácido sulfúrico concentrado, nesta ordem (WAGNER & BLADT, 1996).

### 3.4 COLETA DO MATERIAL VEGETAL DE *Piper tuberculatum*

Os frutos de *P. tuberculatum* foram coletados no campus principal do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), localizado na cidade de Manaus (AM) nas proximidades do Lago Amazônico.

O extrato usado para o fracionamento foi preparado por meio de extração em Soxhlet, com clorofórmio, conforme descrito no capítulo 1.

### 3.5 BIOMONITORAMENTO

Para monitorar as frações separadas do extrato estudado, foram feitos testes biológicos, com larvas de *C. quinquefasciatus*, *Anopheles nuneztovari* e *A. albitarsis*. A obtenção das larvas das três espécies e o procedimento nos ensaios biológicos já foram descritos no capítulo 1 deste trabalho.

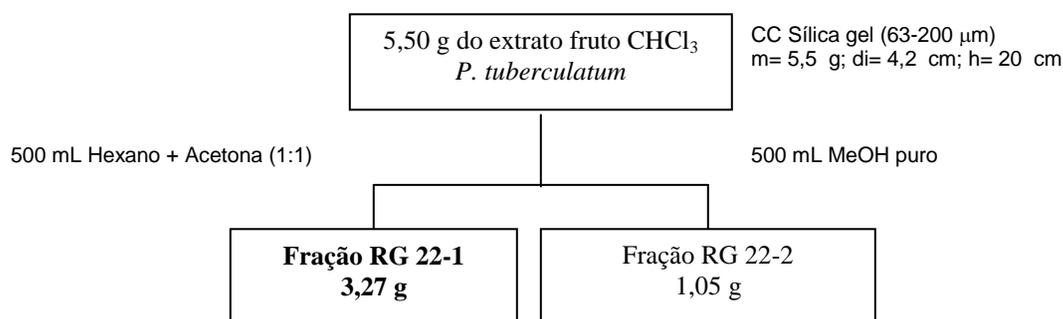
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 PRÉ-FRACIONAMENTO DO EXTRATO CLOROFÓRMICO DO FRUTO DE *P. tuberculatum*

Considerando que o extrato clorofórmico encontrava-se composto de substâncias de polaridade bastante diferentes optou-se pelo fracionamento preliminar em coluna do tipo filtrante nas seguintes condições:

Foram utilizados 5,5g do extrato clorofórmico do fruto de *P. tuberculatum* em coluna, com dimensões de 20 cm de altura (h) e 4,2 cm de diâmetro interno (di), preenchida com 100 g de sílica gel 60 Merck (63-200  $\mu\text{m}$ ). O extrato foi solubilizado em 10 mL de hexano e 10 mL de acetona, com auxílio do ultra-som. Após a secagem, a extrato foi injetado sólido à coluna.

A amostra foi eluída primeiramente com 500 mL da mistura hexano e acetona (1:1), o material foi coletado em um balão de vidro, resultando na fração RG 22-1. Após a coleta da primeira fração, utilizou-se 500 mL de metanol puro (MeOH), resultando na fração RG 22-2, representado no fluxograma 1.



Fluxograma 1. Fracionamento preliminar do extrato bruto clorofórmico do fruto de *P. tuberculatum*.

As duas frações foram analisadas por CCD, com o auxílio de UV e dos dois reveladores, reagente de Barton modificado e anisaldeído. O anisaldeído detecta um grande número de moléculas, podendo ser descrito como revelador universal. E o reagente de Barton modificado é específico na detecção de amidas

apresentando manchas azuis nas placas de cromatografia de camada delgada. Para o biomonitoramento utilizaram-se larvas de *C. quinquefasciatus*. Para as duas frações, os testes biológicos foram feitos em duas concentrações: 50 e 5 µg/mL. As frações foram solubilizadas em DMSO. A tabela descrita abaixo possui a porcentagem de mortalidade para as diferentes frações e concentrações avaliadas.

Tabela 1. Porcentagem de mortalidade para *C. quinquefasciatus* das frações de *Piper tuberculatum* em duas concentrações diferentes.

Frações	Porcentagem de mortalidade em duas concentrações-teste	
	50 µg/mL	5 µg/mL
RG 22 - 1	100	93
RG 22 - 2	0	0

O primeiro fracionamento biomonitorado indicou claramente que a fração RG22-1 concentrou a atividade larvicida, sendo por isso utilizada em um novo fracionamento em coluna cromatográfica (CC).

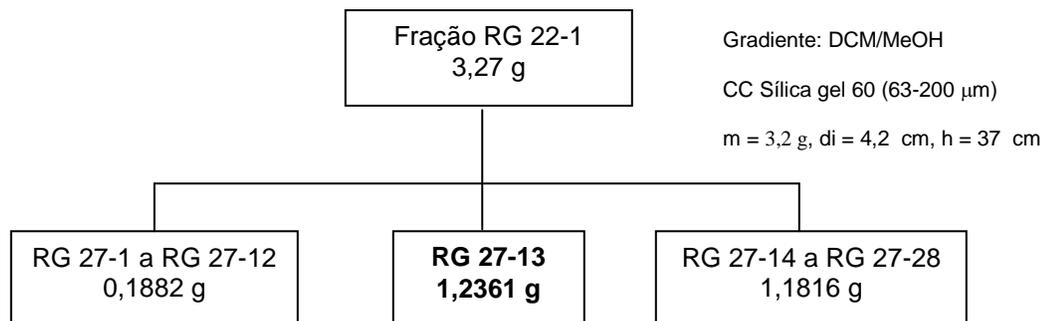
#### 4.2 SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA DA FRAÇÃO RG 22-1

Dando prosseguimento ao isolamento, foi realizada uma segunda coluna cromatográfica e foram utilizados 3,37 g da fração RG 22-1. A coluna apresentava as seguintes dimensões: 4,2 cm de diâmetro interno (di) e 37 cm de altura (h). Utilizou-se 300 g de sílica flash 60 gel Merck (43 – 60 µm) como fase estacionária. A fração foi impregnada em sílica gel 60 e em seguida foi aplicada na forma sólida à coluna. Como fase móvel foi utilizado um gradiente de diclorometano (DCM) e MeOH na seguinte ordem: 500 mL de DCM, 500 mL de DCM/MeOH (98:2), 500 mL de DCM/MeOH (96:4), 500 mL de DCM/MeOH (94:6), 500 mL de DCM/MeOH (92:8) e 500 mL de DCM/MeOH (90:10). Foram coletadas frações a cada 150 mL.

Resultaram dessa coluna 28 frações (Tabela 2), codificadas RG 27-1 a RG 27-28, que posteriormente foram reunidas em 11 frações de acordo com a análise em CCD (Fluxograma 2).

Tabela 2. Rendimento das frações obtidas a partir de RG22-1.

<b>Frações</b>	<b>Massa (g)</b>
RG27 - 1	0,0445
RG27 - 2	0,0353
RG27 - 3	0,0078
RG27 - 4	0,0013
RG27 - 5	0,0009
RG27 - 6	0,0011
RG27 - 7	0,0010
RG27 - 8	0,0008
RG27 - 9	0,0018
RG27 - 10	0,0042
RG27 - 11	0,0043
RG27 - 12	0,0815
RG27 - 13	1,2361
RG27 - 14	0,7295
RG27 - 15	0,1028
RG27 - 16	0,0131
RG27 - 17	0,0184
RG27 - 18	0,0526
RG27 - 19	0,0318
RG27 - 20	0,0209
RG27 - 21	0,0130
RG27 - 22	0,0249
RG27 - 23	0,0102
RG27 - 24	0,0177
RG27 - 25	0,0146
RG27 - 26	0,0102
RG27 - 27	0,0064
RG27 - 28	0,0042
RG27 - 28	0,0663



Fluxograma 2. Fracionamento da amostra RG 22-1.

Após a reunião das amostras foram realizados os bioensaios em duas concentrações: 20 µg/mL e 5 µg/mL. As frações foram solubilizadas em DMSO com auxílio do ultra-som e testadas em larvas de *C. quinquefasciatus* (Tabela 3).

Tabela 3. Porcentagem de mortalidade das frações obtidas a partir de RG 22 –1 em duas concentrações diferentes.

Frações	Massa (g)	Porcentagem de mortalidade em duas concentrações-teste	
		5 µg/mL	20 µg/mL
RG27 - 1	0,0445	0	0
RG27 – 2	0,0353	0	0
RG27 – 6	0,0011	6,6	0
RG27 – 11	0,0043	6,6	0
RG27 – 12	0,0815	60	100
RG27 – 13	1,2361	26,6	100
RG27 – 14	0,7295	66,6	50
RG27 – 15	0,1028	3,3	100
RG27 – 19	0,0318	10	0
RG27 – 22	0,0249	6,6	0
RG27 – 28	0,0663	0	0

Os resultados obtidos nas duas concentrações-teste indicaram que as frações mais ativas foram as frações RG27-12, RG27–13 e RG27–15. A fração

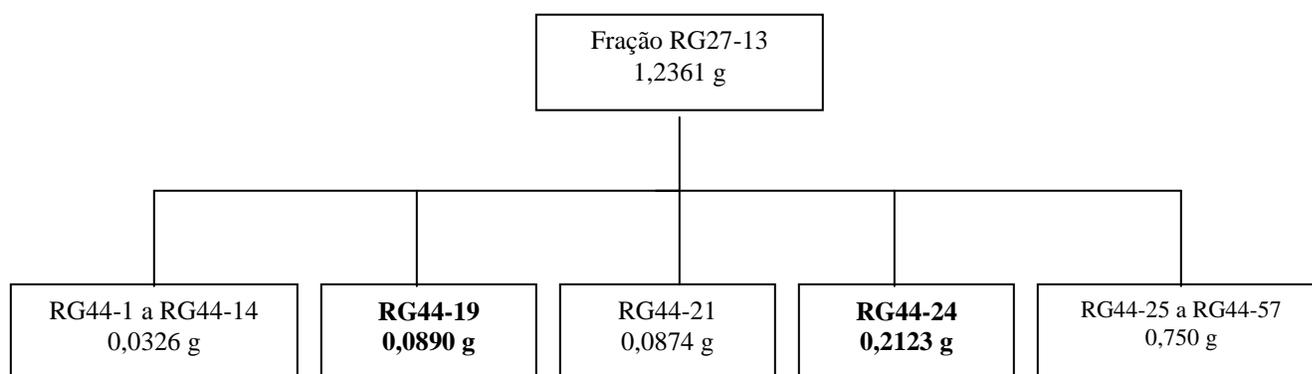
RG27-14 também apresentou forte atividade, porém com a falta de reprodutibilidade na concentração superior.

### 4.3 SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA DA FRAÇÃO RG27-13

O biomonitoramento feito com larvas de *C. quinquefasciatus* apresentou 100% de mortalidade na concentração de 50 µg/mL, sendo assim escolhida para um novo fracionamento. De acordo com a análise feita em CCD, após revelação com Anisaldeído e Reagente de Barton modificado, a fração RG27-13 apresentou a maior concentração de amidas.

Utilizou-se então uma nova separação em uma coluna de vidro de seguintes dimensões: 50,5 cm de altura (h) e 2,9 cm de diâmetro interno (di). Para a fase estacionária empregou-se 130 g sílica flash (40–63 µm). Para a fase móvel utilizou-se dois gradientes: 1) Hexano/DCM/MeOH (70:30 a 10:90), sendo que a mistura DCM/MeOH era 99:1 e 2) DCM/MeOH (99:1 a 80:20).

A separação realizada resultou em 57 frações, codificadas de RG44-1 a RG44-57, que posteriormente foram reunidas em 13 frações, de acordo com as semelhanças das análises feitas em CCD (Fluxograma 3).



Fluxograma 3. Fracionamento da amostra RG27-13.

As frações obtidas de RG27-13 foram monitoradas, usando larvas de *C. quinquefasciatus*, utilizando-se a concentração-teste 5 µg/mL (Tabela 4).

Tabela 4. Porcentagem de mortalidade das frações geradas a partir de RG27 – 13.

<b>Frações</b>	<b>Massa (g)</b>	<b>Porcentagem de mortalidade a 5 µg/mL</b>
RG44 – 5	0,0018	3,3
RG44 – 6	0,0011	0
RG44 – 10	0,0208	0
RG44 – 14	0,0089	0
RG44 – 19	0,0890	93
RG44 – 21	0,0874	100
RG44 – 24	0,2123	50
RG44 – 30	0,4254	3,3
RG44 – 32	0,0713	0
RG44 – 34	0,0881	0
RG44 – 36	0,0454	3,3
RG44 – 48	0,1014	0
RG44 – 57	0,0184	3,3

As frações RG44–19, RG44-21 e RG44-24 exibiram uma porcentagem de mortalidade de 100, 93 e 50%, respectivamente. Comparando os resultados dos bioensaios com os obtidos com as frações da coluna anterior (RG27-1 a RG27-28) observou-se um aumento da atividade larvicida.

Uma vez que a atividade larvicida concentrou-se nas frações RG44-19 a RG44-24 e a quantidade de material disponível era limitada, decidiu-se pela purificação final por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

#### **4.4 PURIFICAÇÃO DAS FRAÇÕES RG44–19 E RG44–24 POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)**

##### **4.4.1 Análise preparativa CLAE**

O cromatógrafo líquido de alta eficiência, analítico, Shimadzu LC–20 Prominence, foi usado para otimizar o método de separação das moléculas ativas das frações RG44–19 e RG44–24. As condições utilizadas neste procedimento

foram: coluna de fase reversa Shim-pack PREP-ODS (II) KIT 5  $\mu\text{m}$  (250 x 4,6 mm). As amostras foram preparadas em metanol na concentração de 1 mg/mL e filtradas em filtros de membrana de PVDF com porosidade de 0,22  $\mu\text{m}$ .

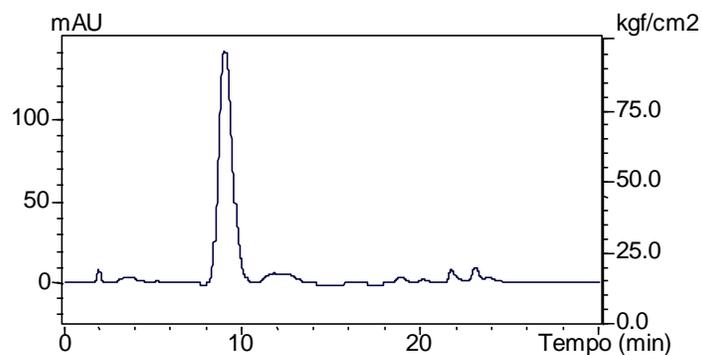
As amostras foram analisadas previamente empregando um gradiente exploratório de MeOH/H<sub>2</sub>O (0-5 min 65:35; 5-15 min 100:0; 15-30 min 100:0), fluxo de 1 mL/min. Após essa avaliação prévia, as condições cromatográficas foram otimizadas para cada fração chegando a diferentes condições finais de análise:

1) RG44 – 19:

0 a 15 min - MeOH/H<sub>2</sub>O (75:25)

15 a 20 min - MeOH/H<sub>2</sub>O (100:0)

20 a 30 min - MeOH/H<sub>2</sub>O (100:0)



Cromatograma 1. Perfil cromatográfico da fração RG44-19 obtido a 245 nm.

2) RG44 – 24:

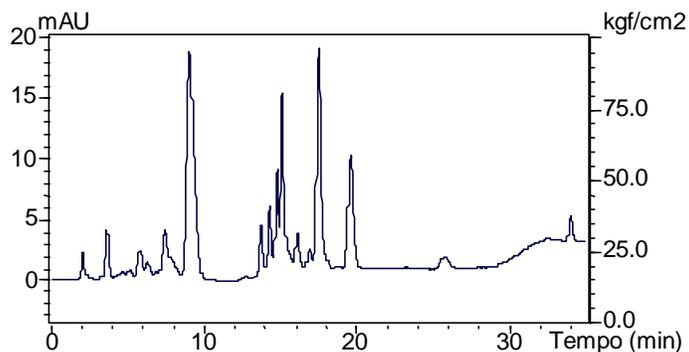
0 a 5 min - MeOH/H<sub>2</sub>O (60:40)

5 a 7 min - MeOH/H<sub>2</sub>O (80:20)

7 a 22 min - MeOH/H<sub>2</sub>O (80:20)

22 a 25 min - MeOH/H<sub>2</sub>O (100:0)

25 a 35 min - MeOH/H<sub>2</sub>O (100:0)



Cromatograma 2. Perfil cromatográfico da fração RG44-24 obtido a 245 nm

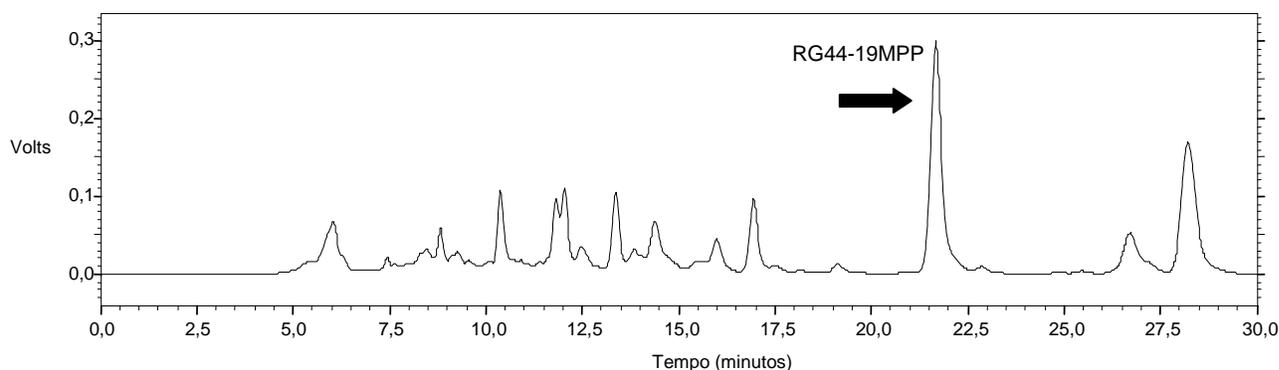
#### 4.4.2 Isolamento semi-preparativo por CLAE

O isolamento foi realizado em um cromatógrafo líquido de alta eficiência, modelo LC-6 AD, da Shimadzu, acoplado a um coluna Shim-pack PREP-ODS (H) KIT de 5  $\mu$ m (250 x 25 mm). As amostras foram solubilizadas em metanol empregando o menor volume possível, e depois foram filtradas em membrana tipo PVDF. Na tabela 5, apresenta-se a quantidade de cada amostra utilizada em CLAE e o volume de metanol que foi utilizado para solubilizar as frações.

Tabela 5. Quantidade em gramas utilizada de cada fração em CLAE.

<b>Frações</b>	<b>Massa solubilizada para uso em CLAE (g)</b>	<b>Volume de metanol adicionado a fração (mL)</b>
RG44-19	0,1207	5
RG44-24	0,2323	3

Uma vez que a fração RG44-19 apresentou um único pico principal decidiu-se coletar apenas esse pico separadamente (Cromatograma 3). Denominou-se RG44-19MPP o componente majoritário da amostra. O restante dos componentes foi coletado separadamente em uma única fração, denominado de RG44-19MRG.



Cromatograma 3. Separação da fração RG44-19 em RG44-19 MPP sinalizado. Observação feita no comprimento de onda de 290 nm.

Os comprimentos de onda para a leitura foram 290 nm e 254 nm. O método de análise utilizado foi isocrático, MeOH/H<sub>2</sub>O (65:35) por 30 minutos com fluxo de 10 mL/minuto. Iniciou-se com 3 injeções de 50 µL aumentando o volume gradativamente para 100, 200, 300, 400 e 500 µL. Os rendimentos das frações RG44-19MPP e RG44-19MRG foram: 0,0064 e 0,0598 g respectivamente.

Em análise do efeito tóxico pelo contato dermatológico, Miranda *et al.* (2003) demonstraram o efeito inseticida da pelitorina em adultos de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) onde a maioria dos insetos morreu antes de 24 h de exposição.

A substância RG44-19MPP foi biomonitorada utilizando-se larvas de *A. nuneztovari*, usando 5 concentrações diferentes (50, 10, 2, 0,4 e 0,08 µg/mL). Estranhamente, não houve mortalidade dos indivíduos em nenhuma das concentrações opondo-se ao trabalho de Navickiene *et al.* (2000) que observaram atividade antifúngica contra *Cladosporium sphaerospermum*.

A fração RG44-19MRG foi biomonitorada utilizando-se larvas de *A. nuneztovari*, nas mesmas concentrações citadas acima, apresentado mortalidade de 16% apenas na maior concentração testada (50 µg/mL). No restante das

concentrações, não houve mortalidade dos indivíduos. Observou-se uma perda da atividade larvicida, uma vez que a fração RG44-19 apresentou 93% de mortalidade a 5 µg/mL. Após o fracionamento, nenhuma das frações apresentou atividade a uma concentração dez vezes superior.

Para verificar a razão da perda da atividade larvicida realizou-se um novo bioensaio com a fração RG44-19 recomposta a fim de comprovar o sinergismo das moléculas presentes. A recomposição da amostra foi feita pela junção da amostra RG44-19MPP e RG44-19MRG observando a relação de porcentagem entre as duas frações de 12:88, em termos de massa, obtida a partir dos pesos de RG44-19MPP e RG44-19MRG.

O termo sinergismo define-se como fenômeno químico do qual o efeito obtido pela ação combinada de duas substâncias químicas diferentes é maior do que a soma dos efeitos individuais das mesmas (SINERGIA... 2007)

Em outras palavras, Scott *et al.* (2002) disseram que o sinergismo se dá quando a toxicidade de um composto ou de uma mistura binária é aumentada pela adição de um composto individual, considerado muito menos tóxico ou sem nenhum efeito na mesma concentração.

Essa fração RG44-19 recomposta foi avaliada em 5 concentrações diferentes: 50; 10; 2; 0,4 e 0,08 µg/mL para as duas espécies de mosquitos *A. nuneztovari* e *A. albitarsis* mostrada na tabela 6.

Tabela 6. Porcentagem de mortalidade da fração RG44-19 recomposta para as duas espécies de mosquitos

Concentrações (µg/mL)	<i>A. nuneztovari</i>	<i>A. albitarsis</i>
50	100	100
10	100	96
2	10	3,3
0,4	0	0
0,08	0	0

Novos ensaios biológicos foram feitos com *A. nuneztovari*, obtendo-se assim valores de CL<sub>50</sub> para cada uma das frações estudadas (Tabela 7).

Tabela 7. Valores da CL<sub>50</sub> das frações em *A. nuneztovari*

Frações	Concentração Letal (CL <sub>50</sub> ) (µg/mL)
RG44-19MPP	16,9
RG44-19MRG	45,9
RG44-19 recomposta	5,3

Observou-se que a combinação da pelitorina (RG44-19MPP) com os componentes minoritários (RG44-19MRG) aumentou significativamente a mortalidade das duas espécies de mosquitos (Gráfico 1) indicando claramente a ocorrência do efeito sinérgico, assemelhando-se aquele observado por Scott *et al.* (2002) que avaliaram a atividade larvicida contra *Aedes atropalpus* L. em ensaios de amidas isoladas, em combinações binárias, terciárias e quaternárias, sugerindo que o potencial de mortalidade aumentou quando 3 ou mais amidas foram combinadas. Três amidas encontradas em *P. cenocladum* C. DC. estudadas por Dyer *et al.* (2003) apresentaram efeito sinérgico, assemelhando-se a esta dissertação.

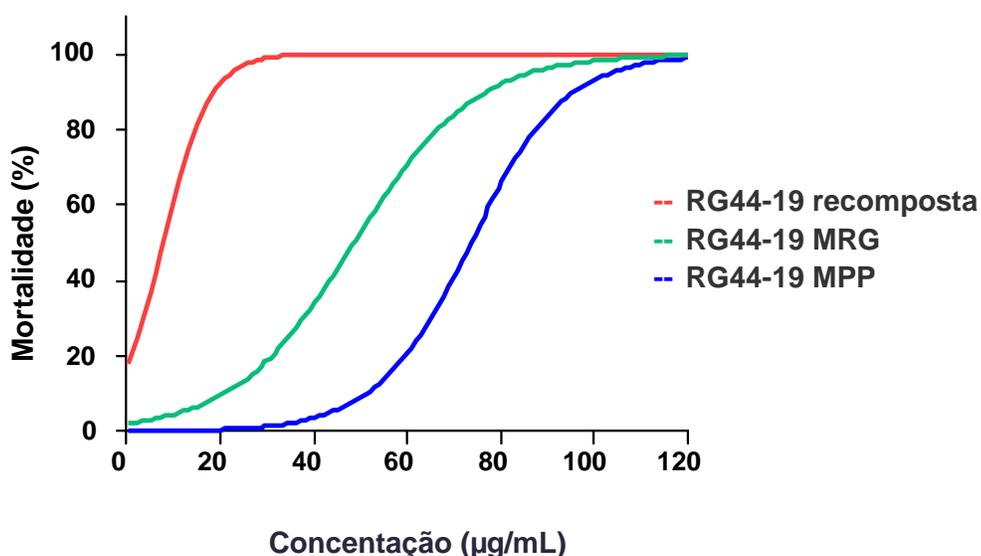


Gráfico 1. Análise sinérgica entre as moléculas separadas da fração RG44-19: RG44-19 recomposta, RG44-19MRG e RG44-19MPP.

O valor da CL<sub>50</sub> da fração RG44-19MPP pode estar superestimado, por causa do número limitado de concentrações que puderam ser testadas, tanto pela falta de larvas como de amostra.

#### 4.4.3.1 Elucidação estrutural de RG44-19MPP

A substância foi elucidada por meio de espectros monodimensionais de RMN  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  (Figura 2).

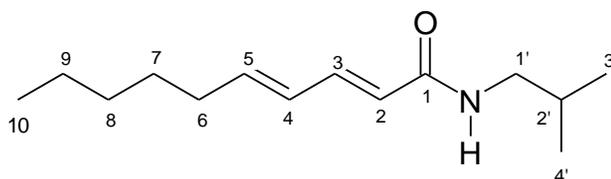


Figura 2. Pelitorina

No espectro de RMN  $^1\text{H}$ , observa-se sinais de 4 hidrogênios olefínicos, dois deles  $\delta$  7,20 e 5,75 típicos de um sistema carbonílico  $\alpha$ - $\beta$ -insaturado com configuração trans ( $J = 15$  Hz).

A presença da amida evidencia-se pelo sinal em  $\delta$  3,17 típico de um hidrogênio ligado a nitrogênio de amida. Observa-se ainda duas metilas em  $\delta$  0,95 e 0,94 com sinais em singletos. Os demais sinais também foram tabelados e apresentados a seguir.

Tabela 8. Deslocamentos químicos de  $^1\text{H}$  para pelitorina ( $\text{CDCl}_3$ ).

POSIÇÃO	$\delta$ $^1\text{H}$	J (500 MHz)	Mult	$\delta$ $^1\text{H}$	J (400 MHz)	Mult.
(Park <i>et al</i> , 2002)						
2	5,75	15	d	5,76	15	d
3	7,20	10,0 e 15	dd	7,19	15	d
4	6,82	-	m	6,09	-	m
5	6,10	-	m	6,09	-	m
6	2,15	7,0 – 7,5	dd	2,13	7 – 13,8	dd
7	1,44	-	m	1,37	-	m
8	1,29	-	m	1,28	-	m
9	1,29	-	m	1,28	-	m
10	0,89	-	s	0,88	-	s
1'	3,17	6,0 - 6,5	dd	3,16	6,4 – 12,9	t
2'	1,82	-	m	1,76	-	m
3'	0,94	-	s	0,91	-	s
4'	0,95	-	s	0,93	-	s

Os dados obtidos estão em concordância com aqueles publicados na literatura para a pelitorina (Park *et al*. 2002).

Nos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  (HBBD e DEPT 135), observou-se a presença de três carbonos metílicos, cinco metilênicos, cinco metínicos e um quaternário. O sinal em  $\delta$  166,7 indica a presença de uma carbonila de amida. Os sinais  $\delta$  121,8 e  $\delta$  141,6 confirmam a presença da ligação dupla conjugada com o sistema carbonílico. Uma segunda ligação dupla pôde ainda ser observada pela presença dos sinais em  $\delta$  128,3 e 128,4.

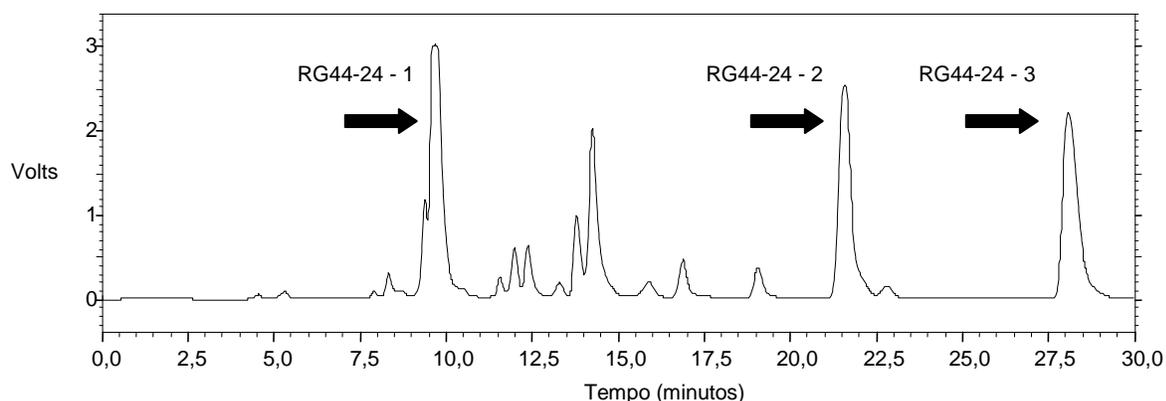
Tabela 9. Deslocamentos químicos de  $^{13}\text{C}$  para pelitorina ( $\text{CDCl}_3$ ).

POSIÇÃO	$\delta^{13}\text{C}$	Mult.	$\delta^{13}\text{C}$ (Park <i>et al.</i> , 2002)
1	166.70	C	166.40
2	121.80	CH	121.76
3	141.60	CH	141.27
4	128.30	CH	128.20
5	128.40	CH	128.20
6	33.1	$\text{CH}_2$	32.92
7	28.70	$\text{CH}_2$	28.49
8	31.60	$\text{CH}_2$	31.37
9	22.70	$\text{CH}_2$	22.47
10	14.20	$\text{CH}_3$	14.01
1'	47.20	$\text{CH}_2$	46.92
2'	28.76	CH	28.63
3'	20.33	$\text{CH}_3$	20.13
4'	20.30	$\text{CH}_3$	20.13

A comparação tanto dos sinais de hidrogênio, quanto de carbono com os espectros dados da literatura, permitem a identificação da substância como sendo a pelitorina, já anteriormente isolada de *P. tuberculatum* (Park *et al.*, 2002 e Navickiene *et al.*, 2000).

#### 4.4.4 Análise da fração RG44-24

Utilizou-se 0,2106 g da fração RG44-24 para ser analisada por CLAE e separada em três novas amostras: RG44-24-1, RG44-24-2 e RG44-24-3, sendo estas os componentes majoritários da fração original com os seguintes rendimentos: 0,0060; 0,0310 e 0,0058 g respectivamente. A análise pelo cromatógrafo foi feita pelo seguinte método: 0 – 30 minutos, 65:35 (MeOH/ $\text{H}_2\text{O}$ ), isocrático com fluxo de 10 mL/minuto (Cromatograma 2).



Cromatograma 2. Separação da fração RG44-24 em três componentes majoritários. Observação feita no comprimento de onda de 270 nm.

Testes biológicos foram feitos com larvas de 3<sup>o</sup> estágio de *A. nuneztovari* e *A. albicansis* demonstrando atividade larvicida moderada de 33% e 37%, a 50 µg/mL para a fração RG44-24-2. As demais frações coletadas não apresentaram atividade larvicida para as duas espécies de *Anopheles* a 50 µg/mL. Devido à baixa atividade, a quantidade disponível e a pureza das amostras, não foi possível elucidar as estruturas das frações RG44-24-2 e RG44-24-3.

#### 4.4.4.1 Elucidação estrutural de RG44-24 –1

A amostra RG44-24-1 foi isolada na forma de cristais brancos. A sua estrutura foi determinada com base na análise dos espectros de RMN <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C ( e DEPT 135) (Figura 3).

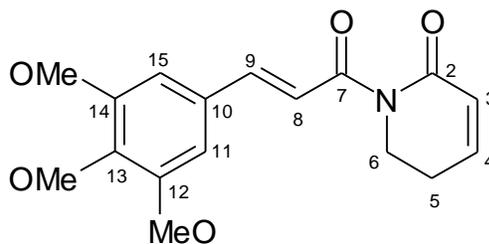


Figura 3. Piplartina

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  apresenta dois sinais de hidrogênios olefinicos  $\delta$  6,94 e 6,04 em configuração cis e dois outros  $\delta$  7,67 e 7,42 em configuração trans ( $J = 15,5$  Hz). Um par de hidrogênios metilênicos em  $\delta$  4,04 indica presença de uma amida. Observa-se ainda um sinal de hidrogênio a  $\delta$  6,80 correspondente a um anel aromático simétrico tetrasubstituído. Pôde-se observar ainda sinais correspondentes a três grupos metoxilas entre  $\delta$  3,88 e 3,87.

Os demais sinas foram tabelados e comparados com os dados na literatura para a piplartina (Tabela 10).

Tabela 10. Deslocamento químico de  $^1\text{H}$  para piplartina ( $\text{CDCl}_3$ ).

<b>POSIÇÃO</b>	<b><math>\delta</math> <math>^1\text{H}</math></b>	<b>J (Hz)</b>	<b>Mult.</b>	<b><math>\delta</math> <math>^1\text{H}</math> (Duh <i>et al.</i>, 1990)</b>	<b>J (Hz)</b>	<b>Mult.</b>
3	6,04	2,0; 10	dt	6,02	9,7 – 1,8	dt
4	6,94	9,5; 10	dt	6,95	9,7 – 4,2	dt
5	2,48	-	m	2,45	-	m
6	4,04	6,5	t	4,04	6,3	t
8	7,42	15,5	d	7,41	15,6	d
9	7,67	15,5	d	7,68	15,6	d
11	6,80	-	s	6,80	-	s
15	6,80	-	s	6,80	-	s
-OMe	3,87 – 3,88	-	s, s, s	3,87 – 3,88	-	s, s

Os espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  mostram a presença de sinais correspondentes a 3 carbonos metílicos (sinais sobrepostos), dois metilênicos, seis metínicos e seis quaternários.

Os carbonos metílicos correspondem a três metoxilas ligadas ao anel aromático trioxigenado nas posições 12, 13 e 14, resultando num sistema simétrico ( $\delta$  130,9, 105,4, 153,6 e 145,1). O grupo amida pode ser confirmado pela presença da carbonila com sinal em  $\delta$  169,1 conjugada com uma ligação dupla em  $\delta$  144,1 e 121,3. Além disso, observou-se outra carbonila em  $\delta$  166,1 também conjugada com outra ligação dupla  $\delta$  145,8 e 126,0 e ligado a nitrogênio. A presença da amida também é confirmada pela presença do metileno em  $\delta$  41,9. Todos os sinais foram tabelados e mostraram ser semelhantes àqueles publicados para a piplartina, também anteriormente isolada dos frutos de *P. tuberculatum* (Tabela 11).

Tabela 11. Deslocamentos químicos de  $^{13}\text{C}$  para piplartina ( $\text{CDCl}_3$ ).

POSIÇÃO	$\delta$ $^{13}\text{C}$	Mult.	$\delta$ $^{13}\text{C}$ (Duh <i>et al.</i> , 1990)
2	166,1	C	166,7
3	126,0	CH	126,5
4	145,8	CH	146,4
5	25,0	$\text{CH}_2$	25,2
6	41,9	$\text{CH}_2$	42,1
7	169,1	C	169,7
8	121,3	CH	121,7
9	144,1	CH	144,5
10	130,9	C	131,3
11	105,7	CH	106,0
12	153,6	C	154,1
13	145,1	C	141,5
14	153,6	C	154,1
15	105,4	CH	106,0
-OMe	56,4	$\text{CH}_3$	56,6
-OMe	61,2	$\text{CH}_3$	61,5

## CONCLUSÕES

Os resultados do isolamento biomonitorado com ensaios biológicos de *A. nuneztovari* e *A. albitarsis* permitiram o isolamento de duas amidas com moderada e baixa atividade larvicida, respectivamente, pelitorina e piplartina.

Observou-se a perda da atividade larvicida durante o trabalho de fracionamento, evidenciando o efeito sinérgico entre as moléculas, comprovado pelo experimento realizado. Esse é o primeiro relato da atividade sinérgica da pelitorina.

A espécie estudada, *P. tuberculatum*, é sugerida como alternativa inseticida promissora, enfocando o fracionamento e isolamento das substâncias ativas, através dos quais novos testes deverão determinar a letalidade a outros grupos de organismos prejudiciais.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALÉCIO, A.C. *et al.* **Antifungal amide from leaves of *Piper hispidum***. *Journal of Natural Products*, v. 61, pp. 637–639, 1998.

ARAÚJO-JÚNIOR, J.X. *et al.* **Piperdardine, a piperidine alkaloid from *Piper tuberculatum***. *Phytochemistry*, v. 44, n. 3, 559-561, 1996.

ARAÚJO-JÚNIOR, J.X. *et al.* **Cepharanone B from *Piper tuberculatum***. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 27, 325-327, 1999.

BERNARD, C.B. *et al.* **Insecticidal defenses of Piperaceae from the Neotropics**. *Journal of Chemical Ecology*, v. 21, n. 6, 1995.

BRAZ-FILHO, R. SOUZA, M.P. e MATTOS, M.E.O. **Piplartine-dimer A, a new alkaloid from *Piper tuberculatum***. *Phytochemistry*, v. 20, 345-346, 1981.

CAPRON, M.A. e WIEMER, D.F. **Piplaroxide, an ant-repellent piperidine epoxide from *Piper tuberculatum***. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 59, 794-795, 1996.

CHAVES, M.C. de O., ARAÚJO-JÚNIOR, G. de F. e SANTOS, B.V. de O. **Amides from *Piper tuberculatum* fruits**. *Fitoterapia*, v. 74, 181-183, 2003.

CROMATOLOGRAFIA. Disponível em: <http://www.tele.ed.nom.br/croma0p.html>. Acessado em 05/03/2007.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L. e BONATO, P.S. **Introdução a métodos cromatográficos**. 5ª ed. Campinas: Editora da Unicamp, 1993.

DEGANI, A.L.G.; CASS, Q.B. e VIEIRA, P.C. **Cromatografia um breve ensaio.** Química Nova na Escola, nº7, 1998.

DUH, C.; WU, Y. e WANG, S. **Cytotoxic pyridone alkaloids from *Piper arborences*.** *Phytochemistry*, v. 29, n. 8, pp. 2689 – 2691, 1990.

FINNEY, D.J. **Probit analysis.** London, Cambridge University, 333 p, 1971.

GBEWONYO, W. S. K., D. J. CANDY, *et al.* **Structure-activity relationships of insecticidal amides from *Piper guineense* root.** *Pesticide Science*, 37(1): 57-66. {a} Sch. Biochem., Univ. Birmingham, Birmingham B15 2TT, UK , 1993.

GUIMARAES, E.F. e GIORDANO, L.C.S. **Piperaceae do Nordeste brasileiro I: estado do Ceará.** *Rodriguésia*, v. 55 (84): 21-46, 2004.

HOSTETTMANN K . **Assays for Bioactivity.** Methods in Plant Biochemistry, v. 6, Academic Press, San Diego, 360 pp, 1991.

ISAO, K. **Molluscicidal and insecticidal activities of isobutylamides isolated from *Fagara macrophylla*.** *Experientia*, v. 40, p. 340-341, 1984.

KIUCHI, F. *et al.* **Studies on crude drugs effective on visceral larvamigrans. IV. Isolation and identification of larvicidal principles in pepper.** *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, v. 36, 2452-2465, 1988.

MATSUI K. & MUNSKATA, K. **The structure of piperone, a new insect antifeedant substance from *Piper futokadzura*.** *Tetrahedron Lett.*, p. 1905-1908, 1975.

McLAUGHLIN, J.L.; CHANG, C. e SMITH, D.L. **“Bench-top”**. **Bioassays for the discovery of bioactive natural products: an update**. In; Studies in Natural Products Chemistry. *Elsevier Science*, v. 9, p. 383-409, 1991.

MIRANDA, J.E. *et al.* **Susceptibility of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) to pellitorine, an amide isolated from *Piper tuberculatum* (Piperaceae)**. *Apidologie* v. 34, 409-415, 2003.

MIYAKADO, M. *et al.* **Structure chemistry and action of the Piperaceae amides: new insecticidal constituents isolated from the *Piper* plant**. London: *Pergamon Press*, p. 369-381, 1989.

NAVICKIENE, H.M.D. *et al.* **Antifungal amides from *Piper hispidum* and *Piper tuberculatum***. *Phytochemistry*, v. 55, 621-626, 2000.

NAVICKIENE, H.M.D. *et al.* **Antifungal amides from *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum***. *Phytochemistry*, v. 59: 521-527, 2002.

NAVICKIENE, H.M.D. *et al.* **Toxicity of extracts and isobutyl amides from *Piper tuberculatum*: potent compounds with potential for the control of velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis***. *Pest Management Science*, v. 63: 399-403, 2007.

PARK, I. *et al.* **Larvicidal activity of isobutylamides identified in *Piper nigrum* fruits against three mosquito species**. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 50, 1866-1870, 2002.

PARMAR, V.S. *et al.* **Phytochemistry of the genus *Piper***. *Phytochemistry*, v. 46, 597-673, 1997.

ROMEO, J. T.; SAUNDERS, J.A e BARBOSA, P. **Phytochemical diversity and redundancy in ecological interactions.** In: Recent advances in phytochemistry; Plenum Press: New York, NY, v. 30, 319 pp., 1996.

SCOTT, I.M. *et al.* **Insecticidal activity of *Piper tuberculatum* Jacq. Extracts: synergistic interaction of piperamides.** *Agricultural and Forest Entomology*, v. 4, 137-144, 2002.

SCOTT, I.M. *et al.* **Analysis of Piperaceae germplasm by HPLC and LCMS: a method for isolating and identifying unsaturated amides from *Piper* spp extracts.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, 1907-1913, 2005.

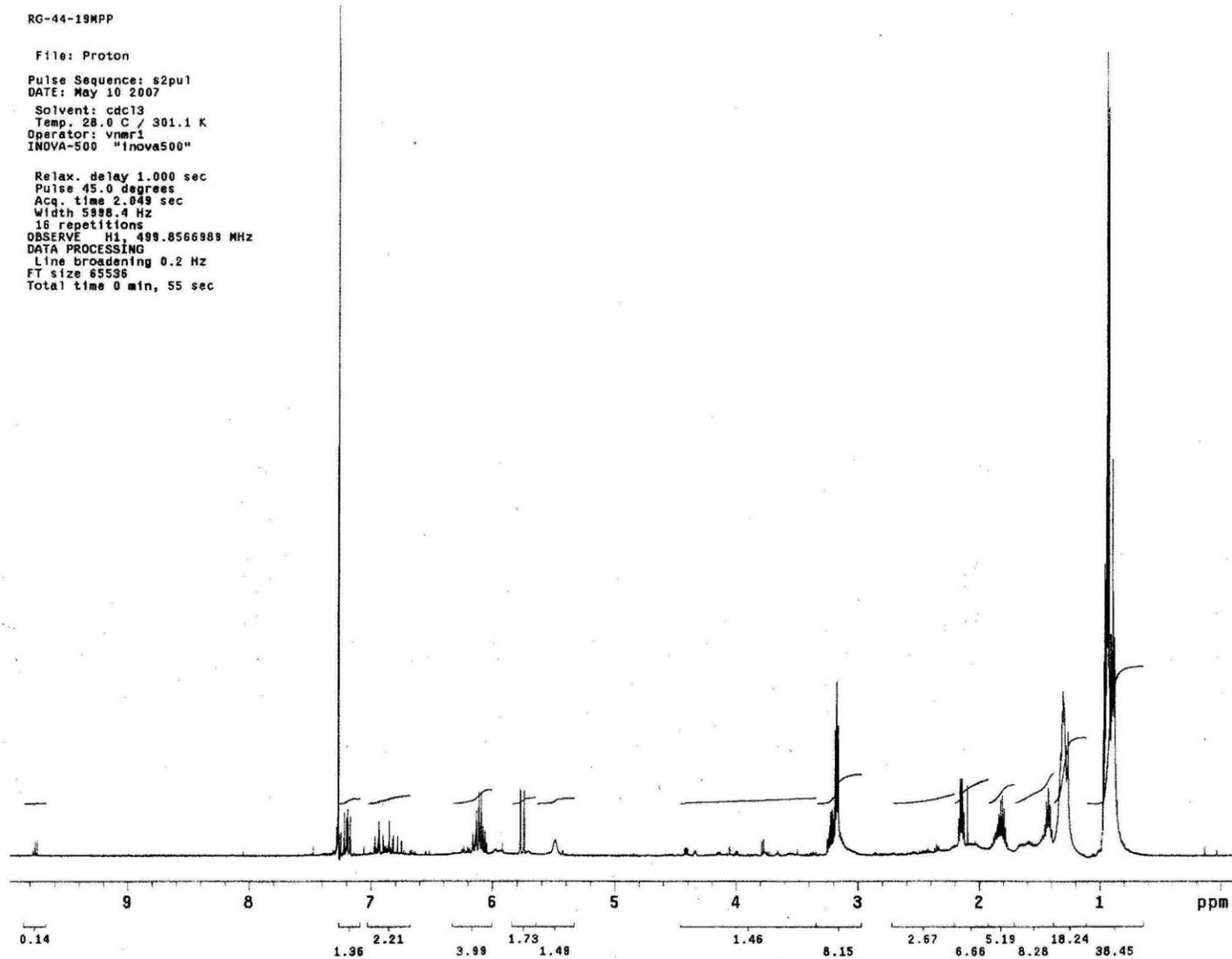
SCOTT, I.M. *et al.* **A review of *Piper* spp. (Piperaceae) phytochemistry, insecticidal activity and mode of action.** *Phytochemistry Reviews*, 2007.

SINERGIA, SINERGISMO. Rede Ambiente. 2007. Disponível em: <http://www.redeambiente.org.br>. Acesso em: 11/09/2007.

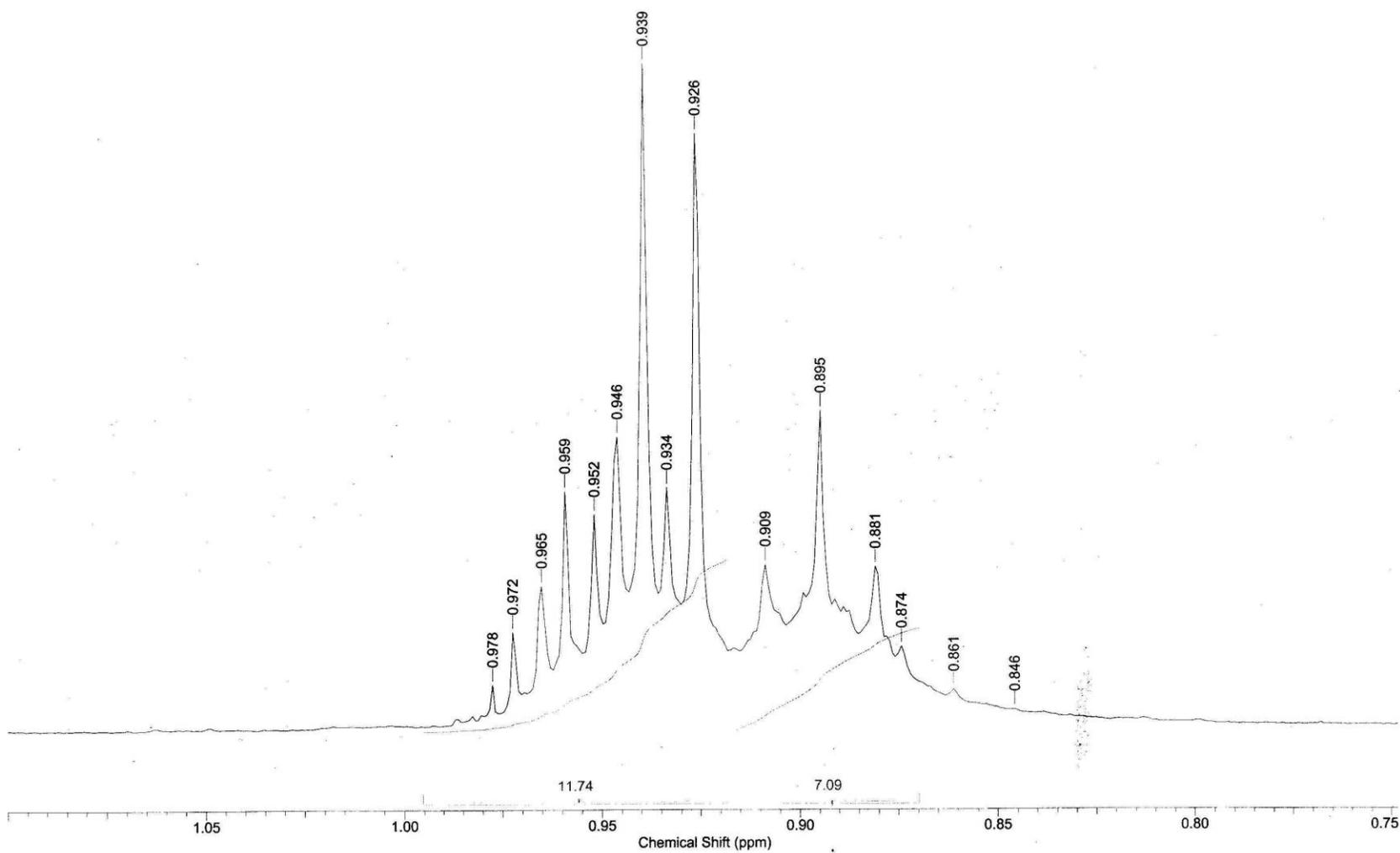
SILVA, R.V. *et al.* **Antifungal amides from *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*.** *Phytochemistry*, v. 59, 521-527, 2002.

WAGNER, H. & BLADT, S. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas** – 2<sup>nd</sup> ed., 1996.

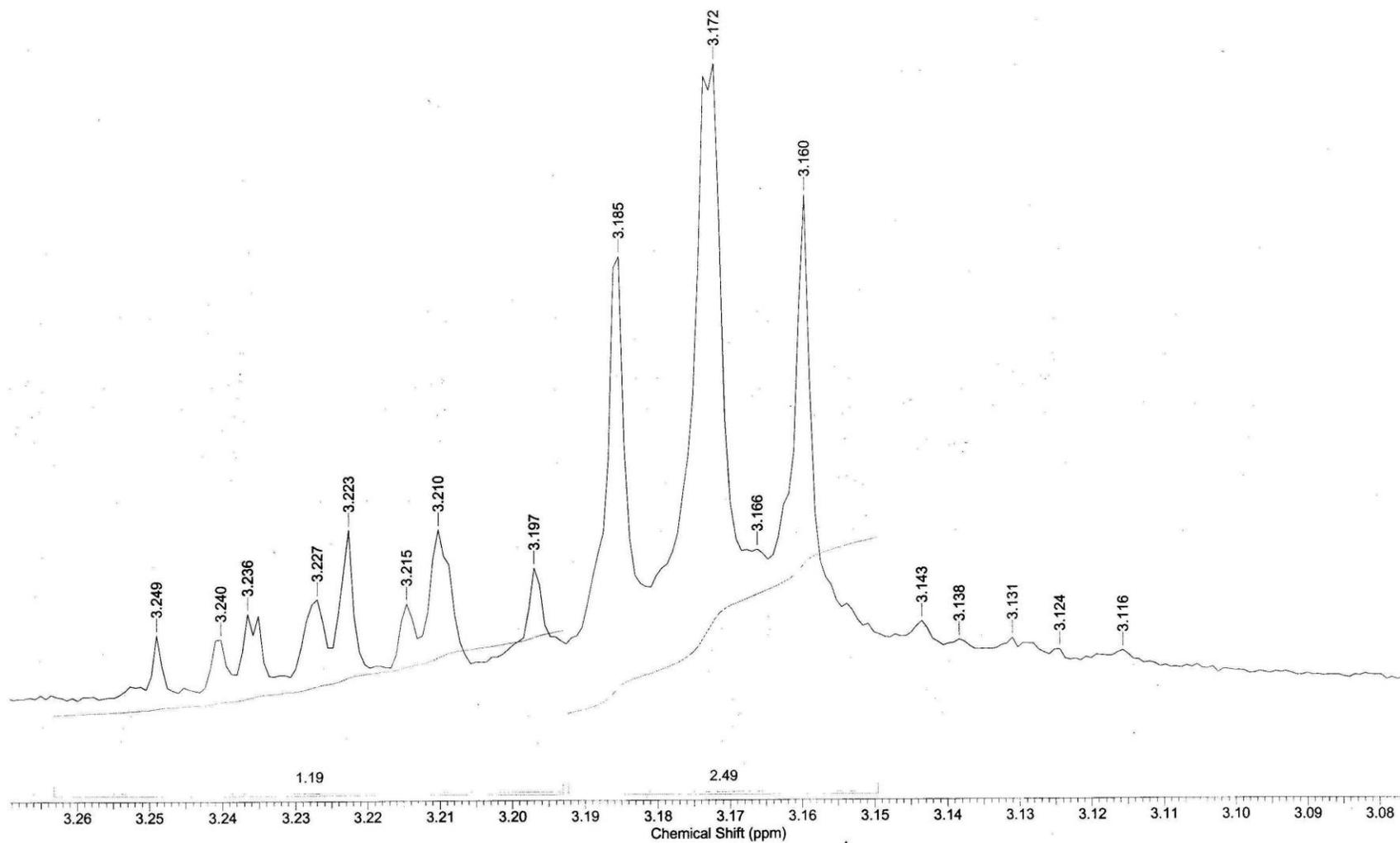
**ANEXO A – Espectros de  $^1\text{H}$  da fração RG44-19MPP**

Figura 4. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da pelitorina

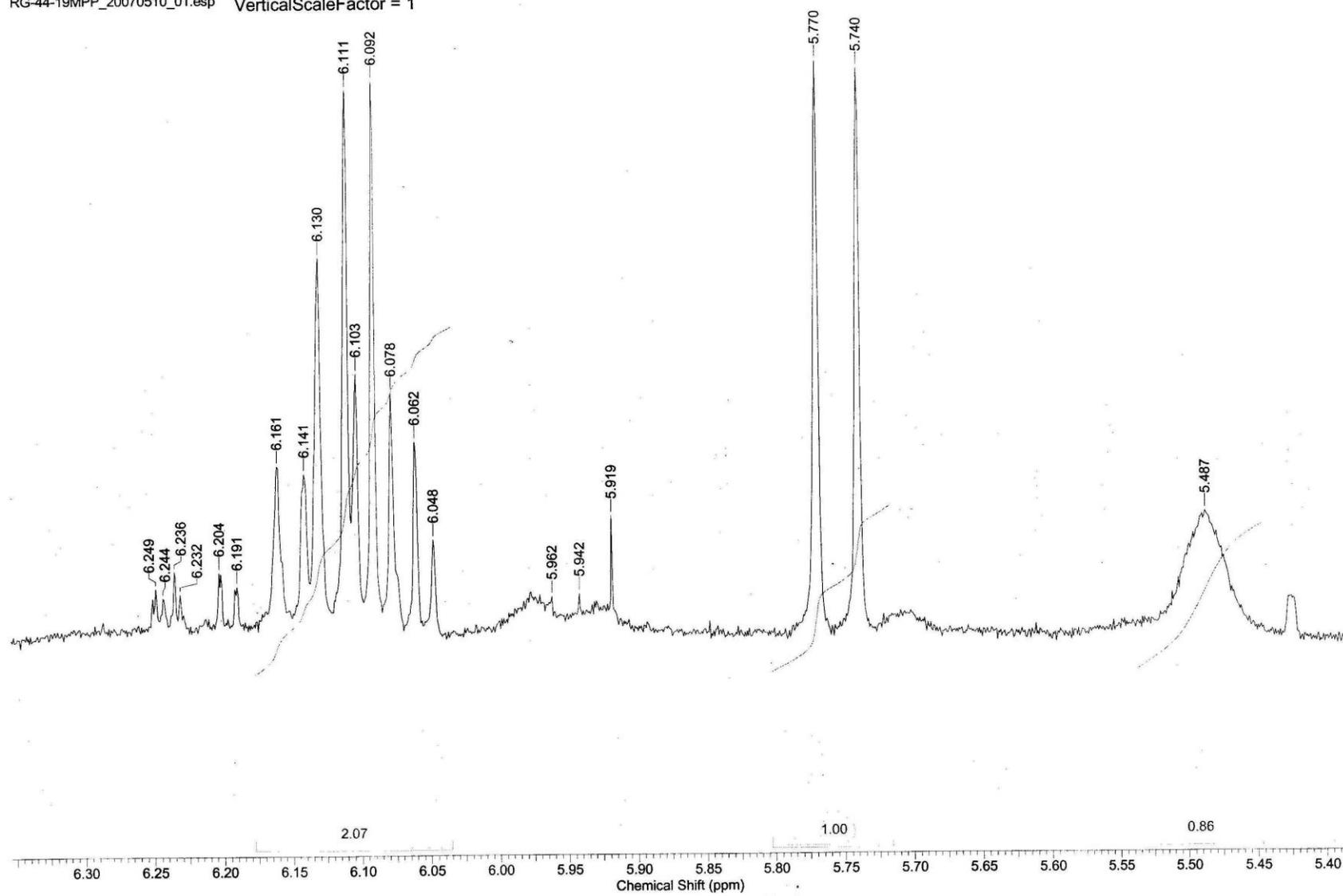
RG-44-19MPP\_20070510\_01.esp VerticalScaleFactor = 1

Figura 5. Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da pelitorina

RG-44-19MPP\_20070510\_01.esp VerticalScaleFactor = 1

Figura 6. Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da pelitorina

RG-44-19MPP\_20070510\_01.esp VerticalScaleFactor = 1

Figura 7. Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da pelitorina

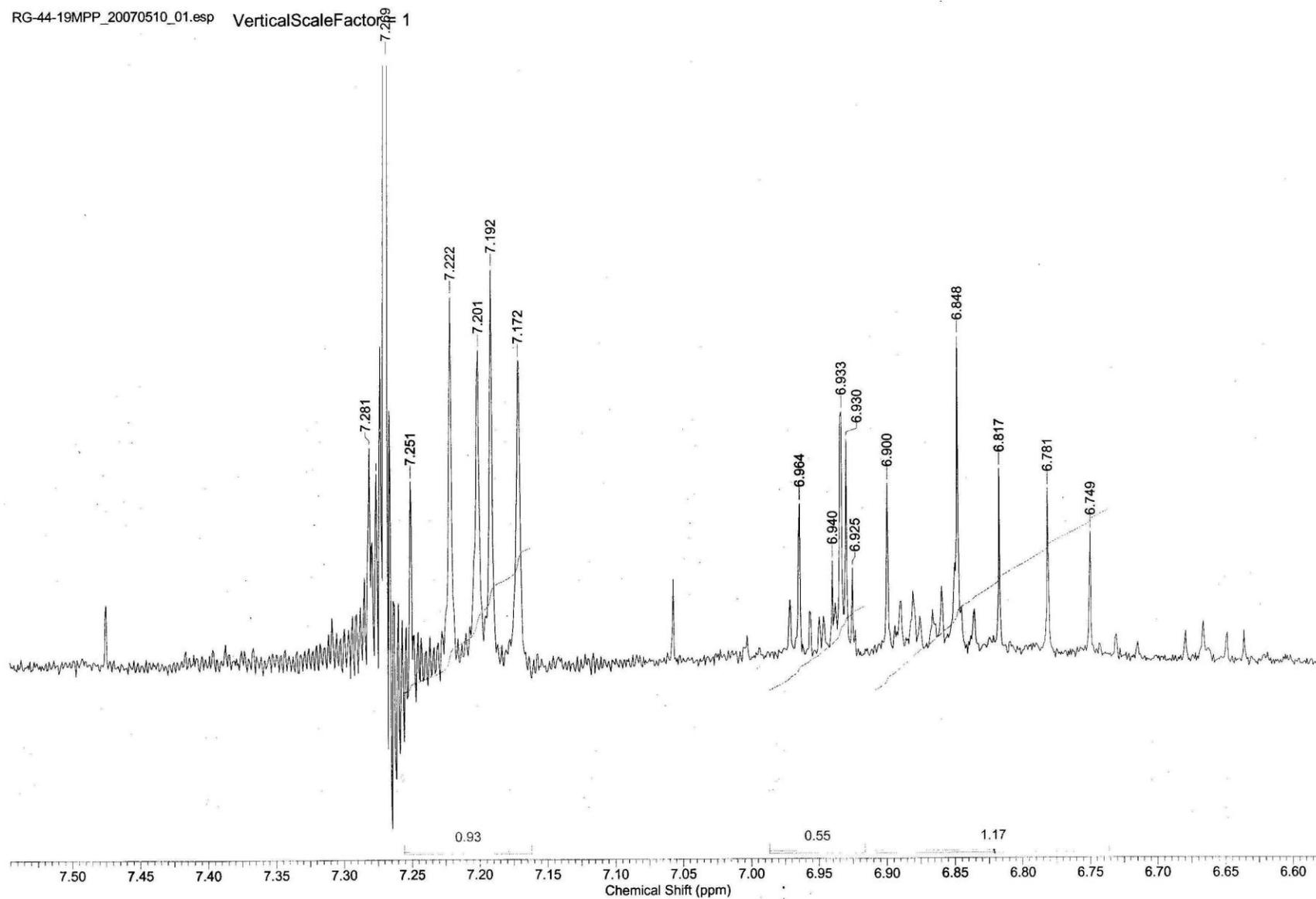
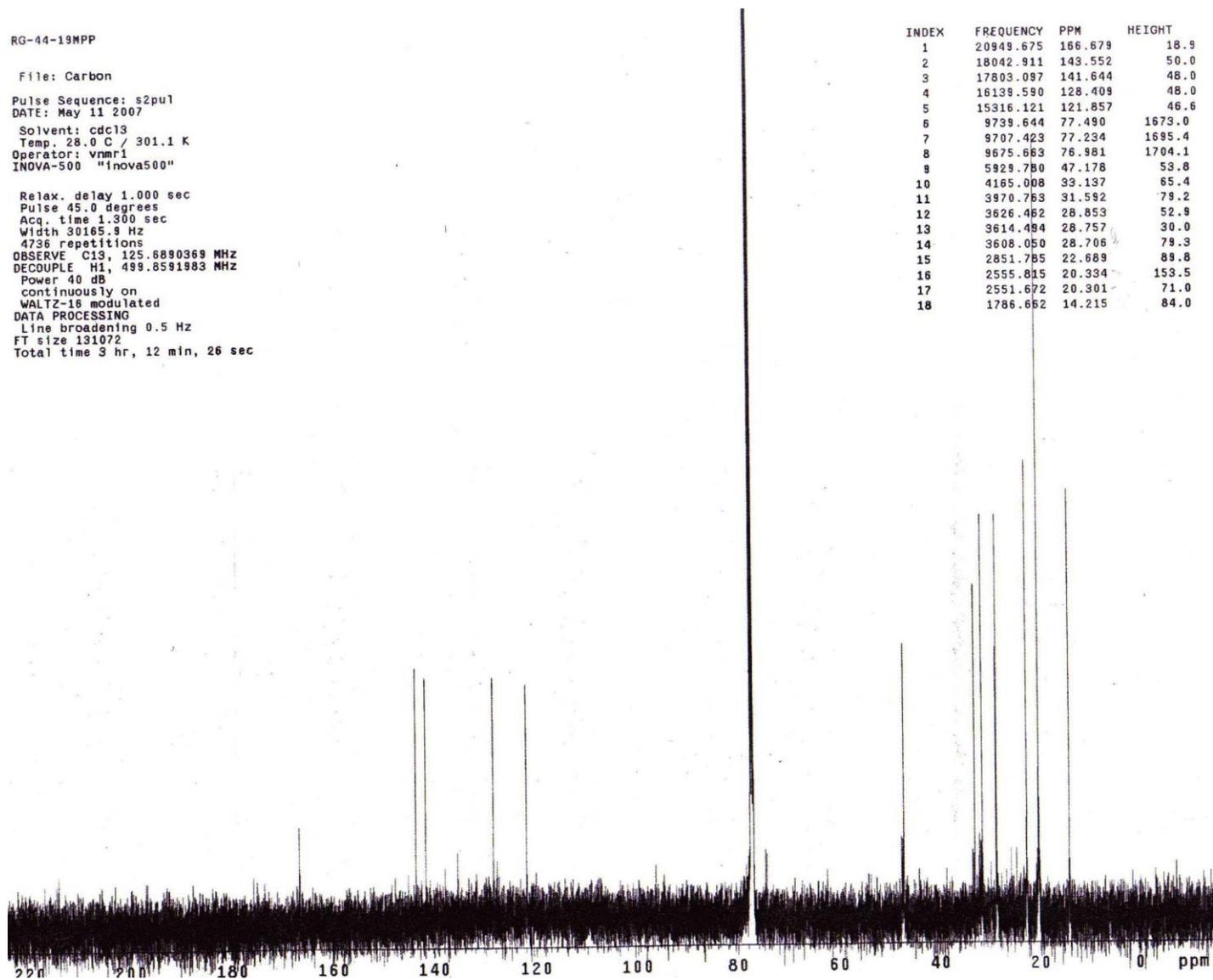


Figura 8. Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da pelitorina

**ANEXO B** – Espectros de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 da fração RG44-19MPP

Figura 9. Espectro HBBB de RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da pelitorina

Heteronuclear polarization transfer experiment  
RG-44-19MPP

File: Dept

Pulse Sequence: DEPT

DATE: May 14 2007

Solvent: cdc13

Temp. 28.0 C / 301.1 K

Operator: vmm1

INOVA-500 "inova500"

Relax. delay 1.000 sec

Pulse 90.0 degrees

Acq. time 1.000 sec

Width 25141.4 Hz

4672 repetitions

OBSERVE C13, 125.6890369 MHz

DECOUPLE H1, 499.8591983 MHz

Power 40 dB

on during acquisition

off during delay

WALTZ-16 modulated

DATA PROCESSING

Line broadening 1.0 Hz

FT size 65536

Total time 2 hr, 48 min, 37 sec

INDEX	FREQUENCY	PPM	HEIGHT
1	18043.113	143.554	26.6
2	17803.729	141.649	23.0
3	16138.785	128.402	25.6
4	15315.520	121.852	30.2
5	11311.982	90.000	13.8
6	9732.971	77.437	12.6
7	9374.663	74.586	9.4
8	9341.671	74.324	8.6
9	5940.428	47.263	-11.8
10	5828.686	47.177	-44.3
11	4164.999	33.137	-35.3
12	4018.454	31.971	-8.5
13	3970.884	31.593	-32.7
14	3626.386	28.852	27.4
15	3607.972	28.706	-15.3
16	3597.998	28.626	8.1
17	2852.226	22.693	-29.9
18	2556.065	20.336	101.4
19	2552.229	20.306	33.4
20	1787.275	14.220	34.6

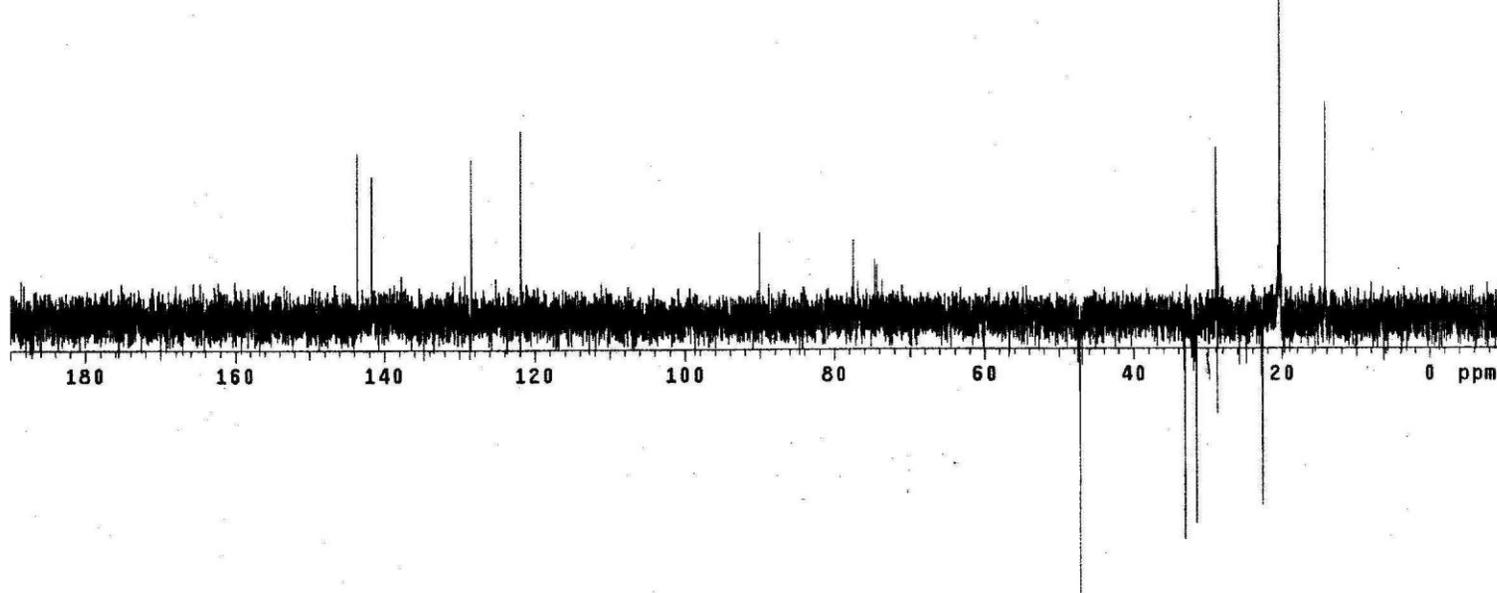


Figura 10. Espectro DEPT 135 de RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da pelitorina

**ANEXO C – Espectros de  $^1\text{H}$  da fração RG44-24-1**

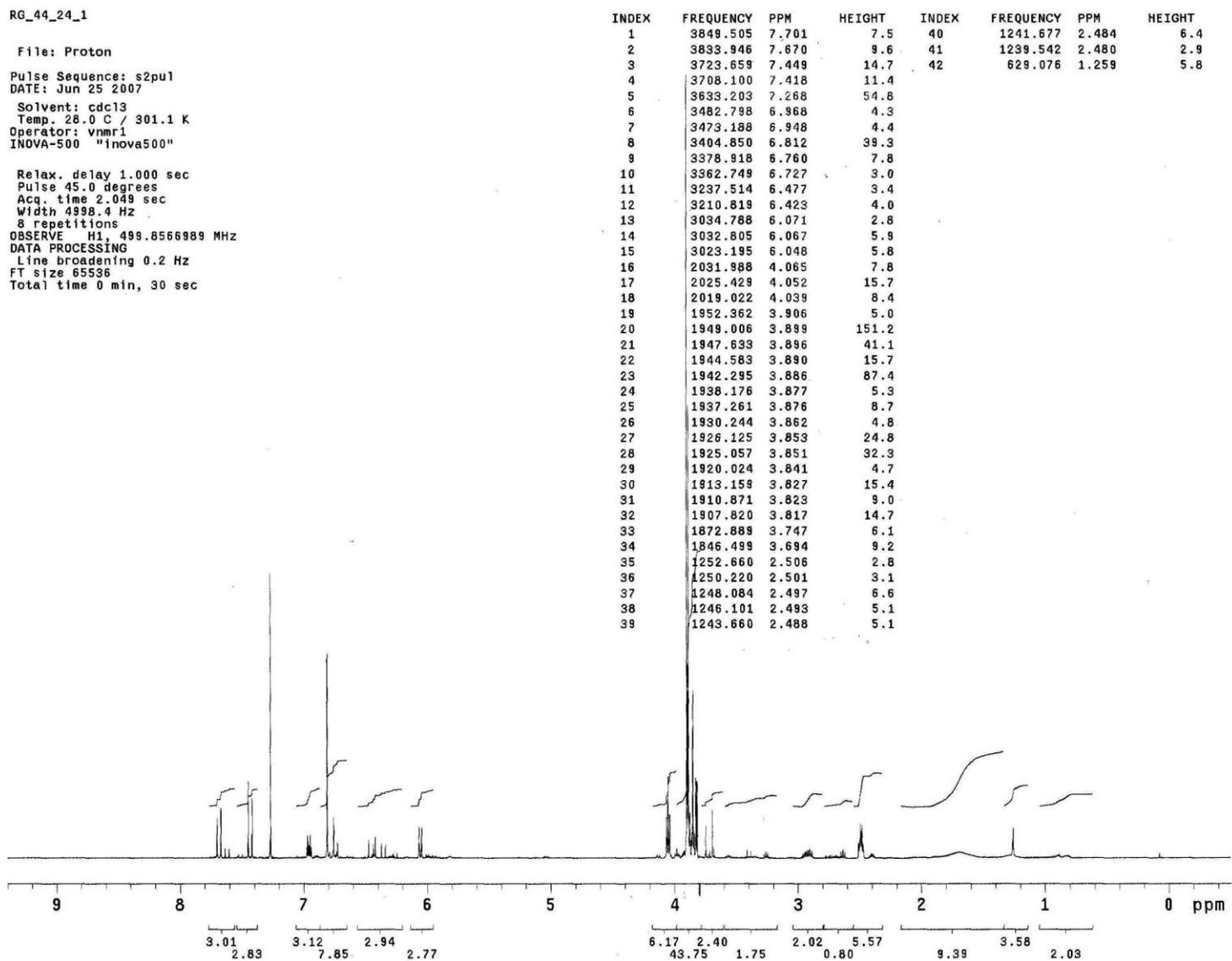


Figura 11. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da piplartina

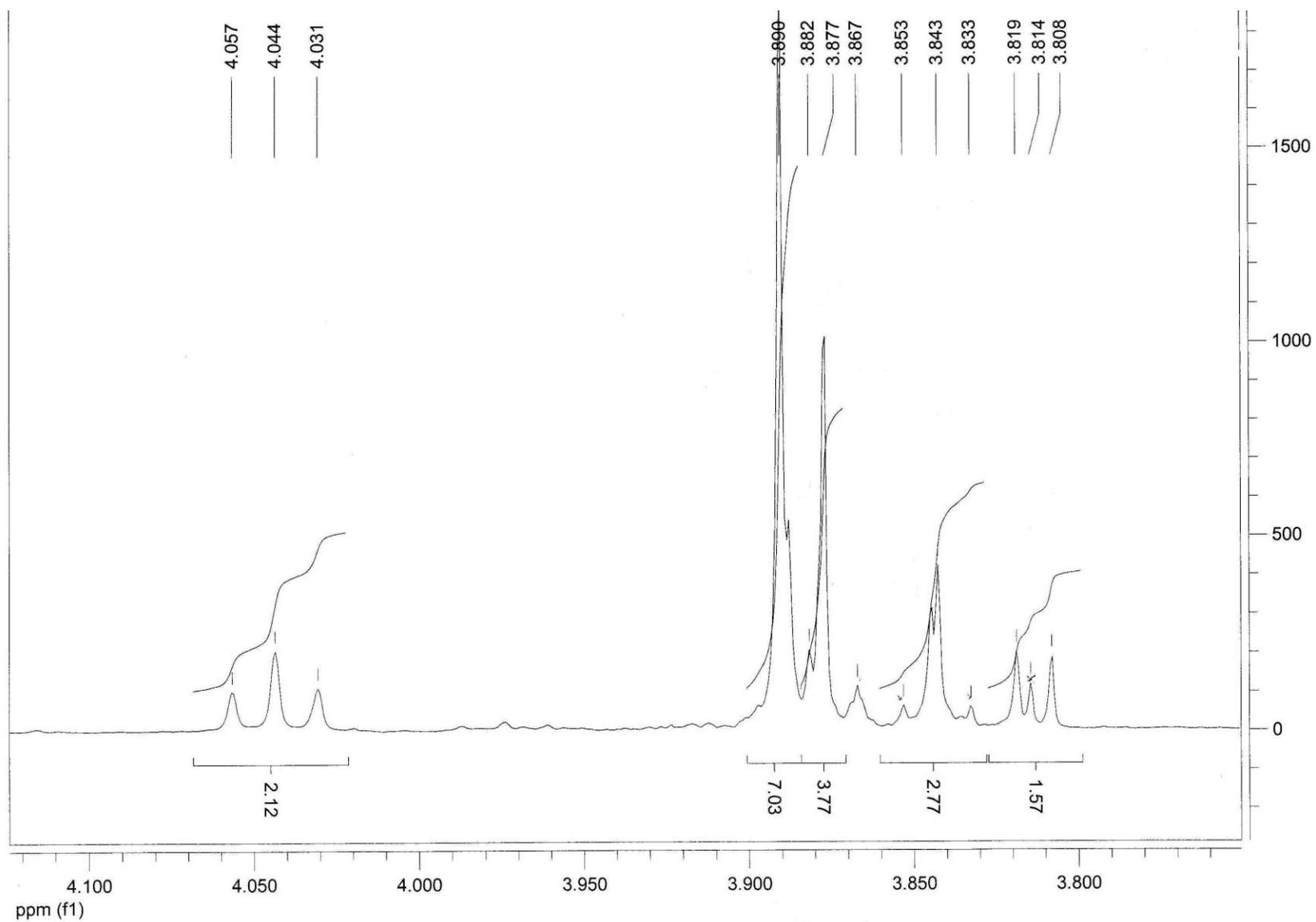
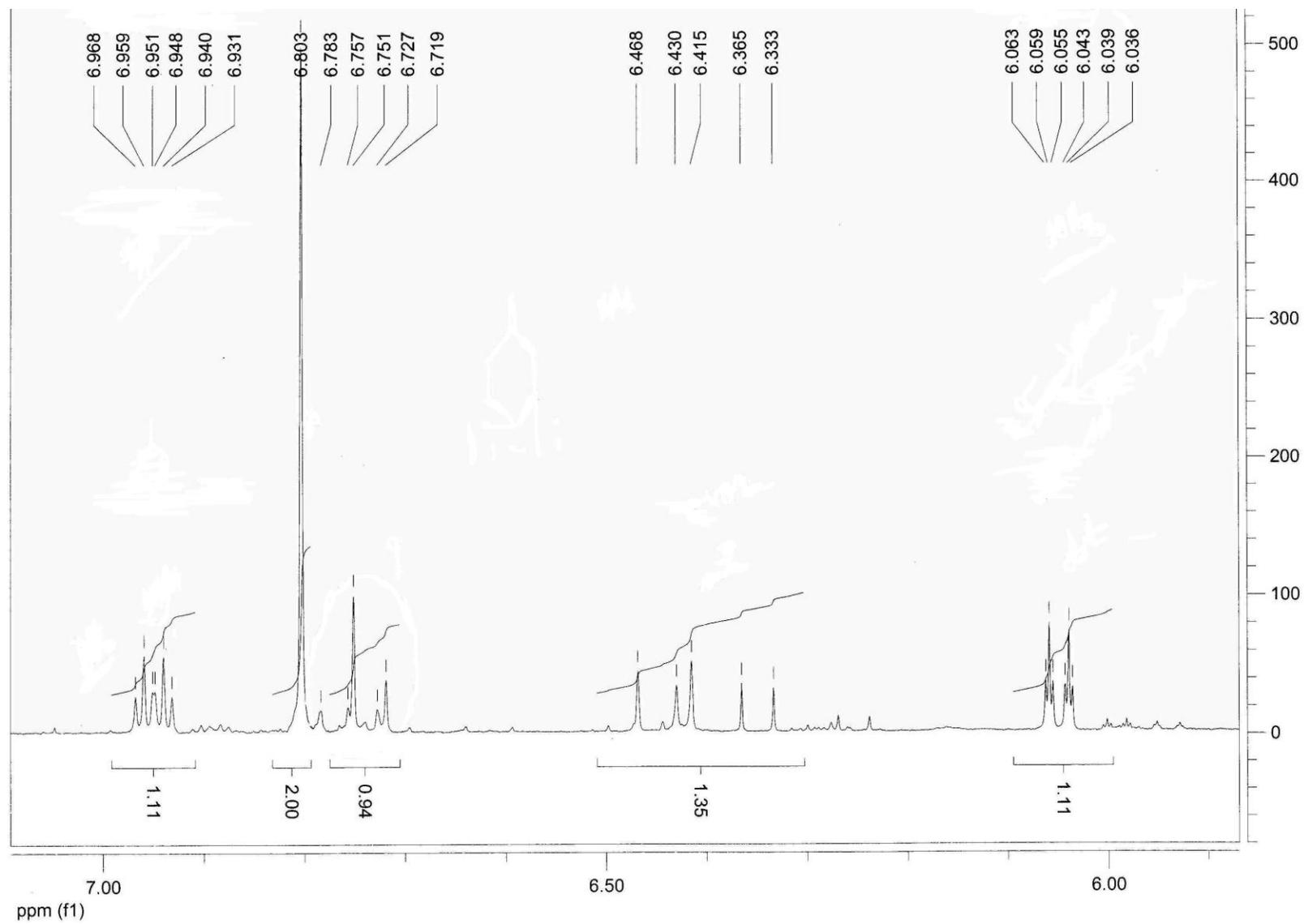


Figura 12. Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da piplartina

Figura 13. Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da piplartina

**ANEXO D – Espectros de  $^{13}\text{C}$  da fração RG44-24-1**

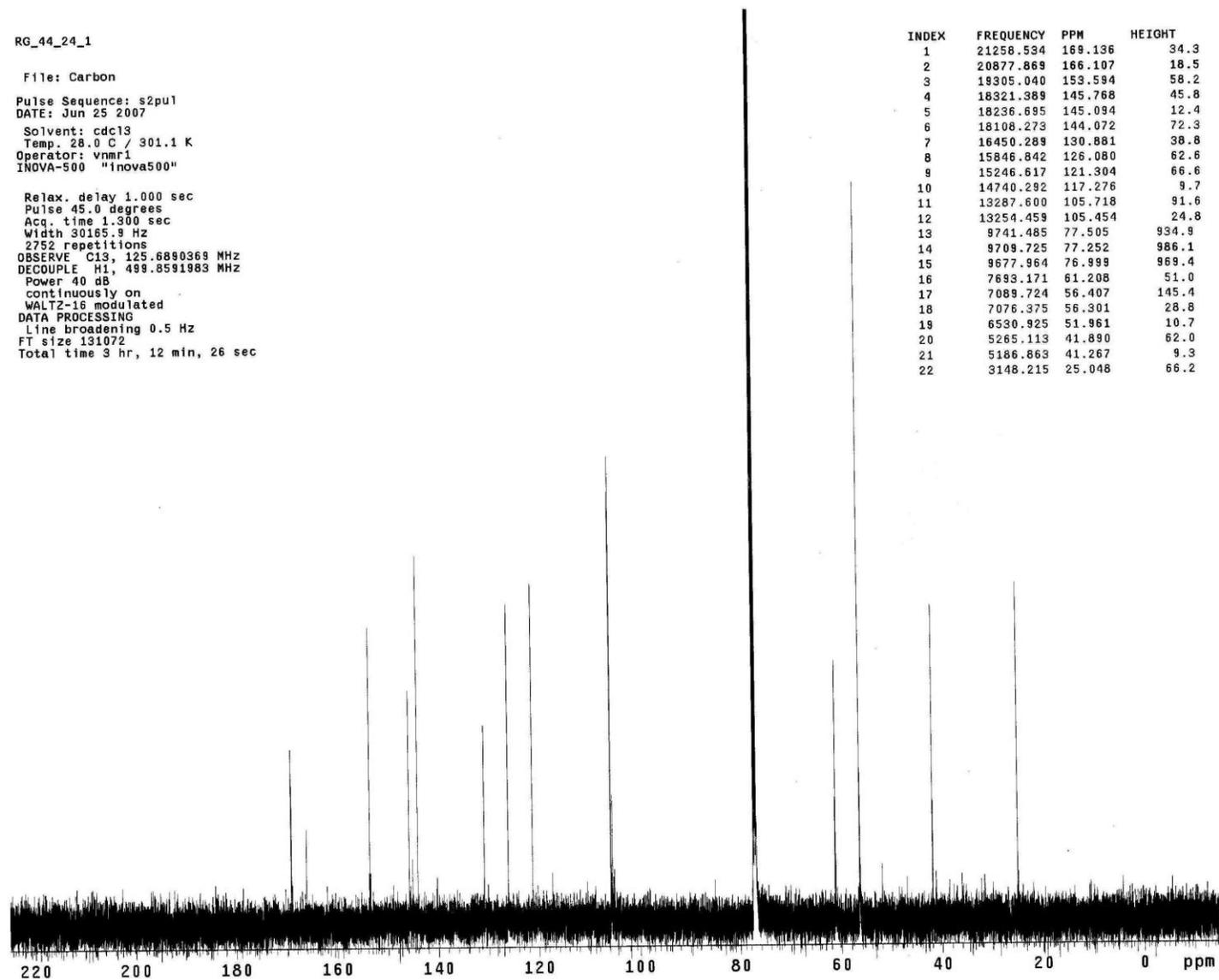
RG\_44\_24\_1

File: Carbon

Pulse Sequence: s2pu1  
DATE: Jun 25 2007  
Solvent: cdcl3  
Temp. 28.0 C / 301.1 K  
Operator: vnmr1  
INOVA-500 "inova500"

Relax. delay 1.000 sec  
Pulse 45.0 degrees  
Acq. time 1.300 sec  
Width 30165.3 Hz  
2752 repetitions  
OBSERVE C13, 125.6890369 MHz  
DECOUPLE H1, 499.8591983 MHz  
Power 40 dB  
continuously on  
WALTZ-16 modulated  
DATA PROCESSING  
Line broadening 0.5 Hz  
FT size 131072  
Total time 3 hr, 12 min, 26 sec

INDEX	FREQUENCY	PPM	HEIGHT
1	21258.534	169.136	34.3
2	20877.869	166.107	18.5
3	19305.040	153.594	58.2
4	18321.389	145.768	45.8
5	18236.695	145.094	12.4
6	18108.273	144.072	72.3
7	16450.289	130.881	38.8
8	15846.842	126.080	62.6
9	15246.617	121.304	66.6
10	14740.292	117.276	9.7
11	13287.600	105.718	91.6
12	13254.459	105.454	24.8
13	9741.485	77.505	934.9
14	9709.725	77.252	986.1
15	9677.964	76.999	989.4
16	7693.171	61.208	51.0
17	7089.724	56.407	145.4
18	7076.375	56.301	28.8
19	6530.925	51.961	10.7
20	5265.113	41.890	62.0
21	5186.863	41.267	9.3
22	3148.215	25.048	66.2

Figura 14. Espectro HBBP de RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da piplartina

Heteronuclear polarization transfer experiment  
RG\_44\_24\_1

File: Dept

Pulse Sequence: DEPT  
DATE: Jun 25 2007  
Solvent: cdc13  
Temp. 28.0 C / 301.1 K  
Operator: vnmr1  
INOVA-500 "inova500"

Relax. delay 1.000 sec  
Pulse 90.0 degrees  
Acq. time 1.000 sec  
Width 25141.4 Hz  
2752 repetitions  
OBSERVE C13, 125.6890369 MHz  
DECOUPLE H1, 499.8591983 MHz  
Power 40 dB  
on during acquisition  
off during delay  
WALTZ-16 modulated  
DATA PROCESSING  
Line broadening 1.0 Hz  
FT size 65536  
Total time 2 hr, 48 min, 37 sec

INDEX	FREQUENCY	PPM	HEIGHT
1	18321.626	145.769	23.2
2	18108.329	144.072	30.5
3	15847.228	126.083	27.4
4	15247.234	121.308	36.1
5	13288.432	105.725	72.4
6	13255.440	105.462	19.4
7	9734.505	77.449	6.7
8	7682.839	61.205	26.7
9	7089.776	56.407	93.5
10	7076.733	56.304	17.6
11	6590.447	51.957	6.4
12	5265.243	41.891	-40.6
13	4911.539	39.077	-6.1
14	3148.386	25.049	-43.2

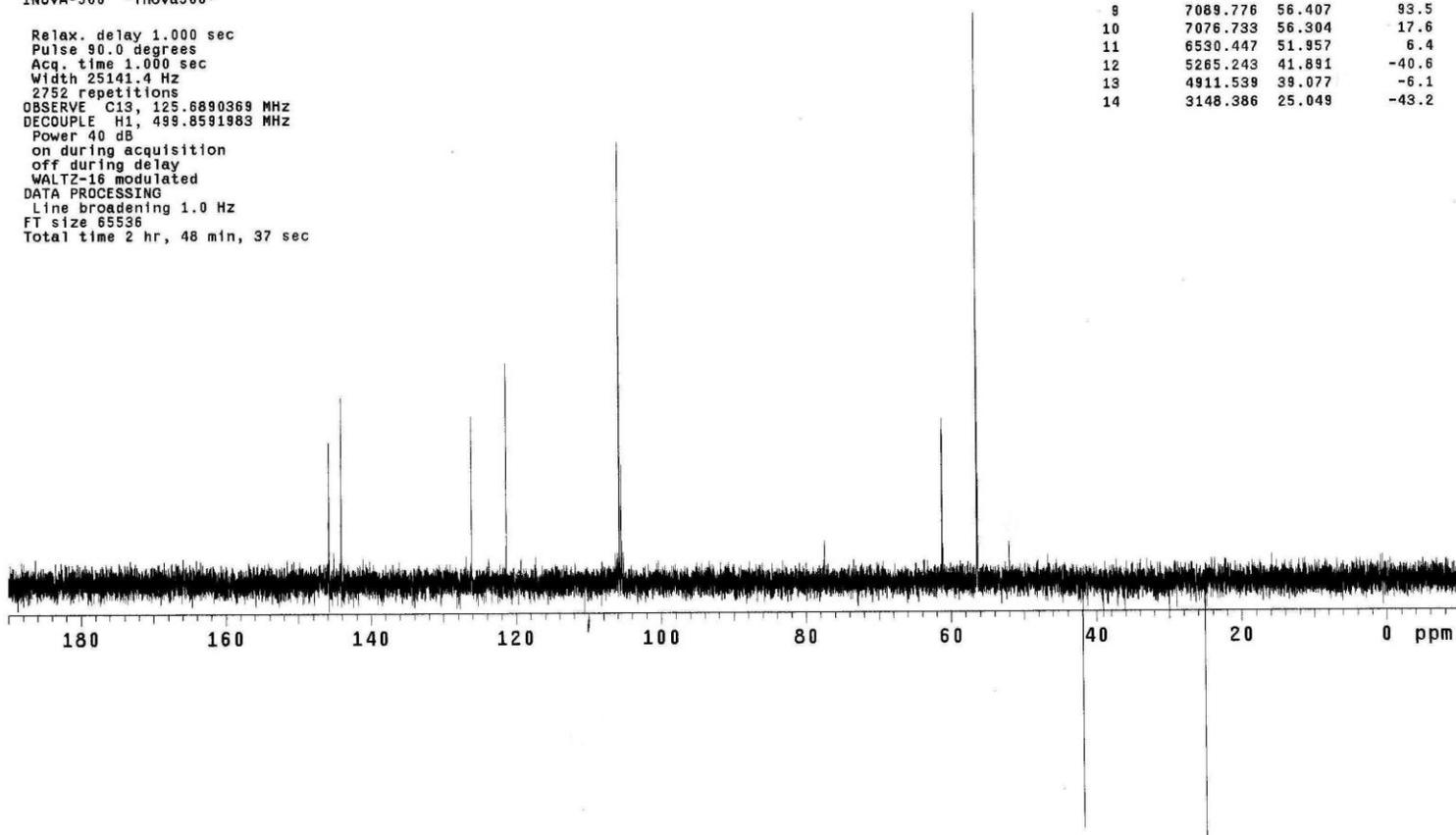


Figura 15. Espectro DEPT 135 de RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da piplartina

### **Capítulo 3**

**Análise do efeito sobre alterações comportamentais e morfológicas  
externas de *Anopheles nuneztovari* na presença dos extratos vegetais de  
*Piper tuberculatum***

## INTRODUÇÃO

Por muitos anos, inseticidas químicos têm sido utilizados para controlar mosquitos vetores de doenças, sendo que o uso continuado desses promove o desenvolvimento de resistência de larvas e adultos, contribuindo para a diminuição de sua eficácia (RAWLINS & WAN, 1995). Por este motivo, formas alternativas de controle de vetores vêm sendo avaliadas. Merece destaque o controle biológico com o *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti), com possibilidade de uso integrado com os produtos sintéticos (ANDRADE & MODOLO, 1991). Derivados de plantas demonstram vantagens ecológicas, particularmente com a especificidade da ação e curta permanência no meio ambiente (NAVICKIENE, 2007).

De acordo com Alves (1998), a sintomatologia compõe a patologia de insetos e estuda os sintomas e sinais provocados por diferentes tipos de patógenos, com a finalidade de diagnosticar as doenças provocadas nos indivíduos. Algumas características observadas como: diarreia, vômitos, perda de apetite, anomalias na morfologia de qualquer sistema, má formação dos apêndices, mudança na coloração do tegumento ou qualquer outra alteração na estrutura ou no comportamento dos insetos são considerados sintomas.

Produtos naturais estão sendo considerados como uma alternativa aos pesticidas sintéticos usados na agricultura. Esses vêm sendo amplamente estudados para o controle de insetos devido ao fato de apresentarem efeito tóxico sobre os estágios larvais (DHARMSHAKTU *et al.*, 1987; GREEN *et al.*, 1991; SUKUMAR *et al.*, 1991; SILVA *et al.*, 1996; MACÊDO *et al.*, 1997; SCHWARTZ *et al.*, 1998; PIZARRO *et al.*, 1999). Metabólitos secundários produzidos pelas plantas frequentemente afetam o sistema nervoso de insetos bem como seu comportamento (SHARMA *et al.*, 1998). De acordo com Scott *et al.* (2004), os metabólitos secundários das espécies do gênero *Piper* apresentam diversos modos de ação em contato com alguns organismos, incluindo: intoxicação, ação repelente, inibição de alimentação.

O óleo de *Piper aduncum*, de acordo com Fazolin *et al.* (2005), apresentou efeito inseticida para *Ceratomyia tingomarianus* (Coleoptera) provocando efeitos fisiológicos pela ação da aplicação tópica.

Barreto *et al.* 2006, utilizaram o extrato bruto etanólico de *Sapindus saponaria* Lin. (Sapindaceae) e demonstraram que durante os bioensaios algumas alterações no comportamento das larvas de *A. aegypti* foram constatadas. Houve diminuição gradativa dos movimentos larvais após 30 minutos do início dos testes e tornaram-se lentas ou imóveis após três horas de contato com o extrato. As larvas mortas foram caracterizadas pelo escurecimento da cápsula cefálica. *A. nuneztovari* apresentou escurecimento do tegumento após 24 h da aplicação do extrato clorofórmico a 10 µg/mL.

Larvas de *Culex nigripalpus* infectadas por um bacilovirus, se tornaram letárgicas após 72 h (MOSER *et al.*, 2001); com *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* o mesmo sintoma foi observado após meia hora de exposição ao *Bacillus thuringiensis*. Alguns trabalhos evidenciam que a redução da mobilidade larval é o primeiro sinal da atividade larvicida (RUIZ *et al.*, 2004).

Durantes os experimentos de Arruda *et al.* (2003) as larvas de *Aedes aegypti* tratadas com o extrato bruto etanólico de *Magonia pubescens* ST. HIL. apresentaram diminuição dos movimentos. Após 2h de permanência com o extrato, as larvas apresentaram movimentos mais lentos. Quando esse período atingia 4 h, as larvas ficavam mais vagarosas e permaneceram paradas no fundo da solução, se movendo apenas quando estimuladas, com um estilete ou quando se batia no frasco. Após 6 h, as larvas mostraram-se completamente letárgicas, mesmo quando estimuladas por toque.

Oliveira (dados ainda não publicados, 2005) analisou a atividade larvicida de *Bacillus sphaericus* 2362 em contato com *A. albicansis*, *Culex quinquefasciatus* e *Aedes aegypti*. Para *A. albicansis*, após 3 h da aplicação as larvas começaram a morrer, chegando a 100% de mortalidade após 12 h. Para *C. quinquefasciatus*, observou 100% de mortalidade após 24 h da aplicação. E para *A. aegypti*, as primeiras mortes foram registradas após 12 h. As larvas em contato com bactérias entomopatogênicas não apresentaram espasmos.

Marchini *et al.* (1992), descreveram que os sintomas típicos de intoxicação aparecem com movimentos espasmódicos, regurgitação e eliminação fecal. De acordo com Fodor & Colosanti (1985), as amidas também atuam como neurotoxinas. Pode-se presumir que os extratos testados neste trabalho, possivelmente possuem efeitos neurotóxicos e de intoxicação, já que as larvas apresentaram espasmos horas depois da aplicação.

Considerando a forte atividade larvicida observada para os extratos apolares de frutos de *P. tuberculatum*, foram realizados ensaios biológicos utilizando extratos de *Piper tuberculatum* com o objetivo de observar alterações morfológicas externas em *Anopheles nuneztovari*, compreendendo assim o modo de ação nestes organismos e servindo de subsídios para a diagnose de sintomas em outros grupos de insetos no meio ambiente.

## 1 OBJETIVOS

### 1.1 GERAL

- Observar alterações comportamentais e morfológicas externas em larvas de *Anopheles nuneztovari* decorrentes do contato com extratos de frutos de *Piper tuberculatum*.

### 1.2 ESPECÍFICOS

- Observar alterações na coloração do tegumento das larvas, na mobilidade corporal, nos movimentos giratórios da cabeça e nos movimentos das peças bucais;
- Comparar a efetividade larvicida dos extratos, clorofórmico e hexânico, analisando a porcentagem de mortalidade em diferentes concentrações.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 COLETA DE *Anopheles nuneztovari***

A coleta dos adultos de *Anopheles nuneztovari* foi feita nos arredores da cidade de Manaus - AM, próxima a currais bovinos. Os mosquitos foram coletados, já ingurgitados, com o auxílio de um capturador manual entomológico, entre 18:00 a 20:00h, e colocados em copos parafinados e telados. Cada copo contendo 50 mosquitos. Estes foram transportados em caixas térmicas até o Laboratório de Malária e Dengue, localizado no Instituto de Pesquisas da Amazônia – INPA.

Em laboratório, os mosquitos foram colocados para oviposição. O processo consiste em transferir um por um, para copos plásticos de 100 mL, telados os quais foram forrados com um chumaço de algodão e papel filtro ao fundo. Estes copos também foram telados e umidificados para a oviposição.

### **2.2 OBTENÇÃO DE LARVAS**

Na obtenção das larvas de *Anopheles nuneztovari* seguiu-se o mesmo procedimento descrito no capítulo 1 desta dissertação.

### **2.3 EXTRATOS VEGETAIS**

A obtenção dos extratos vegetais dos frutos de *P. tuberculatum* foi realizada seguindo o mesmo padrão já descrito no capítulo 1 desta dissertação.

### **2.4 MONTAGEM DOS BIOENSAIOS**

Utilizou-se copos descartáveis de 100 mL, contendo 10 larvas de 3<sup>o</sup> estágio, em cada um. Os testes foram feitos em triplicatas, chegando a uma quantidade final de 30 larvas testadas para cada concentração. Cada copo continha 50 mL de água destilada, medidos por um transferidor automático. Não foi utilizado alimento para estes testes. Os extratos foram aplicados, com

auxílio de micropipetadores automáticos, até atingirem as seguintes concentrações:

- a) Extrato clorofórmico 100  $\mu\text{g/mL}$
- b) Extrato clorofórmico 10  $\mu\text{g/mL}$ .
- c) Extrato hexânico 40  $\mu\text{g/mL}$
- d) Extrato hexânico 4  $\mu\text{g/mL}$

Para os grupos de controle foram utilizados:

- a) Água de torneira;
- b) DMSO puro – 50  $\mu\text{L}$  (volume de transferência)
- c) Temephós - 100  $\text{ng/mL}$

## 2.5 LEITURA DOS TESTES BIOLÓGICOS

Foram escolhidos os seguintes horários para observar as alterações morfológicas externas das larvas testadas: 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 12 h e 24 h após a aplicação dos extratos.

As larvas foram consideradas mortas com a observação das seguintes características: paralisação dos movimentos giratórios da cabeça, dos movimentos do corpo e dos movimentos das peças bucais e permanência dos indivíduos no fundo do copo. Para a visualização das alterações morfológicas externas das larvas, utilizou-se um microscópio estereoscópio.

## 2.6 EQUIPAMENTOS

- Banho de ultra-som (Unique USC 1400);
- Extrator Soxhlet;
- Transferidor automático Eppendorf Varispenser Plus;
- Micropipetador Eppendorf (P50 e P1000).
- Evaporador rotativo Fisatom 802.
- Microscópio estereoscópio Carl Zeiss.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos para as alterações comportamentais e morfológicas externas em larvas de 3º estágio de *A. nuneztovari* foram resumidos nas tabelas numeradas de 1 a 6.

#### 3.1 OBSERVAÇÕES APÓS 1 h DA APLICAÇÃO (TABELA 1)

Todas as larvas em contato com o extrato clorofórmico na concentração de 100 µg/mL apresentaram alterações, levando à morte. As larvas em contato com o extrato clorofórmico de menor concentração (10 µg/mL) apresentaram diminuição de movimentos das peças bucais e dos movimentos giratórios da cabeça. Para os outros extratos não houve modificações, as larvas respondiam a estímulos externos.

Tabela 01. Efeito sintomatológico observado 1h após a aplicação dos extratos clorofórmico e hexânico de frutos de *P.tuberculatum* em diferentes concentrações em larvas de *A. nuneztovari*.

<b>Movimentos</b>					
<b>Extrato</b>	<b>Concentrações</b>	<b>MPB</b>	<b>MGC</b>	<b>MC</b>	<b>Total de mortas</b>
CHCl <sub>3</sub>	100 µg/mL	A (0)	A (0)	A (0)	30
CHCl <sub>3</sub>	10 µg/mL	P (10)	P(10)	P(10)	0
Hexânico	40 µg/mL	P (10)	P(10)	P(10)	0
Hexânico	4 µg/mL	P (10)	P(10)	P(10)	0

MPB – Movimento das Peças Buciais; MGC – Movimento Giratório da Cabeça; MC – Movimento do Corpo; A – Ausência dos movimentos; P – Presença dos movimentos; ( ) – Número de larvas por copo que apresentam movimentos.

### 3.2 OBSERVAÇÕES APÓS 2 h DA APLICAÇÃO (TABELA 2)

Nesta observação, as larvas em contato com o extrato hexânico na concentração maior (40 µg/mL) começaram a entrar em convulsão. As larvas apresentaram espasmos corporais, permanecendo no fundo do copo sem respostas à estímulos. Para os extratos, hexânico (4 µg/mL) e clorofórmico (10 µg/mL), não houve alterações morfológicas larvais.

Tabela 02. Efeito sintomatológico observado 2h após a aplicação dos extratos clorofórmico e hexânico de frutos de *P. tuberculatum* em diferentes concentrações em larvas de *A. nuneztovari*.

<b>Movimentos</b>					
<b>Extrato</b>	<b>Concentrações</b>	<b>MPB</b>	<b>MGC</b>	<b>MC</b>	<b>Total de mortas</b>
CHCl <sub>3</sub>	100 µg/mL	A (0)	A (0)	A (0)	30
CHCl <sub>3</sub>	10 µg/mL	P (10)	P(10)	P(10)	0
Hexânico	40 µg/mL	P (10)	P(10)	P(10)	0
Hexânico	4 µg/mL	P (10)	P(10)	P(10)	0

MPB – Movimento das Peças Bucais; MGC – Movimento Giratório da Cabeça; MC – Movimento do Corpo; A – Ausência dos movimentos; P – Presença dos movimentos; ( ) – Número de larvas por copo que apresentam movimentos.

### 3.3 OBSERVAÇÕES APÓS 3 h DA APLICAÇÃO (TABELA 3)

Metade das larvas em contato com o extrato hexânico na maior concentração (40 µg/mL) morreram. Para a concentração menor do extrato hexânico (4 µg/mL), o efeito foi a morte de duas larvas e a diminuição dos movimentos das peças bucais e dos movimentos giratórios da cabeça em 28 larvas. As larvas mortas pela maior concentração do extrato clorofórmico na concentração de 100 µg/mL ainda apresentaram espasmos. Na concentração menor do extrato clorofórmico (10 µg/mL), não houve mudanças comportamentais desde a primeira hora de observação, respondendo ainda aos estímulos externos.

Tabela 03. Efeito sintomatológico observado 3h após a aplicação dos extratos clorofórmico e hexânico de frutos de *Piper tuberculatum* em diferentes concentrações em larvas de *A. nuneztovari*.

<b>Movimentos</b>					
<b>Extrato</b>	<b>Concentrações</b>	<b>MPB</b>	<b>MGC</b>	<b>MC</b>	<b>Total de mortas</b>
CHCl <sub>3</sub>	100 µg/mL	A (0)	A (0)	A (0)	30
CHCl <sub>3</sub>	10 µg/mL	P (10)	P(10)	P(10)	0
Hexânico	40 µg/mL	P (4)	P(4)	P(7)	15
Hexânico	4 µg/mL	P (10)	P(10)	P(8)	2

MPB – Movimento das Peças Buciais; MGC – Movimento Giratório da Cabeça; MC – Movimento do Corpo; A – Ausência dos movimentos; P – Presença dos movimentos; ( ) – Número de larvas por copo que apresentam movimentos.

### 3.4 OBSERVAÇÕES APÓS 4 h DA APLICAÇÃO (TABELA 4)

Em contato com o extrato hexânico de maior concentração (40 µg/mL) 16 larvas morreram. Para a menor concentração do extrato hexânico e do extrato clorofórmico, não houve mudanças nesta observação. As larvas em contato com o extrato clorofórmico (100 µg/mL) continuaram apresentando espasmos.

Tabela 04. Efeito sintomatológico observado 4h após a aplicação dos extratos clorofórmico e hexânico de frutos de *P. tuberculatum* em diferentes concentrações em larvas de *A. nuneztovari*.

<b>Movimentos</b>					
<b>Extrato</b>	<b>Concentrações</b>	<b>MPB</b>	<b>MGC</b>	<b>MC</b>	<b>Total de mortas</b>
CHCl <sub>3</sub>	100 µg/mL	A (0)	A (0)	A (0)	30
CHCl <sub>3</sub>	10 µg/mL	P (10)	P(10)	P(10)	0
Hexânico	40 µg/mL	P (4)	P(3)	P(7)	16
Hexânico	4 µg/mL	P (10)	P(10)	P(8)	2

MPB – Movimento das Peças Bucais; MGC – Movimento Giratório da Cabeça; MC – Movimento do Corpo; A – Ausência dos movimentos; P – Presença dos movimentos; ( ) – Número de larvas por copo que apresentam movimentos.

### 3.5 OBSERVAÇÕES APÓS 12 h DA APLICAÇÃO (TABELA 5)

O trabalho de Arruda *et al.* (2003) mostrou que as larvas de *A. nuneztovari* apresentaram-se letárgicas após 12 h em contato com os extratos testados de *Magonia pubescens* assemelhando-se a essa dissertação.

O extrato hexânico (40 µg/mL) matou 100% das larvas. As larvas em contato com a menor concentração do extrato hexânico apresentaram diminuição dos movimentos. Para o extrato clorofórmico (100 µg/mL) as larvas pararam de apresentar espamos. Foram observadas duas larvas mortas para o extrato clorofórmico em 10 µg/mL.

Tabela 05. Efeito sintomatológico observado 12h após a aplicação dos extratos clorofórmico e hexânico de frutos de *P. tuberculatum* em diferentes concentrações em larvas de *A. nuneztovari*.

Extrato	Concentrações	Movimentos			Total de mortas
		MPB	MGC	MC	
CHCl <sub>3</sub>	100 µg/mL	A (0)	A (0)	A (0)	30
CHCl <sub>3</sub>	10 µg/mL	P (10)	P(10)	P(8)	2
Hexânico	40 µg/mL	P (0)	P(0)	P(0)	30
Hexânico	4 µg/mL	P (10)	P(10)	P(8)	2

MPB – Movimento das Peças Bucais; MGC – Movimento Giratório da Cabeça; MC – Movimento do Corpo; A – Ausência dos movimentos; P – Presença dos movimentos; ( ) – Número de larvas por copo que apresentam movimentos.

### 3.6 OBSERVAÇÕES APÓS 24 h DA APLICAÇÃO (TABELA 6)

Após 24 h de exposição ao extrato hexânico (4 µg/mL) verificou-se que 14 larvas morreram (47% do total) e no extrato clorofórmico (10 µg/mL) morreram 15 larvas (50% do total). Nesta última observação as larvas anteriormente mortas apresentaram mudança na coloração do tegumento para a cor negra e no formato do corpo para curvo.

Tabela 06. Efeito sintomatológico observado 24h após a aplicação dos extratos clorofórmico e hexânico de frutos de *P. tuberculatum* em diferentes concentrações em larvas de *A. nuneztovari*.

Extrato	Concentrações	Movimentos			Total de mortas
		MPB	MGC	MC	
CHCl <sub>3</sub>	100 µg/mL	A (0)	A (0)	A (0)	30
CHCl <sub>3</sub>	10 µg/mL	P (4)	P(7)	P(4)	15
Hexânico	40 µg/mL	P (0)	P(0)	P(0)	30
Hexânico	4 µg/mL	P (4)	P(6)	P(6)	14

MPB – Movimento das Peças Bucais; MGC – Movimento Giratório da Cabeça; MC – Movimento do Corpo; A – Ausência dos movimentos; P – Presença dos movimentos; ( ) – Número de larvas por copo que apresentam movimentos.

As alterações nas larvas de *A. nuneztovari* causadas pelo extrato hexânico (40 µg/mL) e clorofórmico (100 µg/mL) do fruto de *P. tuberculatum*, iniciaram-se com mudanças gradativas na sua mobilidade.

Após 20 minutos da aplicação do extrato clorofórmico do fruto de *Piper tuberculatum*, na concentração de 100 µg/mL, 3 larvas (1% do total) começaram a mudar o estado comportamental apresentando convulsões e diminuição dos movimentos. Observadas 25 minutos depois da aplicação, 10 larvas (33,3% do total) apresentaram convulsões. Constatou-se que após 50 minutos da aplicação do extrato 100% das larvas estavam mortas.

O extrato clorofórmico na concentração de 100 µg/mL apresentou efeito larvicida em 20 minutos após a aplicação, levando a mortalidade de 100% das larvas em menos de 1 h. Após a paralisação dos movimentos giratórios da cabeça, movimentos natatórios de das peças bucais, as larvas apresentaram espasmos durante pelo menos 4 h. Na observação de 12 h após a aplicação, os espasmos não foram mais observados.

Em menor concentração, as larvas em contato com o extrato clorofórmico (10 µg/mL) apresentaram diminuição dos movimentos após 1h da aplicação. As primeiras mortes só foram observadas após 12 h da aplicação. Após 24 h a aplicação do extrato, 50% das larvas sofreram o efeito larvicida, permanecendo letárgicas após a morte. Nesta concentração, os espasmos não foram observados.

O extrato hexânico de concentração 40 µg/mL apresentou 100% de mortalidade das larvas após 12 h da aplicação. As primeiras mortes das larvas em contato com o extrato hexânico (4 µg/mL) foram notificadas após 3 h da aplicação.

O tegumento das larvas, após 24h da aplicação dos extratos, sofreu escurecimento, observando-se a cor negra. E o formato do corpo das larvas mudou sua conformação para o curvo.

Não houve mudanças observáveis nas larvas do controle negativo (DMSO) e com água de torneira, notando-se 0% de mortalidade. As larvas do controle positivo (Temephós) exibiram 100% de mortalidade em contato com o larvicida na primeira hora de observação.

Não foram encontrados trabalhos concernentes ao modo de ação desses extratos vegetais de *Piper tuberculatum* em larvas de *Anopheles*, possibilitando assim estudos posteriores para a observação da sintomatologia interna.

## CONCLUSÕES

Nas concentrações mais altas, o extrato clorofórmico apresentou as primeiras mortes após 20 minutos de exposição ao extrato, diferenciando-se do extrato hexânico que somente após 12 h da aplicação observaram-se as primeiras mortes.

O extrato hexânico apresentou ser o mais ativo, em uma menor concentração, comparando-o com o extrato clorofórmico, entretanto, o tempo para matar 100% das larvas foi maior.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, S.B. **Controle Microbiano de Insetos**. Capítulos 1, 2 e 12. Editora FEALQ. São Paulo-SP 2º ed. 1163 p., 1998.

ANDRADE, C.F.S. & MODOLO, M. **Susceptibility of *Aedes aegypti* larvae to temephos and *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* in integrated control**. *Revista de Saúde Pública*, 25: 184-187, 1991.

ARRUDA, W.; OLIVEIRA, G.M.C. e SILVA, I.G. **Alterações morfológicas observadas em larvas do *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) submetidas à ação do extrato bruto etanólico da casca do caule da *Magonia pubescens* ST. HIL.** *Entomologia Veterinária*, v. 10, n. 1, p. 47-60, 2003.

BARRETO, C.F. *et al.* **Estudo das alterações morfo-histológicas em larvas de *Aedes aegypti* (Díptera, Culicidae) submetidas ao extrato bruto etanólico de *Sapindus saponaria* Lin (Sapindaceae).** *Revista de Patologia Tropical*, v. 35, 37-57, 2006.

CHAVES, M.C. *et al.* **Amides from *Piper tuberculatum* fruits.** *Fitoterapia*, v. 74, 181-183, 2003.

DHARMSHAKTU, N.S.; PRABHAKARAN, P.K. & MENON, P.K. **Laboratory study on the mosquito larvicidal properties of leaf and seed extract of the plant *Agave americana*.** *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 90, 79-82, 1987.

FAZOLIN, M. *et al.* **Toxicidade do óleo de *Piper aduncum* L. a adultos de *Cerotoma tingomarianus* Bechyné (Coleóptera: Chrysomelidae).** *Neotropical Entomology*, v. 34 (3), 2005.

FODOR, G.B. & COLOSANTI, B. **The pyredine and piperdine alkaloids: Chemistry and pharmacology.** *Alkaloids Chemical and Biological Perspectives* v. 3 (ed. By S. W. Pelletier), pp, 1-90, Wiley, New York, 1985.

GREEN, M.M *et al.* **Larvicidal activity of *Tagetes minuta* (Marigold) toward *Aedes aegypti*.** *Journal of the American Mosquito Control Association*, v. 7, 282-286, 1991.

MARCHINI, L.C., ALVES, S.B. e NAKANO, O. **Sericicultura**, in Curso de Entomologia Aplicada à Agricultura. FEALQ, Piracicaba, Brazil, pp, 705-736, 1992.

MACÊDO, M.E *et al.* **Screening of Asteraceae (Compositae) plant extracts for larvicidal activity against *Aedes fluviatilis* (Diptera: Culicidae).** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 92: 565-570, 1997.

MOSER, B.A *et al.* **Morphological and molecular evidence that *Culex nigripalpus* baculovirus is an unusual member of the family Baculoviridae.** *Journal of General Virology*. 82: 283-297, 2001.

NAVICKIENE, H.M.D *et al.* **Toxicity of extracts and isobutyl amides from *Piper tuberculatum*: potent compounds with potential for the control of velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatilis*.** *Pest Management Science*, 63: 399-403, 2007.

OLIVEIRA, C.D. **Análise da Toxicidade, da Sintomatologia e da Histopatologia em larvas de *Culex* (Linnaeus, 1758), *Anopheles* e *Aedes* (Meigen, 1818) (Diptera: Culicidae) frente à ação de estirpes de *Bacillus sphaericus* (Neide, 1904), em condições de laboratório.** Manaus: UEA, 2005. Tese de Dissertação, Universidade do Estado do Amazonas, 2005.

OTTEA, J.A., PAYNE, G.T. & SOLERLUND, D.M. **Action of insecticidal N-alkylamides at site 2 of the voltage-sensitive sodium channel.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38, 1724-1728, 1990.

PIZARRO, A P.B *et al.* **O aproveitamento do resíduo da indústria do sisal no controle de larvas de mosquitos.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 32:23-29, 1999.

RAWLINS, S.C & WAN, J.O.H. **Resistance in some Caribbean populations of *Aedes aegypti* to several insecticides.** *Journal of the American Mosquito Control Association*, v. 11, 59-65, 1995.

RUIZ, M.L. *et al.* **In vivo binding of the Cry 11bB toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *Medellin* to the midgut of mosquito larvae (Diptera: Culicidae).** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 99: 73-79, 2004.

SCHWARTZ, A.M. *et al.* **The lethal effects of *Cyperus iria* on *Aedes aegypti*.** *Journal of the American Mosquito Control Association*, 14:78-82, 1998.

SCOTT, I.M. *et al.* **Insecticidal activity of *Piper tuberculatum* Jacq. Extracts synergistic interaction of piperamides.** *Agric For Entomol* 4:137-144, 2002.

SCOTT, I.M. *et al.* **Efficacy of *Piper* (Piperaceae) extracts for control of common home and garden insect pests.** *Journal of Economic Entomology*, 97:1390-1403, 2004.

SHARMA, N. *et al.* **Larvicidal activity of *Gliricidia sepium* against mosquito larvae of *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*.** *Pharmaceutical Biology*, 36(1):3-7, 1998.

SILVA, I.G. *et al.* **Ação larvívica de extrato bruto etanólico de *Magonia pubescens* St. Hil. (tinguí do cerrado) sobre *Aedes aegypti* (Lin) em laboratório.** *Revista de Patologia Tropical*, 25:51-59, 1996.

SUKUMAR, K.; PERICH, M.J. & BOOBAR, L.R. **Botanical derivatives in mosquito control: a review.** *Journal of the American Mosquito Control Association*, 7:210-217, 1991.