

LILLIAM MAY GRESPAN ESTODUTTO DA SILVA

**ESTUDO QUÍMICO BIOMONITORADO POR ENSAIO COM LARVAS
Aedes aegypti DAS ESPÉCIES *Ocotea velloziana* (Meisn.) Mez. e *Aiouea
trinervis* (Meisn.)**

**CAMPO GRANDE – MS
2010**

LILLIAM MAY GRESPAN ESTODUTTO DA SILVA

**ESTUDO QUÍMICO BIOMONITORADO POR ENSAIO COM LARVAS *Aedes aegypti*
DAS ESPÉCIES *Ocotea velloziana* (Meisn.) Mez. e *Aiouea trinervis* (Meisn.)**

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito parcial para a obtenção do título de doutor.

Orientador: Prof. Dr. Walmir Silva Garcez
Co-orientadora: Dr^a. Lidilhone Hamerski Carbonesi

Campo Grande – MS

2010

FOLHA
DE APROVAÇÃO

LILLIAM MAY GRESPAN ESTODUTTO DA SILVA

ESTUDO QUÍMICO BIOMONITORADO POR ENSAIO COM LARVAS *Aedes aegypti*
DAS ESPÉCIES *Ocotea velloziana* (Meisn.) Mez e *Aiouea trinervis* (Meisn.)

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito parcial para a obtenção do título de doutor.

Resultado - **APROVADA**

Campo Grande (MS) 26 de março de 2010.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Walmir Silva Garcez (Presidente) _____

Instituição: UFMS

Dr. José Bento Pereira Lima (Titular) _____

Instituição: FIOCRUZ

Profª. Drª. Maria Elizabeth Moraes Cavaleiros Dorval (Titular) _____

Instituição: UFMS

Prof. Dr. Adriano César de Moraes Baroni (Titular) _____

Instituição: UFMS

Profª Drª Maria de Fátima Cepa Matos (Titular) _____

Instituição: UFMS

Profª Drª Neli Kika Honda (Suplente) _____

Instituição: UFMS

Dedico este trabalho ao meu esposo Antônio Carlos e aos meus filhos Gabriella e João Pedro, frutos do nosso amor que desabrocham para a vida na fé em Deus.

"Não vai demorar que
passemos adiante uma
grande e bela ciência,
que faz arte
em defesa da vida".

Carlos Chagas

AGRADECIMENTOS

- A Deus que pela fé mostrou-me o caminho correto e proporcionou-me muitas oportunidades de superar as dificuldades de alcançar este sonho.
- Ao meu esposo Antônio Carlos e aos meus filhos Gabriella e João Pedro pelo amor, apoio, paciência e compreensão.
- Ao meu orientador pela serenidade e competência na orientação, pelo conhecimento transmitido, apoio, paciência, amizade. Minha eterna gratidão e admiração. Obrigada por acreditar em mim, mesmo quando eu mesma não consegui.
- A minha família por sempre acreditar em mim me incentivando a seguir em frente.
- À Dr^a Lidilhone Hamerski Carbonesi pela amizade, paciência e cooperação durante todo o tempo de convivência, além das sugestões e críticas tão necessárias.
- Ao Dr. José Bento Pereira Lima pela contribuição na realização deste trabalho sem a qual teria sido difícil concluir essa tese, além da atenção e amizade que demonstra sempre que nos encontramos e também por suas sugestões, críticas e observações.
- Aos Doutores Maria Elizabeth Moraes Cavalheiros Dorval, Adriano César de Moraes Baroni e Maria de Fátima Cepa Matos que através das suas observações (exame de qualificação) forneceram valiosas sugestões e correções que melhoraram esse trabalho.
- A prof^a Dr^a. Fernanda Rodrigues Garcez pela amizade, por suas sugestões e o contagiante entusiasmo pela fitoquímica.
- À Msc. Cleusa Rocha Garcia Gaban uma grande companheira de trabalho, pelas palavras amigas e animadoras, por sua valiosa contribuição na realização deste trabalho.
- Ao Dr. Eduardo José de Arruda pelo auxílio financeiro concedido em parte desse trabalho.
- À Dr^a Zaira da Rosa Guterres pela amizade e por sugestões pertinentes ao trabalho.
- Aos funcionários Msc. Luciana Marçal Ravaglia pela amizade e atenção; Luis Leonardo Viana pelo suporte técnico.
- Ao mestrando Fábio Henrique Fernandes por não ter medido esforços em me ajudar na digitalização.
- À Universidade Federal de Mato Grosso do Sul e ao Programa de Saúde e Desenvolvimento da Região Centro-Oeste por viabilizar cursar o doutorado.

- Aos colegas e companheiros de laboratório que juntos superamos muitos desafios impostos, pelos dias divertidos e palavras de estímulo.
- À agência de fomento CNPq pelo apoio financeiro concedido através da bolsa de Doutorado.
- Enfim, agradeço a todas as pessoas que estiveram ao meu lado durante todo este período e que contribuíram direta ou indiretamente para o meu crescimento e aprendizagem.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Substâncias isoladas de espécies de plantas/fungos com atividade larvicida.	16
Tabela 2 - Material vegetal de plantas de Mato Grosso do Sul (folhas, cascas, galhos, frutos, ramos ou flores), selecionadas para avaliação em ensaios biológicos.	40
Tabela 3 - Fracionamento em sílica RP-18 (40-63µm) da fase butanólica do extrato de <i>Ocotea velloziana</i> e suas correspondentes massas.	43
Tabela 4 - Fracionamento da fração MeOH (coluna de sílica gel-230-400mesh) do extrato da casca do caule de <i>Ocotea velloziana</i> e suas correspondentes massas.	44
Tabela 5 - Fracionamento em sílica RP-18 da fase butanólica do extrato dos frutos de <i>Aiouea trinervis</i> e suas correspondentes massas.	46
Tabela 6 - Frações obtidas da filtração em coluna de sílica gel (230-400mesh) em gradiente de polaridade crescente: Hex.; AcOEt e MeOH da fração B.4-H ₂ O-MeOH (2:8) do extrato dos frutos de <i>Aiouea trinervis</i> e suas correspondentes massas.	47
Tabela 7 - Frações obtidas da separação em HPCL, coluna semi-preparativa; fração B.4.4-Hexano:AcOEt- (80:20) do extrato dos frutos de <i>Aiouea trinervis</i> e suas correspondentes massas.	48
Tabela 8 - Valores das concentrações letais para atividade contra toxicidade sobre <i>A. salina</i> e atividade larvicida contra <i>Ae. aegypti</i> (cepa Rockefeller) dos 50 extratos das plantas selecionadas	50
Tabela 9 - Valores das concentrações letais para atividade larvicida com larvas do mosquito <i>Ae. aegypti</i> (cepa Rockefeller) do fracionamento da fase butanólica em sílica RP-18, do extrato de <i>Ocotea velloziana</i>	52
Tabela 10 - Valores das concentrações letais para atividade larvicida contra larvas do mosquito <i>Ae. Aegypti</i> (cepa Rockefeller) obtidas do fracionamento da fração MeOH (coluna de sílica gel-230-400mesh), do extrato de <i>Ocotea velloziana</i>	53

Tabela 11 - Valores das concentrações letais para atividade larvicida contra larvas do mosquito <i>Ae. aegypti</i> (cepa Rockefeller) obtidas do fracionamento da fase butanólica em sílica RP-18 do extrato dos frutos de <i>Aiouea trinervis</i>	54
Tabela 12 - Valores das concentrações letais para atividade larvicida contra larvas do mosquito <i>Ae. aegypti</i> (cepa Rockefeller) obtidas do fracionamento da fração B.4-H ₂ O-MeOH (2:8) do extrato dos frutos de <i>Aiouea trinervis</i>	55
Tabela 13 - Valores das concentrações letais para atividade larvicida contra larvas do mosquito <i>Ae. aegypti</i> (cepa Rockefeller) dos grupos obtidos em HPLC (coluna semi-preparativa) da fração B.4.4-Hex:AcOEt 80:20 do extrato dos frutos de <i>Aiouea trinervis</i>	56
Tabela 14 - Dados de deslocamentos químicos (δ) de RMN ¹ H (300 MHz), ¹³ C (75 MHz) em DMSO-d ₆ da substância S-dicentrina, obtida do extrato de <i>Ocotea velloziana</i> e do alcaloide citado na literatura (GARCEZ, YOSHIDA e GOTTLIEB, 1995) (75 MHz, CDCl ₃).....	60
Tabela 15 - Dados de deslocamentos químicos (δ) de RMN ¹ H (300 MHz), ¹³ C (75 MHz) em CDCl ₃ da substância isoobtusilactona A, obtidos de <i>Aiouea trinervis</i> e do butanolídeo citado na literatura (ANDERSON et al., 1992) (60MHz, CDCl ₃).	65
Tabela 16 - Dados de deslocamentos químicos (δ) de RMN ¹ H (300 MHz), ¹³ C (75 MHz) em CDCl ₃ da substância obtusilactona A, obtidos de <i>Aiouea trinervis</i> e do butanolídeo citado na literatura (ANDERSON et al., 1992) (60MHz, CDCl ₃).	69
Tabela 17 - Dados de concentração letal (CL) e slope (coeficiente angular) para as larvas de <i>Ae. Aegypti</i> (cepa Rockefeller) expostos a temefós, S-dicentrina isoobtusilactona A e obtusilactona A. As concentrações estão indicadas em µg/mL.....	72

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Aspectos da morfologia externa do adulto fêmea do <i>Aedes aegypti</i> (Linnaeus, 1762); observar escudo adornado com escamas branco-prateadas formando um desenho em forma de lira e listas nas patas. Fonte: a- b - http://www.eol.org/pages/740699 . Acesso em: 01/10/09.....	4
Figura 2 - Representação esquemática do ciclo de vida do mosquito <i>Aedes aegypti</i> , mostrando as fases ovo, larva, pupa e adulto. Fonte: Livro - Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias (LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 2005)	5
Figura 3 - Aspectos da morfologia externa do adulto fêmea do <i>Aedes albopictus</i> (Skuse, 1894), observar escudo com faixa longitudinal de escamas prateadas e listas nas patas. Fonte: a- http://www.eol.org/pages ; b - www.padil.gov.au/viewPestDiagnosticImages . Acesso em: 01/10/09.....	6
Figura 4 - Ciclo de transmissão do vírus da dengue.....	7
Figura 5 - Exemplos de substâncias químicas de origem vegetal com atividade inseticida. ...	10
Figura 6 - Reação de hidrólise da acetilcolina.....	12
Figura 7 - Fenilpropanoides isolados de plantas com atividade larvicida.....	20
Figura 8 - Sesquiterpenos isolados de plantas com atividade larvicida.	20
Figura 9 - Cumarinas isoladas de plantas com atividade larvicida e obtidas por transformações químicas.....	21
Figura 10 - Diterpenos isolados de plantas.....	22
Figura 11 - Estilbenos prenilados isolados de plantas com atividade larvicida.	23
Figura 12 - Quinonas isoladas de plantas com atividade larvicida.....	24
Figura 13 - Flavonoides isolados de plantas com atividade larvicida.....	25
Figura 14 - Rotenoides isolados de plantas com atividade larvicida.....	26
Figura 15 - Limonoides isolados de plantas com atividade larvicida.....	27

Figura 16 - Triterpeno e Esteróide isolados de plantas com atividade larvívica.....	27
Figura 17 - Lignanas isoladas de plantas com atividade larvívica.	28
Figura 18 - Saponinas isoladas de plantas com atividade larvívica.	28
Figura 19 - Amidas isoladas de plantas com atividade larvívica.	29
Figura 20 - Lactonas, cromanona, alcalóide e ácidos graxos isolados de plantas com atividade larvívica.	30
Figura 21 - Alquílfenóis isolados de plantas com atividade larvívica.....	31
Figura 22 - <i>Ocotea velloziana</i> – ampliação fruto e folhas. Fonte: http://www.arbolesornamentales.com . Acesso em: 03/05/07	34
Figura 23 - <i>Aiouea trinervis</i> - ampliação dos frutos. Foto – Lilliam May – 02/12/07	35
Figura 24 - Fracionamento biomonitorado por ensaio com larvas (<i>Aedes aegypti</i>) de <i>O. velloziana</i> para obtenção da substância ativa larvívica.	45
Figura 25 - Fracionamento biomonitorado por bioensaio com larvas (<i>Aedes aegypti</i>) de <i>Aiouea trinervis</i> para obtenção das substâncias puras.....	49
Figura 26 - Cromatograma analítico HPLC obtido da fração B4.4-Hexano: AcOEt-(80:20) do extrato dos frutos de <i>Aiouea trinervis</i> . Condições analíticas: coluna [4,6 mm/ 25 cm; Luna C-18 (2) 5µ - Phenomenex] fluxo 0,5 mL/min.; no eluente ACN/H ₂ O 90:10 (210 nm); detector UV, 254 nm, com tempo de retenção a: 18 (B4.4.1), 30 (B4.4.2), 40 (B4.4.3) e 55 (B4.4.4) minutos.	56
Figura 27 - Cromatograma semi-preparativo obtido do HPCL da fração B4.4.4(pico 4), com tempo de retenção a: 29 (IOL.1) e 33 (OL) minutos do extrato dos frutos de <i>Aiouea trinervis</i> . Condições semi-preparativas: 21,2 mm/ 25 cm; Luna C-18 100° 5µ - Phenomenex, fluxo 10 mL/min com eluente ACN/H ₂ O 90:10. detector UV, 254 nm.	57
Figura 28 - Estruturas químicas isolados da casca do caule <i>Ocotea velloziana</i> (S-D) e frutos de <i>Aiouea trinervis</i> (OL e IOL.1).	58

Figura 29 - Estrutura química da substância S-dicentrina isolada da casca do caule <i>Ocotea velloziana</i>	59
Figura 30 - Espectro de RMN ^1H (300 MHz – DMSO- d_6) da substância S-dicentrina.	61
Figura 31 - Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz- DMSO- d_6) da substância S-dicentrina.....	61
Figura 32 - Espectro de DEPT 135° (75 MHz- DMSO- d_6) da substância S-dicentrina.....	62
Figura 33 - Espectro na região do infravermelho da substância S-dicentrina em KBr.	62
Figura 34 - Estruturas químicas possíveis para a substância IOL.1 isolada dos frutos <i>Aiouea trinervis</i>	64
Figura 35 - Estrutura química da substância isoobtusilactona A isolada dos frutos <i>Aiouea trinervis</i>	64
Figura 36 - Espectro de RMN ^1H (300 MHz - CDCl_3) da substância isoobtusilactona A.	66
Figura 37- Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz- CDCl_3) da substância isoobtusilactona A.	66
Figura 38 - Espectro HSQC (300/75 MHz- CDCl_3) da substância isoobtusilactona A.	67
Figura 39 - Espectro de massas por impacto eletrônico da substância isoobtusilactona A.....	67
Figura 40 - Espectro na região do infravermelho da substância isoobtusilactona A em KBr. .	67
Figura 41 - Estrutura química da substância obtusilactona A isolada dos frutos <i>Aiouea trinervis</i>	69
Figura 42 - Espectro de RMN ^1H (300 MHz - CDCl_3) da substância obtusilactona A.....	70
Figura 43 - Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz- CDCl_3) da substância obtusilactona A.....	70
Figura 44 - Espectro HSQC da substância obtusilactona A (300/75 MHz- CDCl_3).	71
Figura 45 - Espectro de massas por impacto eletrônico da substância obtusilactona A.	71
Figura 46 - Espectro na região do infravermelho da substância obtusilactona A em KBr.....	71

Figura 47 - Comparação das concentrações utilizadas para mortalidade das larvas entre o larvicida temefós e substâncias isoladas S-dicentrina, obtusilactona A e obtusilactona A. Curvas de regressão linear. Dose-log ($\mu\text{g/mL}$)..... 73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACh - Acetilcolina

AChE - Acetilcolinesterase

AcOEt - Acetato de etila

Acetil-CoA - Acetil-coenzima A

BHT - Di-terc-butil metil fenol

BTI - *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*

ButOH - Butanol

CC - Cromatografia em coluna

CCD - Cromatografia em camada delgada analítica

d - Dubleto

dd - Duplo dubleto

dl - Dubleto largo

dt - Duplo tripleto

DEPT - “Distortionless Enhancement by Polarization Transfer”

DDT - Dicloro-difenil-tricloroetano

DHF/DSS - Febre do dengue hemorrágico/Síndrome de choque do dengue

DH - Dengue hemorrágica

DL₅₀ - Concentração da amostra capaz de matar 50% da população de larvas

DMSO_d₆ - Sulfóxido de dimetila deuterado

Esp. - Espectro

EtOH - Etanol

Exp. - Experimental

FDA - “Food and Drug Administration”

Hex. - Hexano P.A.

HMBC - “Heteronuclear Multiple Bond Correlation”

HSQC - “Heteronuclear Single Quantum Coherence”

HPLC - Cromatografia líquida de alta eficiência

Hz - Hertz

m - Multiplete

LH-20 - Sephadex LH-20

Me - Metila

MeCN - Acetonitrila

MeOH - Metanol P.A.

MHz - Megahertz

IOL.1 - Substância isolada da espécie *Aiouea trinervis* - Isoobtusilactona A

OL - Substância isolada da espécie *Aiouea trinervis* - Obtusilactona A

OPS - “Organización Panamericana De La Salud”

PAHO - “Pan American Health Organization”

p.exp. - Parte Experimental

PM - Peso molecular

ppm - Partes por milhão

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

RMN ¹³C - Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13

RMN ¹H - Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

s - Singleto

S-D.3c - Substância isolada da espécie *Ocotea velloziana*- S-dicentrina

sl - Singleto largo

t - Tripleto

TAS - Toxicidade sobre *Artemia salina*

UR - Umidade relativa

v/v - volume/volume

WHO - “World Health Organization”

LISTA DE SÍMBOLOS

$[\alpha]_D^{20}$ - Rotação óptica específica

δ - Deslocamento químico em partes por milhão

J - Constante de Acoplamento

μg - Micro grama

μM - Micro mol

RESUMO

O estudo químico biomonitorado dos componentes de plantas tem sido adotado como ferramenta para obtenção de princípios ativos. O emprego de produtos naturais para controle de pragas e tratamento de doenças não é recente, sendo utilizado antes do advento dos produtos sintéticos. A biodiversidade do Cerrado e Pantanal é pouco conhecida e muitas espécies são endêmicas desses biomas. O presente estudo químico biomonitorado relata os resultados do teste biológico para a verificação da atividade larvicida frente à larva do mosquito *Aedes aegypti* (Linneus 1762) dos extratos etanólicos da casca do caule de *Ocotea velloziana* (Meisn.) Mez. e dos frutos de *Aiouea trinervis* (Meisn.). O estudo fitoquímico consistiu no isolamento, na identificação e elucidação estrutural dos metabólitos secundários responsáveis pela bio-atividade apresentada pelos extratos. Os extratos etanólicos das duas espécies selecionadas através do ensaio biológico larvicida foram submetidos a técnicas cromatográficas de separação incluindo cromatografia em coluna de sílica gel, sílica gel 60 RP-18, de Sephadex LH-20 e cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa. As determinações estruturais foram efetuadas com base nos dados espectroscópicos de RMN de ^1H , ^{13}C e DEPT 135°, incluindo os experimentos bidimensionais HSQC, HMBC, a partir das informações obtidas dos espectros de massas e infravermelho e através dos valores de rotação óptica específica. O estudo químico biomonitorado dos extratos selecionados conduziu ao isolamento de três substâncias responsáveis pela atividade larvicida: um alcaloide aporfínico (S-dicentrina) da casca do caule de *Ocotea velloziana* e duas γ -lactonas (isoobtusilactona A e obtusilactona A) dos frutos de *Aiouea trinervis*.

ABSTRACT

The chemical bioassay-guided study of components of plants has been adopted as a tool for obtaining active ingredients. The use of natural products for pest control and treatment of diseases is not new, it has been used before the advent of synthetic products. The biodiversity of the Cerrado and Pantanal is not well known and many species are endemic to these biomes. This chemical biomonitored study reports the results of biological test to verify the activity larvicide against mosquito larvae of *Aedes aegypti* (Linneus 1762) the ethanol extracts the stem bark of *Ocotea velloziana* (Meisn.) Mez. and fruits *Aiouea trinervis* (Meisn.). Phytochemical study consisted of the isolation, identification and elucidation structures of secondary metabolites responsible for the bio-activity presented the extracts. The ethanol extracts of the two species selected through the biological larvicide test were subjected to chromatographic separation techniques including column chromatography on silica gel, silica gel 60 RP-18 of Sephadex LH-20 and high performance liquid chromatography reverse-phase efficiency. Structural determinations were made on the basis of spectroscopic data ^1H NMR, ^{13}C and DEPT 135°, including bidimensional HSQC, HMBC, from information obtained from mass spectra and infrared and through the values specific optical rotation. Phytochemical bioactivity of extracts selected led to the isolation of three substances responsible for the activity larvicide: an alkaloid aporphine (S-dicentrine) of stem bark of *Ocotea velloziana* and two γ -lactone (isoobtusilactone A and obtusilactone A) of the fruits of *Aiouea trinervis*.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1 <i>Considerações gerais sobre a dengue</i>	3
2.1.1 Os vetores do vírus da dengue e ciclo de transmissão.....	4
2.1.2 Patogenia do vírus da dengue	7
2.1.3 Tratamento.....	8
2.1.4 Controle de vetores e resistência a inseticidas	9
2.1.5 Mecanismos de ação dos inseticidas químicos e biológico.....	10
2.1.6 Produtos naturais com atividade larvicida.....	14
2.1.6.1 Substâncias de origem natural (planta/microorganismo) com atividade larvicida.	14
2.2 Cerrado e Pantanal.....	31
2.3 Aspectos botânicos da família Lauraceae, gêneros <i>Ocotea</i> e <i>Aiouea</i>	32
2.4 Espécie <i>Ocotea velloziana</i>	33
2.5 Espécie <i>Aiouea trinervis</i>	34
2.6 Considerações gerais sobre ensaios biológicos	35
2.6.1 Atividade de toxicidade sobre <i>Artemia salina</i>	35
2.6.2 Atividade larvicida	35
3 OBJETIVOS.....	36
3.1 Gerais.....	36
3.2 Específicos.....	36
4 EXPERIMENTAL	37
4.1 Material e métodos	37
4.1.1 Solventes.....	37
4.1.2 Cromatografia clássica em coluna e em camada delgada (CCD).....	37
4.1.3 Cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE	37
4.1.4 Reagentes reveladores	37

4.1.5 Espectros de RMN.....	38
4.1.6 Espectros no Infravermelho.....	38
4.1.7 Determinação da rotação óptica específica	38
4.1.8 Espectros de Massas	38
4.1.9 Material biológico	38
4.1.10 Ensaio biológicos	39
4.2 Coleta e identificação do material botânico	39
4.2.1 Preparo dos extratos	39
4.2.2 Avaliação biológica dos extratos.....	41
4.2.2.1 - Toxicidade sobre <i>Artemia salina</i>	41
4.2.2.3 Atividade larvívica contra a larva do <i>Aedes aegypti</i>	42
4.3 Estudo químico biomonitorado por bioensaio com larvas <i>Aedes aegypti</i> das espécies <i>Ocotea vellosiana</i> (Meisn.) Mez. e <i>Aiouea trinervis</i> (Meisn.).....	42
4.3.1 Estudo químico biomonitorado da casca do caule de <i>Ocotea vellosiana</i>	42
4.3.2 Estudo químico biomonitorado dos frutos de <i>Aiouea trinervis</i>	45
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
5.1 Avaliação da toxicidade sobre <i>Artemia salina</i> e atividade larvívica das plantas selecionadas para estudos biológicos e escolha das plantas para estudo químico biomonitorado.....	50
5.2 Estudo fitoquímico e avaliação da atividade larvívica das frações obtidas pelo fracionamento químico biomonitorado do extrato da casca do caule <i>O. vellosiana</i>	52
5.3 Estudo fitoquímico e avaliação da atividade larvívica das frações obtidas pelo fracionamento químico biomonitorado do extrato dos frutos de <i>Aiouea trinervis</i>	53
5.4 Identificação estrutural das substâncias isoladas com atividade larvívica	57
5.4.1 Substância isolada do extrato etanólico da casca do caule de <i>Ocotea vellosiana</i>	58
5.4.2 Substância isolada (IOL.1) do extrato etanólico dos frutos <i>Aiouea trinervis</i>	63
5.4.3 Substância isolada (OL) do extrato etanólico dos frutos <i>Aiouea trinervis</i>	68
5.5 Dados de concentração letal (CL) e “slope” (coeficiente angular) para as larvas de <i>Ae. Aegypti</i> (cepa Rockefeller) expostos a temefós, S-dicentrina isoobtusilactona A e obtusilactona A.	72
5.6 Hipóteses para o mecanismo de ação das substâncias isoladas.....	73

6 CONCLUSÃO.....	75
REFERÊNCIAS	76

1 INTRODUÇÃO

A dengue, doença infecciosa transmitida pelo vetor *Aedes aegypti*, foi caracterizada no século XVIII (GUBLER, 2002). Sua expansão ocorreu no final do século XX atingindo regiões tropicais e subtropicais incluindo o Brasil. Em 1950, através de programas de combate ao vetor chegou-se a sua erradicação, mas após vinte anos sem registro da doença ocorreu a sua reincidência (TEIXEIRA, BARRETO e GUERRA, 1999; TEIXEIRA et al., 2001).

A doença, em vista das epidemias ocorridas nos últimos anos, tornou-se um problema contemporâneo para o sistema sanitário brasileiro. A dengue tem como agente etiológico um arbovírus que apresenta quatro diferentes sorotipos (DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4) (PUGACHEV et al., 2003).

As pesquisas desenvolvidas na busca de vacinas para utilização em populações humanas, apesar de alguns avanços, ainda não geraram resultados satisfatórios (GUZMÁN, 1988). Sendo assim, a medida de controle disponível para se evitar as infecções causadas pelo vírus da dengue é o combate ao seu principal vetor urbano, o mosquito *Aedes aegypti* (TEIXEIRA e BARRETO, 1996).

O problema de descontrole da população do mosquito ocorreu devido à progressiva adaptação do mesmo à natureza e resistência aos inseticidas (ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD-OMS, 1986).

As estratégias utilizadas para controle das larvas e dos mosquitos *Ae. aegypti* são baseadas no uso de várias técnicas disponíveis como: o emprego do bioinseticida *Bacillus thuringiensis* H-14 (Bti), peixes larvófagos das espécies *Gambusia affinis* e *Poecilia* spp (ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD, 1995) e dos inseticidas químicos piretroides, carbamatos e organofosforados, além da melhoria de saneamento (LEFREVE et al., 2003).

Nesse contexto, a busca de novas substâncias alternativas mais eficazes e menos tóxicas tanto ao homem quanto à natureza para combate à larva do *Ae. aegypti* é necessária. A biota de Mato Grosso do Sul, representada principalmente pelo Cerrado e Pantanal, é uma fonte alternativa de novos protótipos com atividade larvicida. Porém, a exploração econômica tem causado drástica redução da população de várias espécies vegetais típicas da região, além de escassos dados descritos na literatura sobre a sua diversidade biológica.

Estes dados são preocupantes e por estas razões, é necessário ampliar o estudo interdisciplinar destes biomas objetivando seu manejo sustentável. Assim, a investigação

química de substâncias bioativas em plantas de Mato Grosso do Sul requer urgência na sua realização em virtude do rápido avanço das mudanças ambientais causadas pelo homem.

Neste trabalho foi realizada triagem em cinquenta extratos de plantas oriundas do Cerrado ou Pantanal de Mato Grosso do Sul objetivando a busca de substância(s) com atividade larvicida.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Considerações gerais sobre a dengue

A dengue é considerada uma doença reemergente, apresentando expansão mundial, tendo as primeiras referências durante os séculos XVIII e XIX. Provavelmente a disseminação do vetor deu-se via navegação, pois os mosquitos utilizavam como criadouro para deposição dos ovos a água que ficava armazenada nos navios durante longas viagens, e com isso mantinha o seu ciclo de reprodução. Assim, os insetos e vírus eram introduzidos nas regiões e, devido o modo lento de transporte, as epidemias não eram frequentes (GUBLER, 2002).

O reconhecimento do *Ae. aegypti* como sendo vetor da febre amarela ocorreu no ano de 1881, por Carlos J. Finlay (RODRIGUEZ e FINLAY, 1971; BISSET, 2002). Porém, só no século seguinte, em 1906, Bancroft constatou as primeiras evidências de que o mosquito também era o vetor da dengue, o que foi posteriormente confirmado por outros pesquisadores (HALSTEAD, 1974).

Um grande número de pessoas tem seus domicílios em áreas onde há possibilidade da transmissão do vírus do dengue, principalmente as que residem em regiões com clima tropical e subtropical. A cada ano ocorre novos casos de infecções incluindo o aumento das notificações da dengue hemorrágica, esta podendo evoluir para a forma mais severa, a síndrome do choque, fazendo dessa doença um problema importante de saúde pública (LINDBÄCK et al., 2003; WORLD HEALTH ORGANIZATION-WHO, 1986; PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION - PAHO, 2004).

A dengue é considerada a mais importante arbovirose que afeta o homem em termos de morbidade e mortalidade (GUBLER, 1987). No Brasil, já foi constatada a disseminação tanto do vetor quanto do vírus nos 26 Estados e no Distrito Federal (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2003).

Vários fatores contribuíram para o aumento excessivo da dengue nos últimos 50 anos (GREGSON e EDELMAN, 2003), sendo que a maior ampliação ocorreu nos países em desenvolvimento devido ao crescimento desordenado e a falta de serviços básicos, como a estrutura de fornecimento de água, esgoto e a coleta de lixo, os quais favoreceram a proliferação do *Ae. aegypti* (WORLD HEALTH ORGANIZATION-WHO, 1986; PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION - PAHO, 2004).

2.1.1 Os vetores do vírus da dengue e ciclo de transmissão

O mais importante vetor da dengue é o *Aedes aegypti*, inseto pertencente à família Culicidae, do subgênero *Stegomyia*. Apesar de vários trabalhos já terem demonstrado a possibilidade de outras espécies deste gênero (GUBLER, 1987), como *Aedes albopictus* e *Aedes polynesiensis* também exercer esta função (BANCROFT, 1906).

Este mosquito tem hábitos domésticos apresentando a hematofagia, cópula e oviposição no período diurno (primeiras horas da manhã e ao anoitecer), e manifesta preferência pelo sangue humano, mas se alimentam também em cães, roedores e aves. Adapta-se facilmente ao ambiente urbano, onde encontra as condições necessárias para sua reprodução. Tanto o macho quanto a fêmea alimenta-se de néctar ou seiva vegetal, porém a fêmea, após o acasalamento, faz hematofagia, devido à necessidade da albumina e proteínas para maturação dos ovos. O intervalo entre o repasto e a oviposição é de dois a três dias, com igual período para eclosão (ROZENDAAL, 1997a).

O mosquito adulto é facilmente reconhecido por sua cor geralmente marrom, apresentado uma nítida faixa curva, branco-prateada de cada lado do tórax e outras duas faixas mais finas, retas longitudinais, centrais, as quais formam a figura de uma lira (LOZOVEI, 2001) (Figura 1- a, b).



Figura 1- Aspectos da morfologia externa do adulto fêmea do *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762); observar escudo adornado com escamas branco-prateadas formando um desenho em forma de lira e listas nas patas. Fonte: a- b - <http://www.eol.org/pages/740699>. Acesso em: 01/10/09

O ciclo de vida do mosquito (Figura 2) ocorre por metamorfose completa compreendendo: ovo, larvas (quatro estádios evolutivos), pupa e adulto (SILVA, SILVA e LIRA, 1998).

Um dos principais fatores que contribui a distribuição dos mosquitos nos criadouros é a seleção do local da oviposição. As fêmeas de *Ae. aegypti* depositam seus ovos na parede interna dos recipientes naturais ou artificiais, preferencialmente em locais fora do meio líquido (para manutenção da viabilidade dos ovos), mas próximos a reservatórios com água. Geralmente são usados como locais para ovoposição pneus, materiais plásticos descartáveis, caixas d'água descobertas, garrafas, pratos de vasos de plantas ou qualquer outro local que possa armazenar água, opções de criadouros para a população vetora (CHRISTOPHERS, 1960; NELSON, 1986;).

A deposição dos ovos é realizada em pequenos grupos e, após completar o período embrionário os ovos tornam-se resistentes a longos períodos de dessecação, podendo prolongar-se por mais de um ano. Dessa forma, sobrevivem durante o período de estiagem e com a chegada das chuvas, principalmente no verão, obtém as condições ambientais favoráveis para iniciar o ciclo (FORATTINI, 2002).

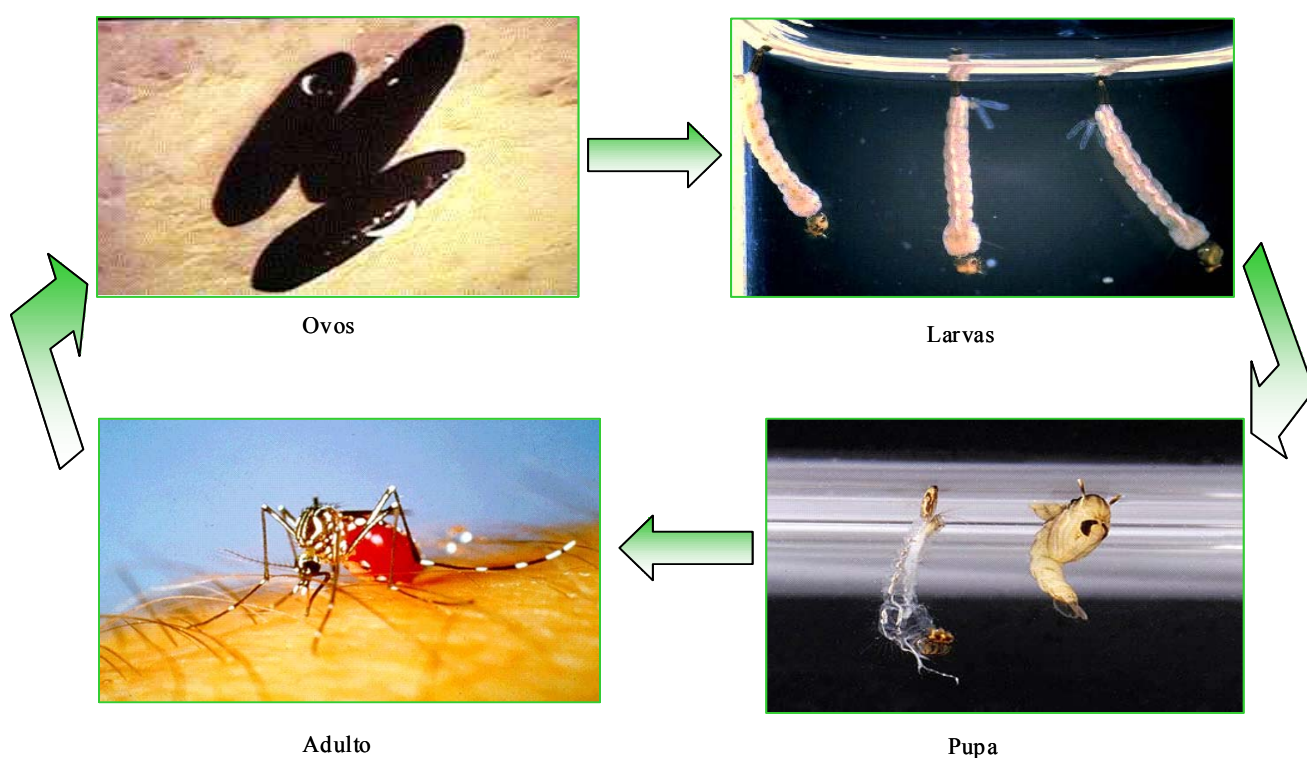


Figura 2 - Representação esquemática do ciclo de vida do mosquito *Aedes aegypti*, mostrando as fases ovo, larva, pupa e adulto. Fonte: Livro - Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias (LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 2005)

Outro vetor com grande potencial de transmissão da dengue é o *Ae. albopictus*. Nas Américas não há evidências de sua participação na transmissão do vírus (IBAÑEZ-BERNAL

et al., 1997; SERUFO et al., 2003), entretanto, estudos laboratoriais comprovaram que esta espécie é capaz de ser infectada com o vírus e transmiti-lo (MILLER e BALLIGER, 1988; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA et al., 2003; CASTRO et al., 2004).

Aedes albopictus é considerado o vetor primário da dengue na Ásia, sendo associada a sua transmissão nos ambientes rurais, semi-rurais e, em menor extensão, urbanos (MILLER e BALLIGER, 1988). Devido à sua biologia, há grande preocupação com relação a este mosquito, pois esta espécie pode representar um elo entre os ciclos urbano e silvestre da febre amarela. O mosquito adulto apresenta um escudo com faixa longitudinal de escamas prateadas (LOZOVEI, 2001) (Figura 3 - a, b).



Figura 3 - Aspectos da morfologia externa do adulto fêmea do *Aedes albopictus* (Skuse, 1894), observar escudo com faixa longitudinal de escamas prateadas e listas nas patas. Fonte: a- <http://www.eol.org/pages>; b - www.padil.gov.au/viewPestDiagnosticImages. Acesso em: 01/10/09.

A transmissão da doença (Figura 4) ocorre a partir da picada da fêmea do mosquito infectado com um dos quatro sorotipos. O período de incubação no mosquito (período extrínseco) varia de 12 a 14 dias, após ter sugado sangue virêmico de um hospedeiro, circunstância em que o mosquito se torna capaz de propagar a doença, assim permanecendo pelo resto da vida. Não há transmissão por contato direto de um doente ou de suas secreções para uma pessoa sadia, nem através de água ou alimento (KUNO 1995 e 1997).

O vírus também pode ser passado da fêmea do mosquito para sua prole através da transmissão transovariana (ROSEN, 1987).

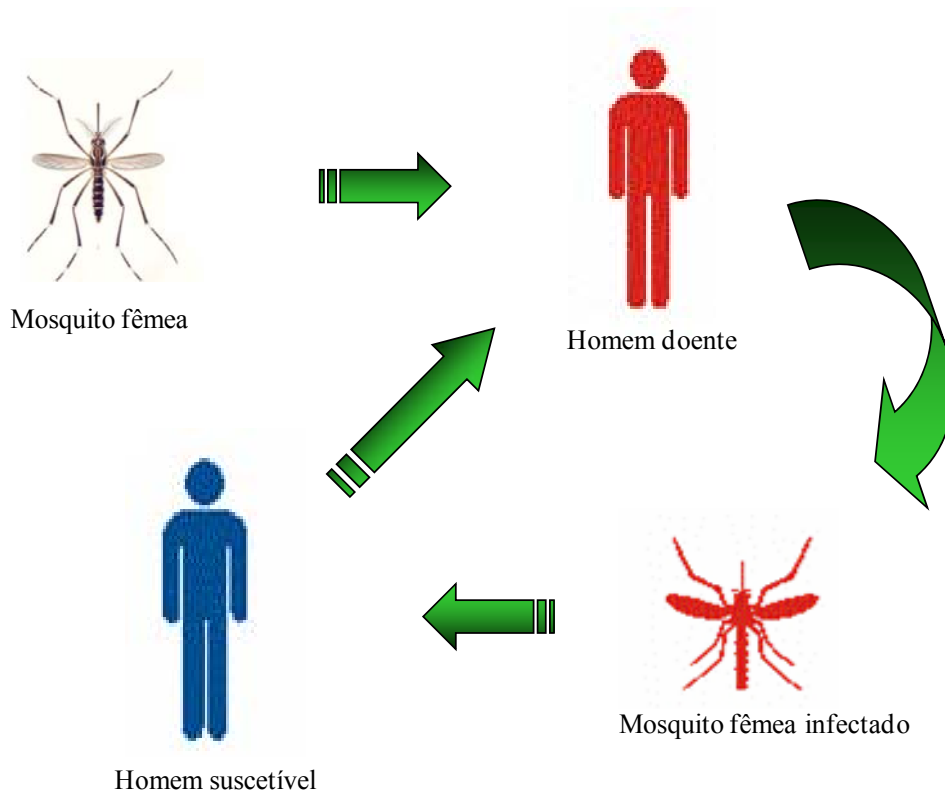


Figura 4 - Ciclo de transmissão do vírus da dengue.

2.1.2 Patogenia do vírus da dengue

Logo após a picada do mosquito ocorre a inoculação do vírus, que inicialmente replica-se em linfonodos locais, células musculares estriadas, lisas e fibroblastos. Através dessa multiplicação produz-se a viremia e a propagação do vírus por todo o organismo, livre no plasma ou no interior de monócitos/macrófagos (MONATH, 1986).

No homem o período de incubação (período intrínseco) varia de 3 a 14 dias, geralmente em torno de cinco a seis dias. Já o período de viremia apresenta seu estágio inicial um dia antes do aparecimento da febre e permanece até o sexto dia da enfermidade. A infecção por um dos sorotipos (DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4) só confere imunidade permanente para aquele sorotipo, sendo possível ocorrer imunidade cruzada transitória, de curta duração, entre os diferentes sorotipos (IBAÑEZ-BERNAL et al., 1997).

Clinicamente, a dengue pode evoluir para duas formas distintas; clássica, considerada benigna e hemorrágica, de gravidade variável podendo ser fatal (MARCONDES, 2001).

A dengue clássica manifesta-se de forma muito instável, a maioria da vezes com “febre alta (39° a 40°) de início repentino, seguida de cefaléia, prostração, astenia, mialgia, artralgia, dor retro-orbitária, anorexia, náuseas, vômitos e exantema. Associada à síndrome

febril, em alguns casos pode ocorrer hepatomegalia dolorosa e, principalmente nas crianças, dor abdominal generalizada. Os adultos podem apresentar manifestações hemorrágicas, como petéquias, epistaxe, gengivorragia, sangramento gastrointestinal, hematúria e metrorragia. Com o desaparecimento da febre, há regressão dos sinais e sintomas, podendo ainda persistir a fadiga” (HARRIS et al., 2001; GUZMÁN e KOURÍ, 2002).

Já a dengue hemorrágica, apresenta sintomas iniciais muito semelhantes à dengue clássica, mas estes podem progredir rapidamente para manifestações hemorrágicas e choque. Os casos típicos da dengue hemorrágica são caracterizados por “febre alta, fenômenos hemorrágicos, hepatomegalia e insuficiência circulatória”. O caso mais grave, denominado choque pode ocorrer entre o 3º e 7º dia de doença, geralmente precedido por dores abdominais. Esta manifestação tem curta duração, podendo levar ao óbito em 12 a 24 horas ou à reabilitação rápida após terapia apropriada. Uma importante análise laboratorial para diagnóstico da dengue hemorrágica é a determinação da trombocitopenia com hemoconcentração (HARRIS et al., 2001; FIGUEIREDO e FONSECA, 2002; GUZMÁN e KOURÍ, 2002).

2.1.3 Tratamento

Até o momento, não existe droga antiviral de uso clínico que apresente uma ação eficaz contra o vírus do dengue. O tratamento geralmente é realizado para os casos benignos da doença em função dos sintomas: febre indiferenciada e febre da dengue clássica com tratamento sintomático da febre, cefaléia, mialgias e artralguas, devendo-se evitar o uso de salicilatos (FIGUEIREDO e FONSECA, 2002). Por interferir no processo de coagulação, o uso de ácido acetil salicílico (AAS) e seus derivados devem ser evitados, pois estes reduzem a adesão das plaquetas e, na dengue, a diminuição do número de plaquetas (plaquetopenia) é frequente.

Nos casos de Febre da dengue hemorrágico (DHF) /Síndrome de choque da dengue (DSS) medidas terapêuticas podem ser imprescindíveis, das quais dependerá a vida do paciente. Quando há indícios de casos suspeitos os pacientes deverão ser mantidos em observação, sendo necessário um controle através de exames clínicos para evitar o aumento agudo da permeabilidade vascular com extravasamento de líquidos para o interstício (WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO, 1986; DIETZE, 1991).

2.1.4 Controle de vetores e resistência a inseticidas

As atividades de controle de insetos se constituem numa prática antiga, havendo registros relatados na China há cerca de 2000 anos, sendo essas ações conduzidas no combate das pragas agrícolas (ROZENDAAL, 1997b).

Pelo conhecimento técnico científico, sabe-se que para o controle de vetores são utilizados vários métodos, devendo estes serem adequados à realidade de cada local para serem executados de forma integrada e seletiva (ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD, 1995, 1999). Os procedimentos utilizados abrangem a vigilância, redução da fonte (ou manejo ambiental), controle biológico, controle químico com uso de inseticidas e repelentes, armadilhas e manejo da resistência a inseticidas, agregados às ações educativas (ROSE, 2001).

A utilização de produtos químicos ainda constitui a técnica mais utilizada no controle da transmissão de dengue. O grande problema associado ao controle químico é a resistência. Com o uso de maneira indiscriminada dos inseticidas, tanto na agricultura e agropecuária quanto na área de Saúde Pública, ocorreu a seleção de indivíduos menos susceptíveis aos inseticidas, assim aumenta a frequência de indivíduos resistentes na população, dificultando ou mesmo inviabilizando programas de controle dos mosquitos, conseqüentemente ocorre a re-emergência das doenças transmitidas por vetores (BROGDON e MCALLISTER, 1998). Além da constatação da resistência é importante salientar que, para as estratégias de controles serem efetivas é fundamental conhecer os seus mecanismos.

Segundo Miller (1998), a resistência pode ser classificada em: comportamental, redução da penetração do inseticida pela cutícula do inseto, alterações nos sítios alvos de ação dos inseticidas e mudanças nos sistemas enzimáticos para uma rápida detoxificação.

A resistência comportamental resulta da resposta à pressão seletiva causada pelos xenobióticos, esta consiste na seleção de indivíduos com aptidão parcial ou total para evitar o contato com o inseticida (ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD - OMS, 1986; DONALÍSIO e GLASSER, 2002).

O mecanismo de redução à penetração do inseticida pela cutícula ocorre devido às alterações fisiológicas do inseto e na química da exocutícula, conferindo resistência secundária, entretanto, apresenta importância quando associado a outros mecanismos de resistência (BADII e ALMANZA, 2007).

A atuação dos inseticidas químicos no organismo do inseto apresenta alta especificidade pelo sítio ativo, conseqüentemente ocorrendo alterações nesses locais e

incidindo no impedimento ou dificultando a interação com o praguicida acarretando a resistência (KARUNARATNE e HEMINGWAY, 2001; SODERLUND e KNIPPLE, 2003).

O mecanismo mais estudado quanto à resistência dos insetos a inseticidas é a detoxificação (DAVID et al., 2005). Através desse processo o inseto converte o inseticida em uma forma menos tóxica ou inativa podendo ocorrer pela ação de enzimas (BRAGA e VALLE, 2007). Várias enzimas podem estar presentes nesse mecanismo principalmente pertencentes às classes das Monooxigenases, Esterases e Glutathione-S-transferase (OPPENORTH, 1984; YU e NUGYEN, 1992; HEMINGWAY e RANSON, 2000).

2.1.5 Mecanismos de ação dos inseticidas químicos e biológico

A toxicidade de uma substância química para insetos não a qualifica necessariamente como praguicida. Para tal, devem estar associadas várias propriedades à atividade, tais como: eficácia em pequenas concentrações, baixa toxicidade para mamíferos e animais superiores, ausência de fitotoxicidade e ser biodegradável. Estas propriedades são consideradas as ideais para inseticidas, porém dificilmente será encontrado um produto que agreguem todas elas (NATH e KUMAR, 1999).

As plantas têm sido uma importante fonte de ativos com diferentes estruturas químicas e com diversas atividades contra insetos. Na década de 40 os inseticidas de origem natural foram muito utilizados no combate às pragas agrícolas. Dentre os inseticidas orgânicos, cujas substâncias ativas são provenientes de plantas destacam-se o alcaloide nicotina isolado de espécies de *Nicotiana*; os piretroides piretrina e aletrina extraídos das flores do *Chrysanthemum cinerariaefolium* e o rotenoide rotenona isolado de espécies do gênero *Derris* e *Lonchocarpus* (SOLOWAY, 1976) (Figura 5).

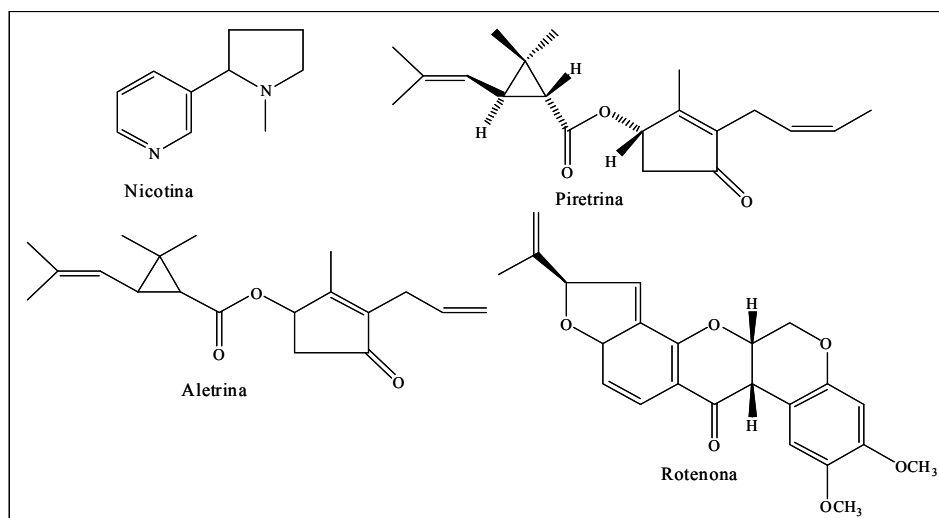


Figura 5 - Exemplos de substâncias químicas de origem vegetal com atividade inseticida.

No período de 1950 a 1970, os inseticidas de origem sintética substituíram os inseticidas de origem natural. Passaram a serem utilizados os organoclorados DDT, BHC, Aldrin, Dieldrin e Clordano (CORBETT, WRIGHT e BAILLE, 1984). O DDT (dicloro-difenil-tricloroetano) foi o primeiro inseticida com efeito prolongado utilizado para o controle de vetores e tinha um efeito continuado por vários meses quando aplicado em paredes e tetos de casa (ROZENDAAL, 1997b). Entretanto, a sua alta persistência e ação indistinta atingindo tanto os vetores quanto a fauna e flora da área, causava impacto negativo ao meio ambiente (MATUO, LOPES e CASANOVA, 1990).

Na década seguinte (1980), devido ao uso indiscriminado dos organoclorados, houve a necessidade de mudança no combate às pragas agrícolas, pois, simplesmente introduzir novos agentes, cada vez mais tóxicos, não garantia o controle. Surgem os inseticidas sintéticos, mais seletivos, que atacavam as pragas específicas e não destruíam simultaneamente inimigos naturais dos insetos-alvos. A estratégia de controle baseava-se na utilização dos inseticidas químicos organofosforados e piretroides (SOAERES et al., 1996; LUNA et al., 2004).

A escolha dos inseticidas químicos das classes dos organofosforados, carbamatos e piretroides é devido à sua forte atividade biológica, ligada à sua relativa instabilidade no meio ambiente, tendo uma meia-vida curta (STORM, ROZMAN e DOULL, 2000).

Os organofosforados e carbamatos apresentam como mecanismo de ação a inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE) presente no sistema nervoso de vertebrados e invertebrados. Esses pesticidas atuam no sítio esterásico, formando um complexo enzima-inibidor, cuja estabilidade está relacionada com a estrutura química do inseticida. Os organofosforados interagem no sítio ativo de modo irreversível, enquanto os carbamatos, por terem uma interação menos estável, atuam de modo reversível (FOURNIER e MUTERO, 2001; JOKANOVIC, 2001).

A AChE tem como função hidrolisar a acetilcolina em ácido acético e colina (Figura 6). A acetilcolina é um mediador químico, responsável pela transmissão dos impulsos nervosos nas sinapses dos neurônios colinérgicos do sistema nervoso central e periférico. Com a inibição da acetilcolinesterase aumenta o nível de acetilcolina nas sinapses ocasionando paralisia e a morte do inseto (PADILHA, WILSON e BUSHNELL, 1994; KARCZMAR, 1998).

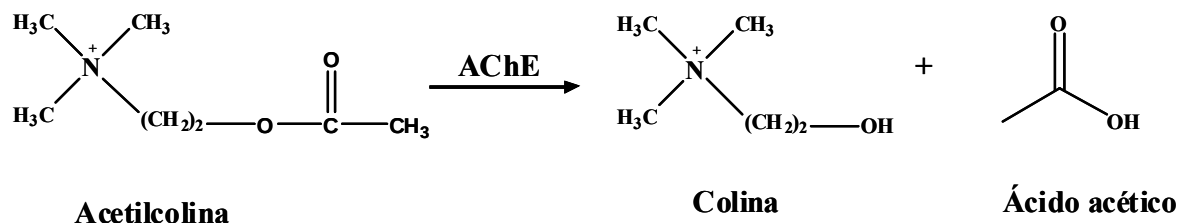


Figura 6 - Reação de hidrólise da acetilcolina.

Os piretroides alteram a permeabilidade do sódio na membrana do axônio impedindo a repolarização normal após o impulso nervoso, levando o inseto a uma morte rápida (CHAMBERS e CARR, 1995). De uma maneira abrangente esses praguicidas atuam em nível de sistema nervoso do inseto.

A utilização do controle químico continua sendo uma das principais táticas utilizadas para o combate dos vetores, entretanto, devido à resistência a inseticidas dos culicídeos e as escassas opções de novos praguicidas a situação torna-se crítica (PAUL, HARRINGTON e SCOTT, 2006).

Devido ao intenso uso de praguicidas, muitas espécies têm desenvolvido vários mecanismos de defesa para sua sobrevivência, conseqüentemente ocorre a redução da eficácia do produto devido à morte de todos os indivíduos suscetíveis, restando apenas os imunes ao produto (MACORIS et al., 1999), como é o caso do mosquito *Aedes aegypti*, cuja população se adapta rapidamente às condições de mudanças ambientais e apresenta rápida recuperação após as intervenções de controle (JAMAL, HANSEN e JULU, 2002).

A necessidade de mudança periódica para atividade de controle desses insetos requer o uso de novos inseticidas ou substituição de métodos físicos e biológicos pelo maior tempo possível (ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD – OMS, 1992). Surge no mercado inseticidas alternativos como toxinas de bactérias entomopatogênicas (*Bt-Bacillus thuringiensis* e *Bs-Bacillus sphaericus*) e reguladores do crescimento de insetos (IGRs – Insect Growth Regulators) (MELLON e GEORGHIOU, 1984; RATHBURN Jr, 1985; FOURTNET, SANNIER e MONTENY, 1993).

O biolarvicida obtido da bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis* var. israelensis (Bti), é utilizado como opção de substância ativa, apresentando como principal componente um corpo paraesporal produzido durante a esporulação, composto pelas proteínas endotoxinas Cry (cristal tóxico) e Cyt (toxina com atividade citolítica e hemolítica), as quais atuam de modo sinérgico com outros pesticidas (DELÉCLUSE, PÉREZ e BERRY, 2000). A bactéria libera estas toxinas na forma de protoxinas ainda inativas, que chegando ao intestino

médio do inseto são ativadas por ação de proteases causando lise do epitélio e/ou interrompendo a secreção normal e favorecendo a germinação dos esporos, o que leva à morte do inseto (POLANCZYK, GARCIA e ALVES, 2003).

A ação conjunta dessas toxinas, aliada à ação de outros pesticidas, geralmente organofosforados, reduz a possibilidade de resistência (BECKER, 2000; REGIS et al., 2001). Apesar de ser um método de controle eficaz e com baixo efeito residual, esta toxina sofre efeito de inativação com a exposição direta à luz solar (BECKER et al., 1992; Yu-TIEN et al., 1993; OBETA, 1996).

Na tentativa de superar o problema de resistência em insetos, uma nova geração de inseticida entra no mercado como alternativa em situações onde há indícios de resistência aos piretroides e organofosforados (FLOORE, 2006; WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO, 2006). Os reguladores de desenvolvimento de insetos (IGRs) compõem a terceira geração de inseticidas após os inorgânicos e os orgânicos sintéticos (CONSOLI e LOURENÇO-de-OLIVEIRA, 1994; CASIDA e QUISTAD, 1998). Estes grupos de compostos são quimicamente bastante heterogêneos incluindo os análogos e antagonistas de hormônio juvenil, análogos e antagonistas de ecdisona e inibidores de síntese de quitina (GRAF, 1993; KOSTYUKPVSKY e TROSTANETSKY, 2006).

Dentre os inibidores da síntese de quitina, os derivados do benzoilfenil ureia destacam-se por sua ação inibidora na deposição de quitina (COHEN, 2001). O 1-(4-clorofenil)-3-(2,6-difluorobenzoil)-ureia, conhecido como Diflubenzuron, foi o primeiro composto desse grupo a ser comercializado. Inicialmente seu uso era para controle de ervas daninhas, porém exibiu pobre atividade herbicida (TUNAZ e UYGUN, 2004).

Pesquisadores observaram que os insetos alimentados com folhas tratadas com Diflubenzuron tinham dificuldades em fazer a muda (EISLER, 1992). O inseticida atua inibindo a síntese da quitina durante o estágio mais suscetível do inseto, a fase jovem, em virtude de suas sucessivas ecdises. Esses inseticidas possuem efeito pronunciado sobre as larvas, que não conseguem sobreviver a muda devido a malformações da nova cutícula (FOURTNET, SANNIER e MONTENY, 1993; GROSSCURT, HAAR e JONGSMA, 1988).

A incessante busca por novos ativos inseticidas e o estímulo às pesquisas que visam à utilização de plantas como uma alternativa para o controle de mosquitos vetores de doenças, como a dengue, levam pesquisadores à investigação e ao isolamento de metabólitos secundários de plantas que possam atuar como larvicida ou adulticida de forma eficaz com baixa toxicidade ao homem e a natureza.

2.1.6 Produtos naturais com atividade larvicida

2.1.6.1 Substâncias de origem natural (planta/microorganismo) com atividade larvicida.

A maioria das células e dos organismos vivos possui rotas metabólicas designadas como metabolismo primário, à qual pertencem os processos essenciais à vida e comuns aos seres vivos, sendo incluídas as macromoléculas (carboidratos, lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos). Entretanto, muitas organelas sintetizam compostos orgânicos que não estão diretamente ligados ao crescimento e/ou desenvolvimento do organismo, porém conferem vantagens relacionadas principalmente, à fecundidade e sobrevivência (DEWICK, 1997). Estas vias metabólicas recebem o nome de metabolismo secundário e, diferentemente do primário, não estão distribuídas igualmente em todos os grupos taxonômicos, sendo algumas delas exclusivas de poucos organismos (MANN et al., 1994).

Os metabólitos secundários, antes considerados produtos de excreção vegetal, são compostos extremamente úteis para defesa e proteção, principalmente para plantas, que são organismos fixos, susceptíveis às mudanças e aspectos do ambiente. Algumas das funções relatadas são proteções contra herbívoros e infecção microbiana, atração de polinizadores, agentes alelopáticos, proteção contra raios UV entre outras (SIMÕES et al., 2000).

A pesquisa com metabólitos secundários apresenta uma grande importância por serem considerados compostos altamente bioativos, visto que muitos medicamentos têm como origem moléculas orgânicas provenientes do metabolismo secundário, principalmente de plantas (CROTEAU, KUTCHAN e LEWIS, 2000; SIMÕES et al., 2000). Além do interesse terapêutico, a pesquisa com esses bioativos estende-se a várias outras áreas como: perfumaria, alimentícia, agrônoma, entre outras (BELL e CHARLWOOD, 1980; WINK, 1990).

A fitoquímica estuda os produtos provenientes do metabolismo secundário dos vegetais compreendendo as etapas de isolamento, purificação e determinação estrutural desses metabólitos (BRAZ-FILHO, 1994). Este estudo, quando associado a ensaios específicos de atividade biológica, permite identificar, analisar e caracterizar frações ou substâncias bioativas presentes em uma determinada espécie. Ressalta-se que nos extratos brutos os constituintes ativos estão normalmente em pequenas concentrações (SCHENKEL GOSMANN e PETROVICK, 2000).

O estudo de produtos naturais obtidos de plantas e fungos com atividade larvicida é recente. A partir da década de 80 são encontrados alguns trabalhos realizados (Tabela 1) com o intuito de isolar tais substâncias, enquanto nos trabalhos anteriores (QURESHI, MOHIUDDIN e BADAR, 1986; MWANGI e REMBOLD, 1988) as pesquisas eram feitas apenas com extratos. Estas substâncias, algumas delas com $CL_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$, pertencem a diversas classes e suas estruturas são mostradas nas figuras de 7 a 21

Tabela 1 - Substâncias isoladas de espécies de plantas/fungos com atividade larvídica.

Espécies - plantas	Parte da planta utilizada	Classe das substâncias larvídicas	Substâncias larvídicas	Doses	Tempo de exposição das larvas	Referências
<i>Diplolephium huchanani</i>	Folhas	Fenilpropanoides	Elemicina + trans-isoelemicina	CL ₁₀₀ - 100,00ppm	24h	MARSTON, HOSTETTMANN e MSONTHI, 1995
<i>Cordia alliodora</i>	Raiz	Fenilpropanoides	1-(3'-metóxi-propanoil)-2,4,5-trimetóxi-benzeno	CL ₁₀₀ - 12,50µg/mL	24h	IOSET et al., 2000a
<i>Chamaecyparis obtusa</i>	Folhas	Sesquiterpeno	β-thujaplicina	CL ₅₀ - 2,91ppm	24h	JANG, JEON e LEE, 2005
<i>Myroxylon balsamum</i>	Casca secas	Sesquiterpeno	6-E-nerolidol	CL ₅₀ - 17,00ppm	24h	SIMAS et al., 2004
<i>Mansonia gagei</i> Drumm	Cerne	Sesquiterpeno	Mansonona C	CL ₁₀₀ - 6,25ppm	24h	TIEW et al., 2003
<i>Diplolephium buchanani</i>	Folhas	Sesquiterpeno	Miristicina	CL ₁₀₀ - 25,00ppm	24h	MARSTON HOSTETTMANN e MSONTHI, 1995
<i>Targionia lorbeeriana</i>	Cerne	Sesquiterpeno lactona	Desidrocostus lactona	CL ₁₀₀ - 12,50ppm	24h	NEVES et al., 1999
<i>Poncirus trifoliata</i> L.	Raiz	Cumarina	Marmesina	CL ₅₀ - 0,08mg/L	24h	RAJKUMAR e JEBANESAN, 2008
<i>Diplolephium buchanani</i>	Folhas	Cumarina	Oxipeucedanina	CL ₁₀₀ - 25,00ppm	24h	MARSTON, HOSTETTMANN e MSONTHI, 1995
<i>Esenbeckia grandiflora</i>	Raiz	Cumarina	Pimpineline + produto dimerizado	CL ₅₀ - 45,77ppm	24h	OLIVEIRA et al., 2005
<i>Esenbeckia grandiflora</i>	Raiz	Cumarina	Pimpineline + Swietenocoumarina B	CL ₅₀ - 62,23ppm	24h	OLIVEIRA et al., 2005
<i>Lonchocarpus chiricanus</i>	Casca da raiz	Estilbenos prenilados	Chiricanina A	CL ₁₀₀ - 6,00ppm	24h	IOSET et al., 2001
<i>Lonchocarpus chiricanus</i>	Casca da raiz	Estilbenos prenilados	Chiricanina B	CL ₅₀ > 50,00ppm	24h	IOSET et al., 2001
<i>Lonchocarpus chiricanus</i>	Casca da raiz	Estilbenos prenilados	Chiricanina C	CL ₅₀ > 50,00ppm	24h	IOSET et al., 2001
<i>Lonchocarpus chiricanus</i>	Casca da raiz	Estilbenos prenilados	Chiricanina D	CL ₅₀ > 50,00ppm	24h	IOSET et al., 2001
<i>Lonchocarpus chiricanus</i>	Casca da raiz	Estilbenos prenilados	Longistilina C	CL ₁₀₀ - 50,00ppm	24h	IOSET et al., 2001
<i>Lonchocarpus chiricanus</i>	Casca da raiz	Estilbenos prenilados	Longistilina D	CL ₁₀₀ - 6,00ppm	24h	IOSET et al., 2001
<i>Lonchocarpus chiricanus</i>	Casca da raiz	Estilbenos prenilados	3,5-dimetóxi-estilbeno	CL ₁₀₀ - 3,00ppm	24h	IOSET et al., 2001
<i>Erythroxylum passerinum</i>	Folhas	Diterpenos	14-O-metil-rianodanol	CL ₅₀ - 82,00 ppm	24 e 48h	BARREIROS et al., 2007
<i>Copaifera reticulata</i> Ducke	Resina-óleo	Diterpenos	Acetato do ácido alepterólico	CL ₅₀ - 0,80ppm	24h	GERIS et al., 2008a
<i>Copaifera reticulata</i> Ducke	Resina-óleo	Diterpenos	Ácido alepterólico	CL ₅₀ - 87,30ppm	24h	GERIS et al., 2008a

Continuação

<i>Pterodon polygalaeflorus</i>	Sementes	Diterpenos	6 α -hidróxi-vouacapano - 7 β , 17 β -lactona	CL ₅₀ - 50,08 μ g /mL	24h	OMENA et al., 2006
<i>Pterodon polygalaeflorus</i>	Sementes	Diterpenos	Ácido 6 α , 7 β -diidróxi-vouacapano-17 β -oico	CL ₅₀ - 14,69 μ g /mL	24h	OMENA et al., 2006
<i>Pterodon polygalaeflorus</i>	Sementes	Diterpenos	Metil 6 α , 7 β -diacetóxi-vouacapano-17 β -oato de metila	CL ₅₀ - 21,76 μ g /mL	24h	OMENA et al., 2006
<i>Melicope subunifoliolata</i>	Folhas	Flavonoides	Meliteratina	CL ₅₀ - 0,47 μ g/mL	24h	HO et al., 2003
<i>Poncirus trifoliata</i> L.	Raiz	Flavonoides	Poncirina	CL ₅₀ - 0,10mg/L	24h	RAJKUMAR e JEBANESAN, 2008
<i>Poncirus trifoliata</i> L.	Raiz	Flavonoides	Rhoifolina	CL ₅₀ - 0,08mg/L	24h	RAJKUMAR e JEBANESAN, 2008
<i>Poncirus trifoliata</i> L.	Raiz	Flavonoides	Naringina	CL ₅₀ - 0,12mg/L	24h	RAJKUMAR e JEBANESAN, 2008
<i>Cryptomeria japonica</i>	Várias	Quinonas	Tectoquinona	CL ₅₀ - 3,30 μ g /mL	24h	CHENG et al., 2008
<i>Cassia obtusifolia</i>	Sementes	Quinonas	Emodina	CL ₅₀ - 1,90mg/L	-----	YANG, LIM e LEE, 2003
<i>Cassia obtusifolia</i>	Sementes	Quinonas	Purpurina	CL ₅₀ - 19,60mg/L	-----	YANG, LIM e LEE, 2003
<i>Sterculia guttata</i>	Sementes	Quinona	Bis (2-etil-exil) benzeno-1,2-dicarboxilato	CL ₅₀ - 79,00ppm	24h	KATADE et al., 2006
<i>Cordia curassavica</i>	Raiz	Quinona	Cordiaquinona A	CL ₁₀₀ - 12,50ppm	24h	IOSET et al., 2000b
<i>Cordia curassavica</i>	Raiz	Quinona	Cordiaquinona B	CL ₁₀₀ - 25,00ppm	24h	IOSET et al., 2000b
<i>Cordia linnaei</i>	Raiz	Quinona	Cordiaquinona E	CL ₁₀₀ - 12,50ppm	24h	IOSET et al., 1998
<i>Cordia linnaei</i>	Raiz	Quinona	Cordiaquinona G	CL ₁₀₀ - 50,00ppm	24h	IOSET et al., 1998
<i>Cordia linnaei</i>	Raiz	Quinona	Cordiaquinona H	CL ₁₀₀ - 25,00ppm	24h	IOSET et al., 1998
<i>Cordia curassavica</i>	Raiz	Quinona	Cordiaquinona J	CL ₁₀₀ - 25,00ppm	24h	IOSET et al., 2000b
<i>Cordia curassavica</i>	Raiz	Quinona	Cordiaquinona K	CL ₁₀₀ - 12,50ppm	24h	IOSET et al., 2000b
<i>Millettia dura</i>	Sementes	Rotenoides	Deguelina	CL ₅₀ - 1,60 μ g/mL	24h	YENESEW et al., 2003
<i>Millettia dura</i>	Sementes	Rotenoides	Tephrosina	CL ₅₀ - 1,40 μ g/mL	24h	YENESEW et al., 2003
<i>Derris trifoliata</i>	Sementes	Rotenoides	Rotenona	CL ₅₀ - 0,47 μ g/mL	24h	YENESEW et al., 2006
<i>Calodendrum capense</i> Thunb	Casca da raiz	Limonoides	Limonina	CL ₅₀ - 71,60ppm	24h	KIPROP, RAJAB e WANJALA, 2005
<i>Azadirachta indica</i>	Folhas frescas	Limonoides	6 α -O-acetil-7-deacetilnimocinol	CL ₅₀ - 21,00ppm	24h	SIDDIQUI et al., 2000
<i>Harrisonia abyssinica</i>	Casca da raiz	Limonoides	Pedonina	CL ₅₀ - 59,20 μ M	24h	KIPROP et al., 2007
<i>Harrisonia abyssinica</i>	Casca da raiz	Limonoides	Harrisonina	CL ₅₀ - 28,10 μ M	24h	KIPROP et al., 2007
<i>Azadirachta indica</i>	Folhas frescas	Limonoides	Nimocinol	CL ₅₀ - 83,00ppm	24h	SIDDIQUI et al., 2000
<i>Calodendrum capense</i> Thunb	Casca da raiz e sementes	Limonoides	Calodendrolida	CL ₅₀ - 13,10ppm	24h	KIPROP, RAJAB e WANJALA, 2005
<i>Calodendrum capense</i> Thunb	Casca da raiz	Limonoides	Calodendrolida	CL ₅₀ - 13,20 μ M	24h	KIPROP et al., 2007

Continuação

<i>Calodendrum capense</i> Thunb	Casca da raiz	Limonoides	Piroangolensolide (sintetizada)	CL ₅₀ - 16,60µM	24h	KIPROP et al., 2007
<i>Origem fungica*</i>	*	Limonoides	Desidroaustina	CL ₅₀ - 2,90ppm	24h	GERIS et al., 2008b
<i>Origem fungica *</i>	*	Limonoides	Acetóxi desidroaustina	CL ₅₀ - 7,30ppm	24h	GERIS et al., 2008b
<i>Ficus racemosa</i> Linn.	Folha e cascas	Triterpeno	Acetato guanol	CL ₅₀ - 14,55ppm	24h	RAHUMAN, VENKATESAN e GOPALAKRISHNAN, 2008b
<i>Abutilon indicum</i> (Linn.) Sweet	**	Esteroides	β-Sitosterol	CL ₅₀ - 11,49ppm	24h	ABDUL et al., 2008
<i>Pentaclethra macroloba</i> (Wilcl) Kuntze	Sementes	Saponinas	α-Hederina	CL ₅₀ - 18,60µg/mL	24h	SANTIAGO et al., 2005
<i>Pentaclethra macroloba</i> (Wilcl) Kuntze	Casca dos galhos	Saponinas	Hederacolchisida A1	CL ₅₀ - 25,10µg/mL	24h	SANTIAGO et al., 2005
<i>Pentaclethra macroloba</i> (Wilcl) Kuntze	Casca dos galhos	Saponinas	Ácido oleano-12-en-28-oico,3-[(O-β-D-glucopiranosil-(1→4)-O-[O-β-D-glucopiranosil-(1→3)-α-L-ramnopiranosil]-α-L-arabinopiranosil)óxi]-, (3 β)- (9CI) 7'-epi-sesartemina	CL ₅₀ - 27,90µg/mL	24h	SANTIAGO et al., 2005
<i>Piper fimbriatum</i>	Folhas	Lignana		CL ₁₀₀ - 17,60µg/mL	24h	SOLIS et al., 2005
<i>Phryma leptostachya</i> var. asiatica	Raiz	Lignana	Acetato leptostachiol	CL ₅₀ - 2,10ppm	24h	PARK et al., 2005
<i>Piper nigrum</i> L	Ffrutos secos	Amida	Pipyahyina	CL ₅₀ - 30,00ppm	24h	SIDDIQUI et al., 2004
<i>Piper nigrum</i> L	Ffrutos secos	Amida	Pipnoohina	CL ₅₀ - 35,00ppm	24h	SIDDIQUI et al., 2004
<i>Spilanthes mauritiana</i>	Partes aéreas	Amida	N-isobutil-2E,4E,8E,10Z-dodeca-2,4,8,10-tetraenamida	CL ₁₀₀ - 10,50mg/mL	24h	JONDIKO, 1986
<i>Piper longum</i> L.	Frutos	Amida	Pipernonalina	CL ₅₀ - 0,25mg/L	24h	YANG et al., 2002
<i>Piper nigrum</i>	Frutos	Amida	Retrofractamida	CL ₅₀ - 0,04ppm	48h	PARK et al., 2002
<i>Piper nigrum</i>	Frutos	Amida	Pelitorina	CL ₅₀ - 0,92ppm	48h	PARK et al., 2002
<i>Piper nigrum</i>	Frutos	Amida	Pipercida	CL ₅₀ - 0,10ppm	48h	PARK et al., 2002
<i>Piper nigrum</i>	Frutos	Amida	Guineensina	CL ₅₀ - 0,89 ppm	48h	PARK et al., 2002
<i>Piper nigrum</i>	Frutos	Amida	Piperina	CL ₅₀ - 5,10ppm	48h	PARK et al., 2002
<i>Hortonia floribunda</i> H. angustifolia e H. ovalifolia	Folhas	Lactona	2(5H)-furanona, 3-(11-dodecin-1-il) - 5-metil-, (5S)	CL ₅₀ - 0,41ppm	24 e 48h	RATNAYAKE et al., 2001
<i>Hortonia floribunda</i> , H. angustifolia e H. ovalifolia	Folhas	Lactona	2(5H)-furanona, 3-(11-dodecen-1-il) - 5-metil-, (5S)	CL ₅₀ - 0,47ppm	24 e 48h	RATNAYAKE et al., 2001
<i>Derris trifoliata</i>	Sementes	Cromanona	6,7-dimetóxi-4-cromanona	CL ₅₀ - 14,80µg/mL	24h	YENESEW et al., 2006
<i>Citrullus colocynthis</i> (Linn.) Schrad	Planta inteira	Ácido graxo	Ácido oleico	CL ₅₀ - 8,80ppm	24h	RAHUMAN VENKATESAN e GOPALAKRISHNAN, 2008c
<i>Citrullus colocynthis</i> (Linn.) Schrad	Planta inteira	Ácido graxo	Ácido linoleico	CL ₅₀ - 18,20ppm	24h	RAHUMAN VENKATESAN e GOPALAKRISHNAN, 2008c

Continuação

<i>Rollinia leptopetala</i>	Raiz	Alcaloide	Liriodenine	CL ₅₀ - 3,60ppm	24h	ARRIAGA et al., 2008
<i>Zingiber officinale</i>	Rizoma	Alquilfenois	4-gingerol	CL ₅₀ - 4,25ppm	24h	RAHUMAN et al., 2008a
<i>Zingiber officinale</i>	Rizoma	Alquilfenois	(6)-desidrogingerdiona	CL ₅₀ - 9,80ppm	24h	RAHUMAN et al., 2008a
<i>Zingiber officinale</i>	Rizoma	Alquilfenois	(6)-disidrogingerdionol	CL ₅₀ - 18,20ppm	24h	RAHUMAN et al., 2008a
<i>Cordia alliodora</i>	Casca da raiz	Alquilfenois	2-(2Z)-(3-hidróxi-3,7-dimetilocta-2,6-dienil)-1,4-benzenodiol	CL ₁₀₀ > 50,00ppm	24h	IOSET et al., 2000a
<i>Pothomorphe peltata</i>	Frutos	Alquilfenois	4-nerolidil catecol	CL ₅₀ - 9,10µg/mL	24h	MONGELLI, COUSIO e CICCIA, 2002

* Metabólito 2º isolado do fungo *Penicillium* sp. da raiz de *Melia azedarach*.

** Vários extratos

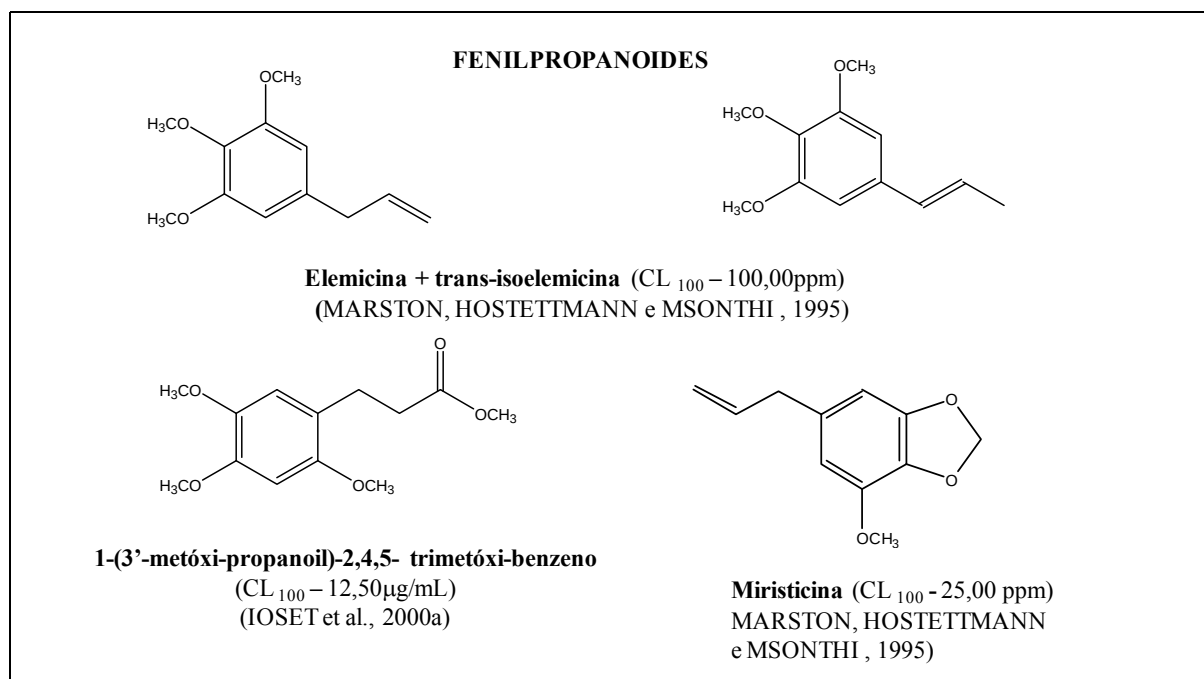


Figura 7 - Fenilpropanoides isolados de plantas com atividade larvicida.

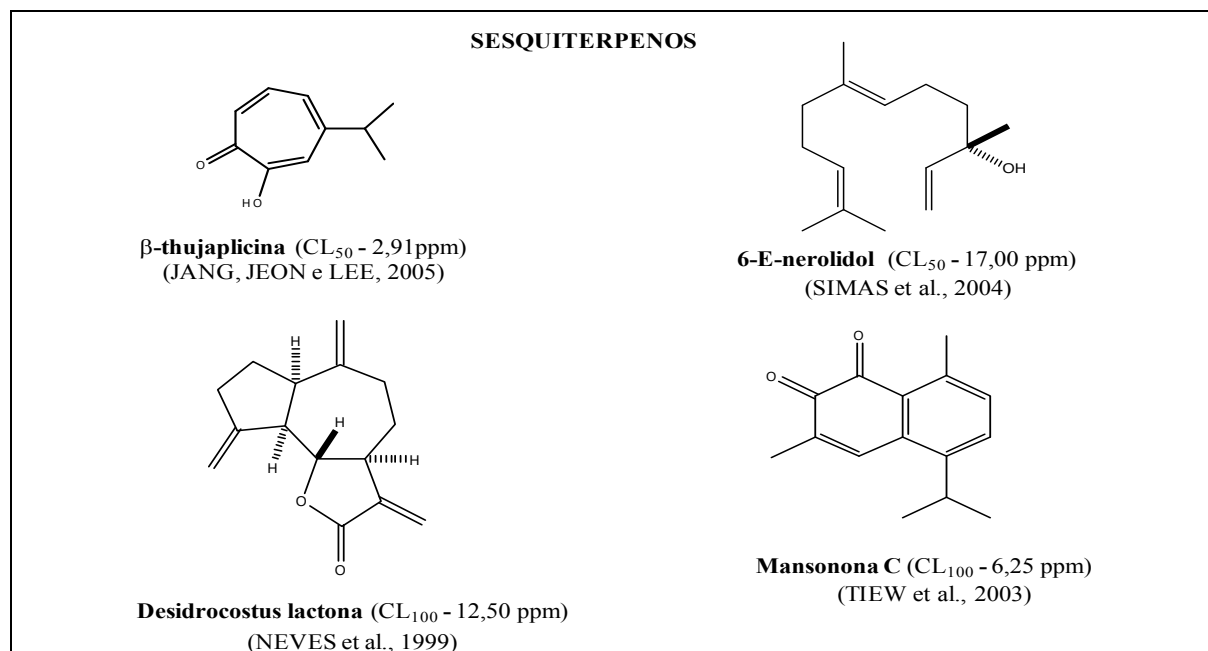


Figura 8 - Sesquiterpenos isolados de plantas com atividade larvicida.

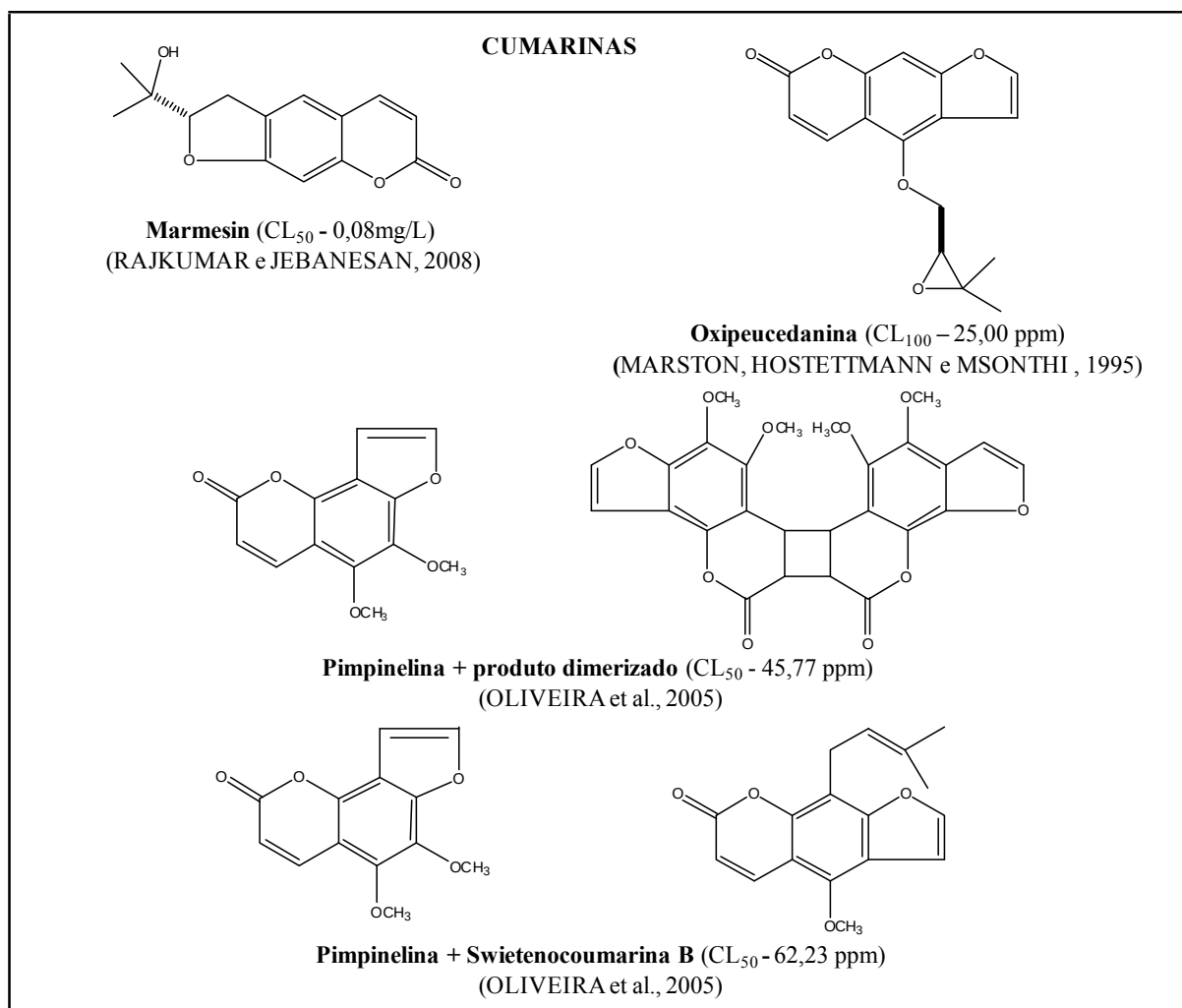


Figura 9 - Cumarinas isoladas de plantas com atividade larvicida e obtidas por transformações químicas.

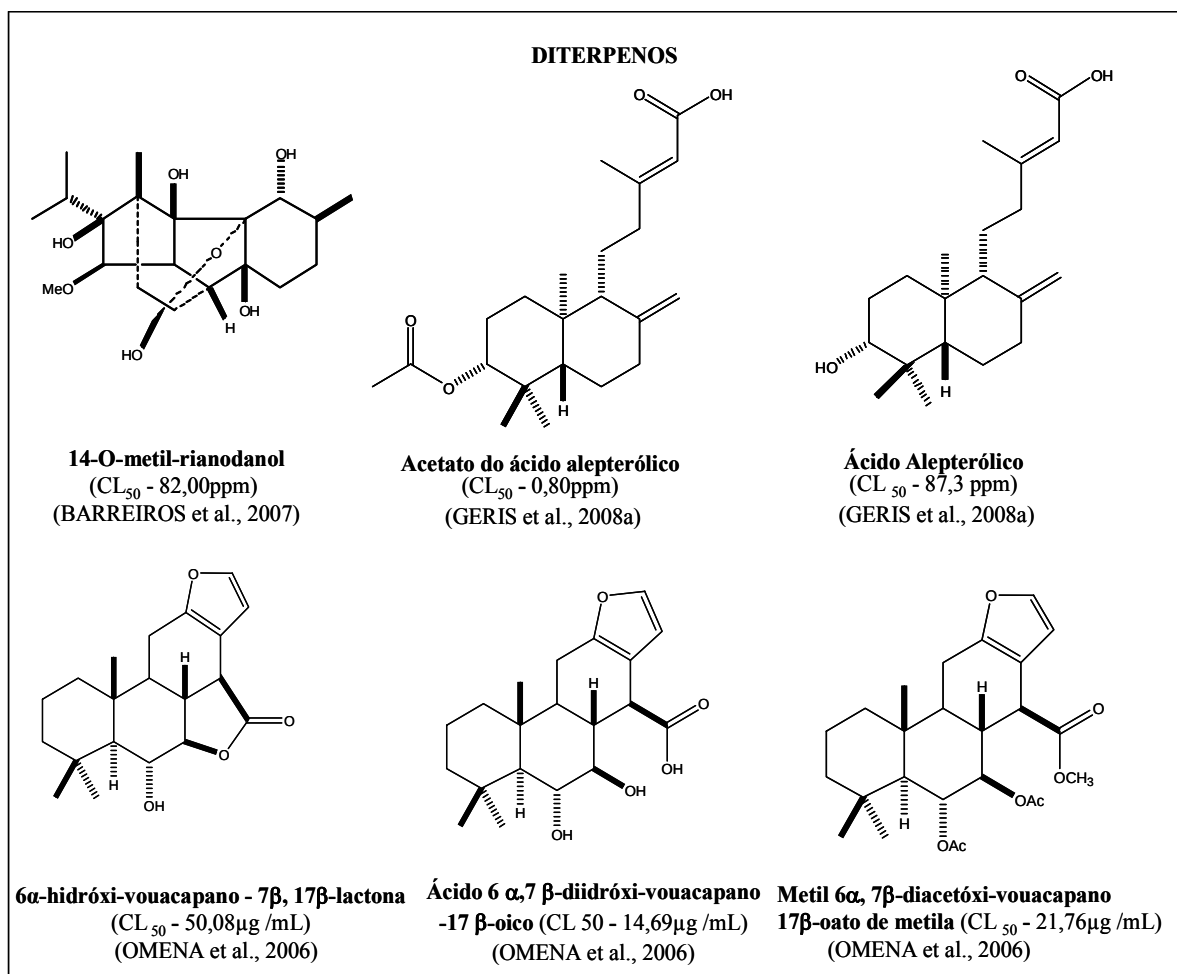


Figura 10 - Diterpenos isolados de plantas com atividade larvicida.

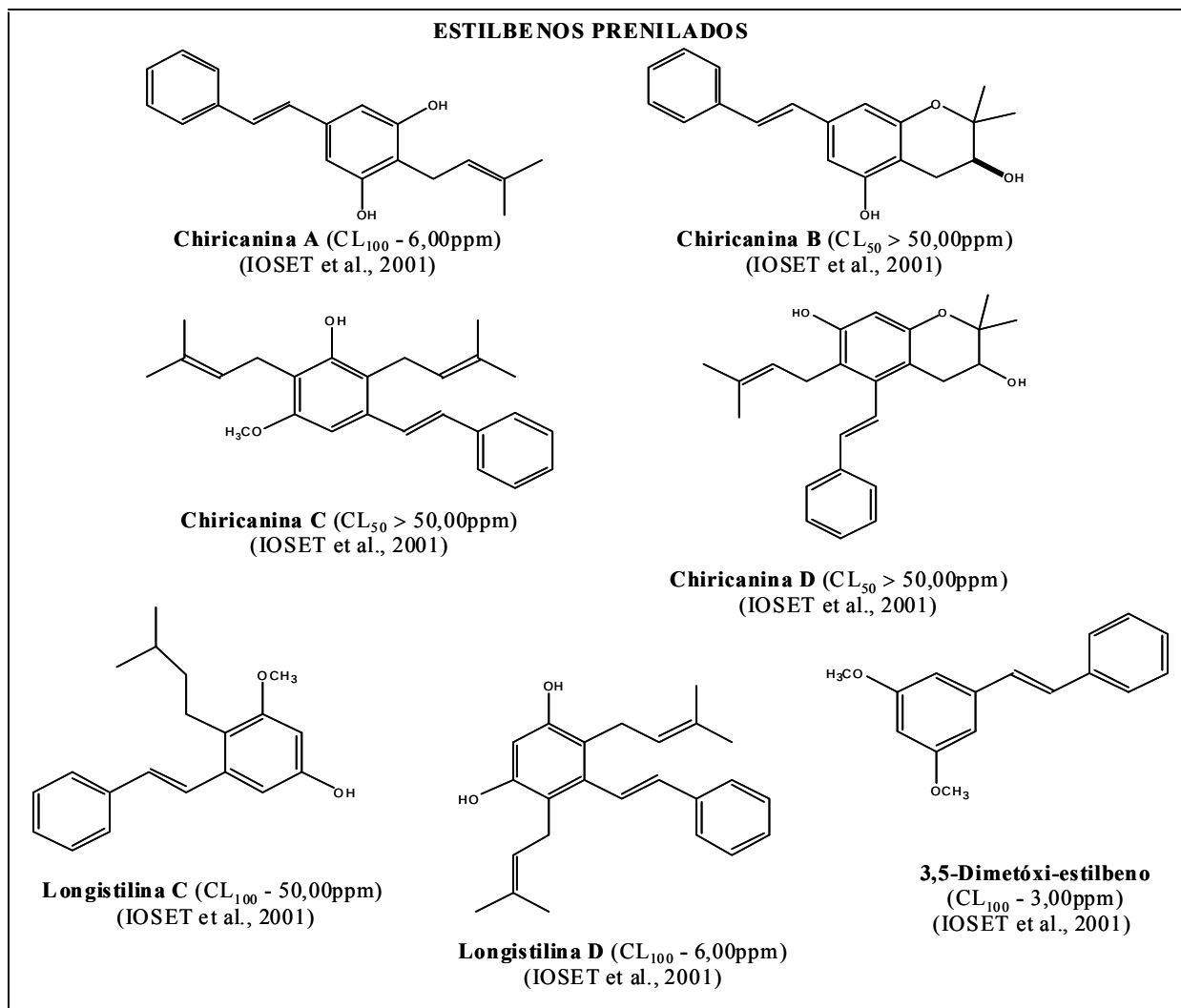


Figura 11 - Estilbenos prenilados isolados de plantas com atividade larvídica.

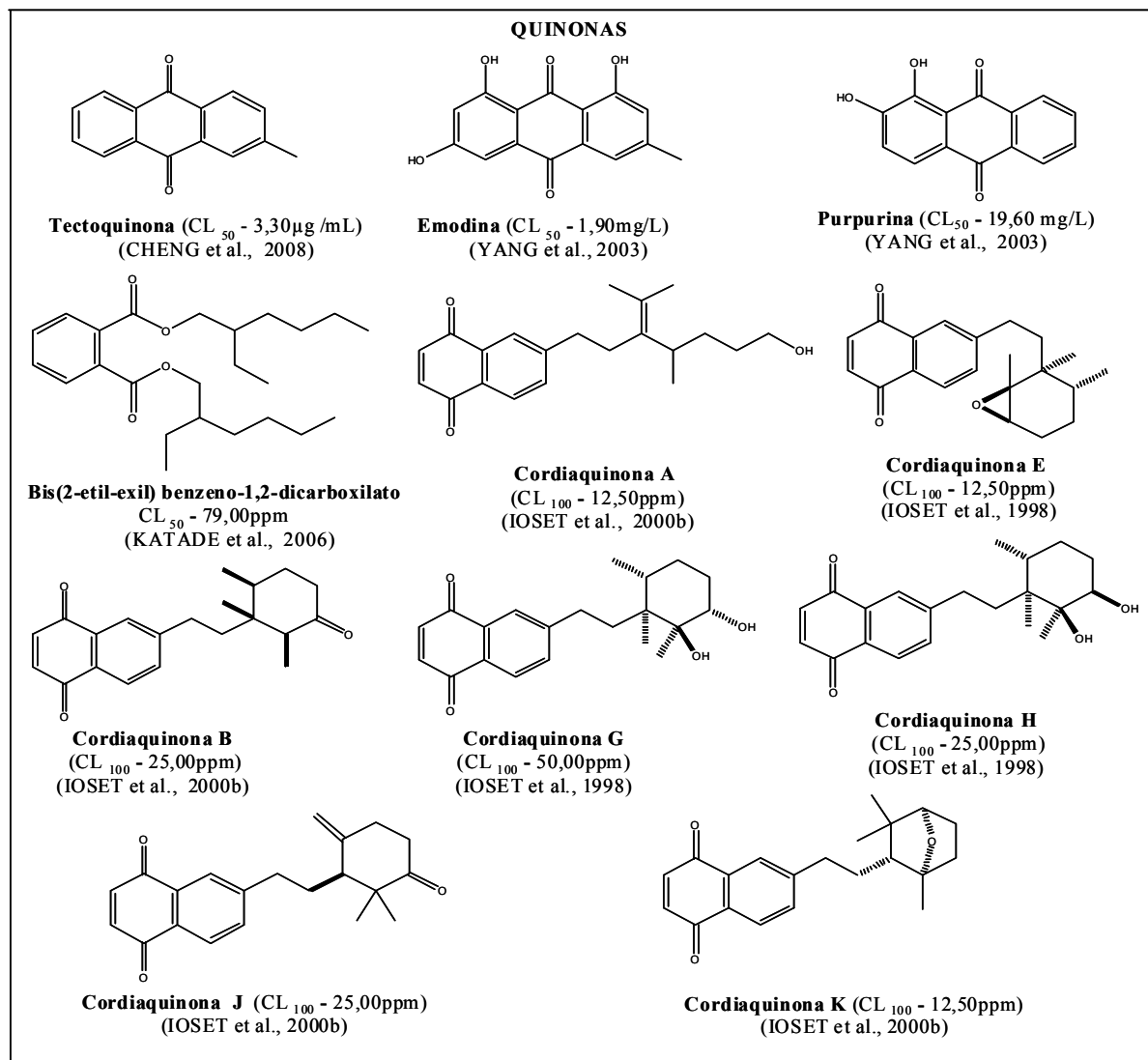


Figura 12 - Quinonas isoladas de plantas com atividade larvica.

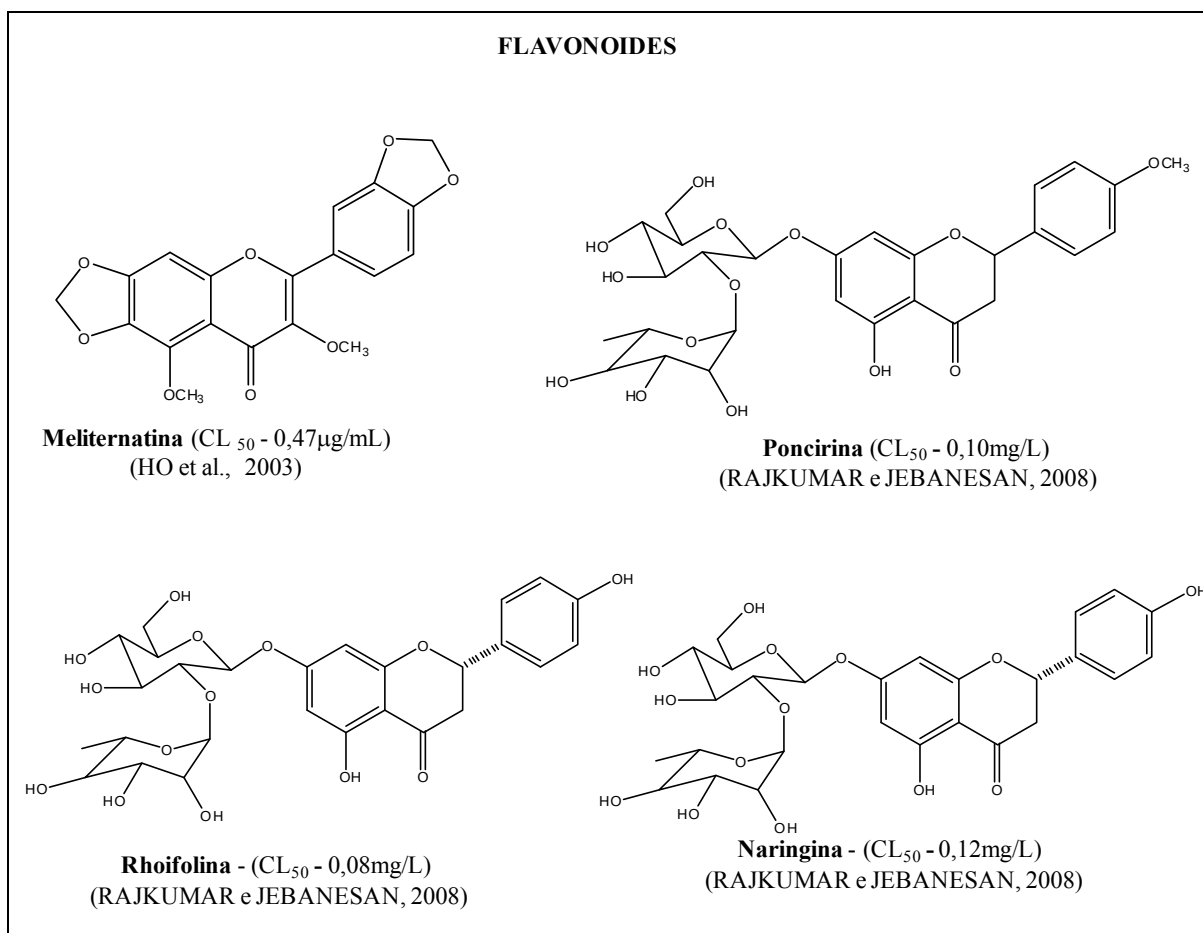


Figura 13 - Flavonoides isolados de plantas com atividade larvica.

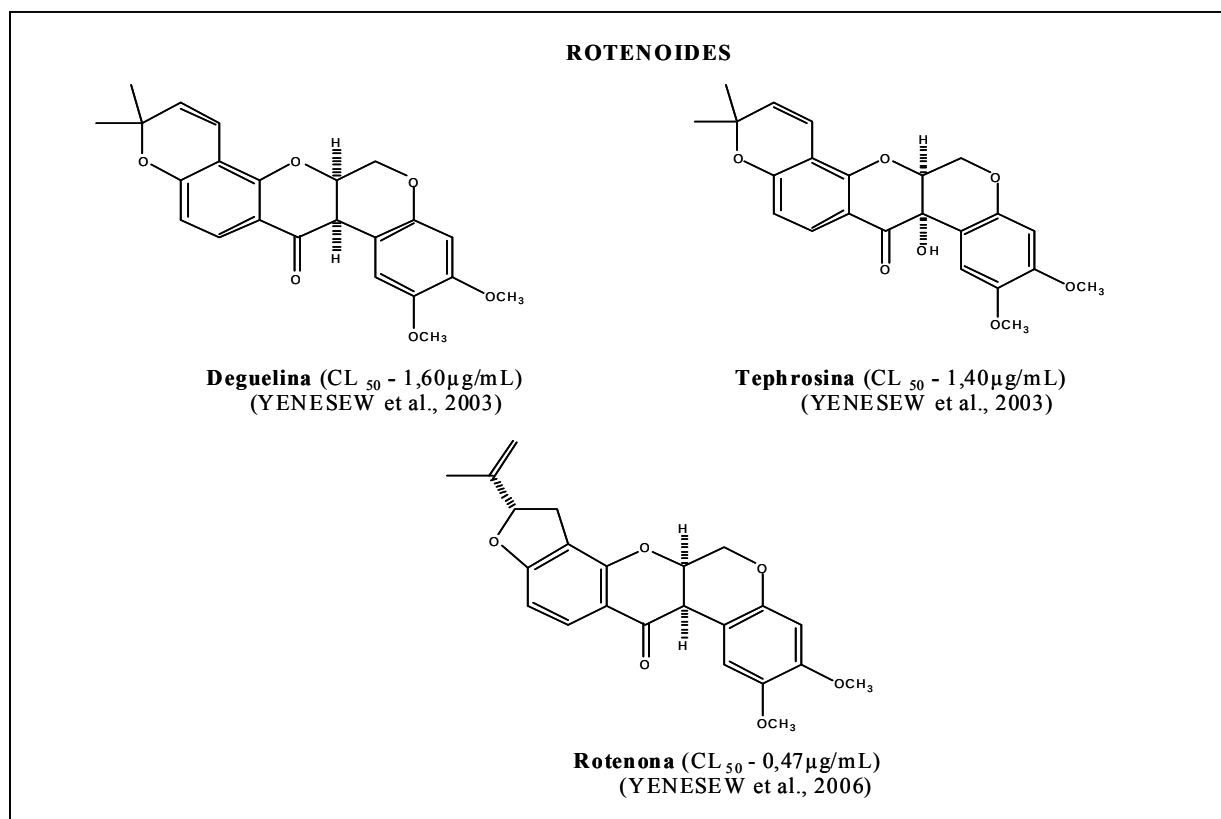


Figura 14 - Rotenoides isolados de plantas com atividade larvicida.

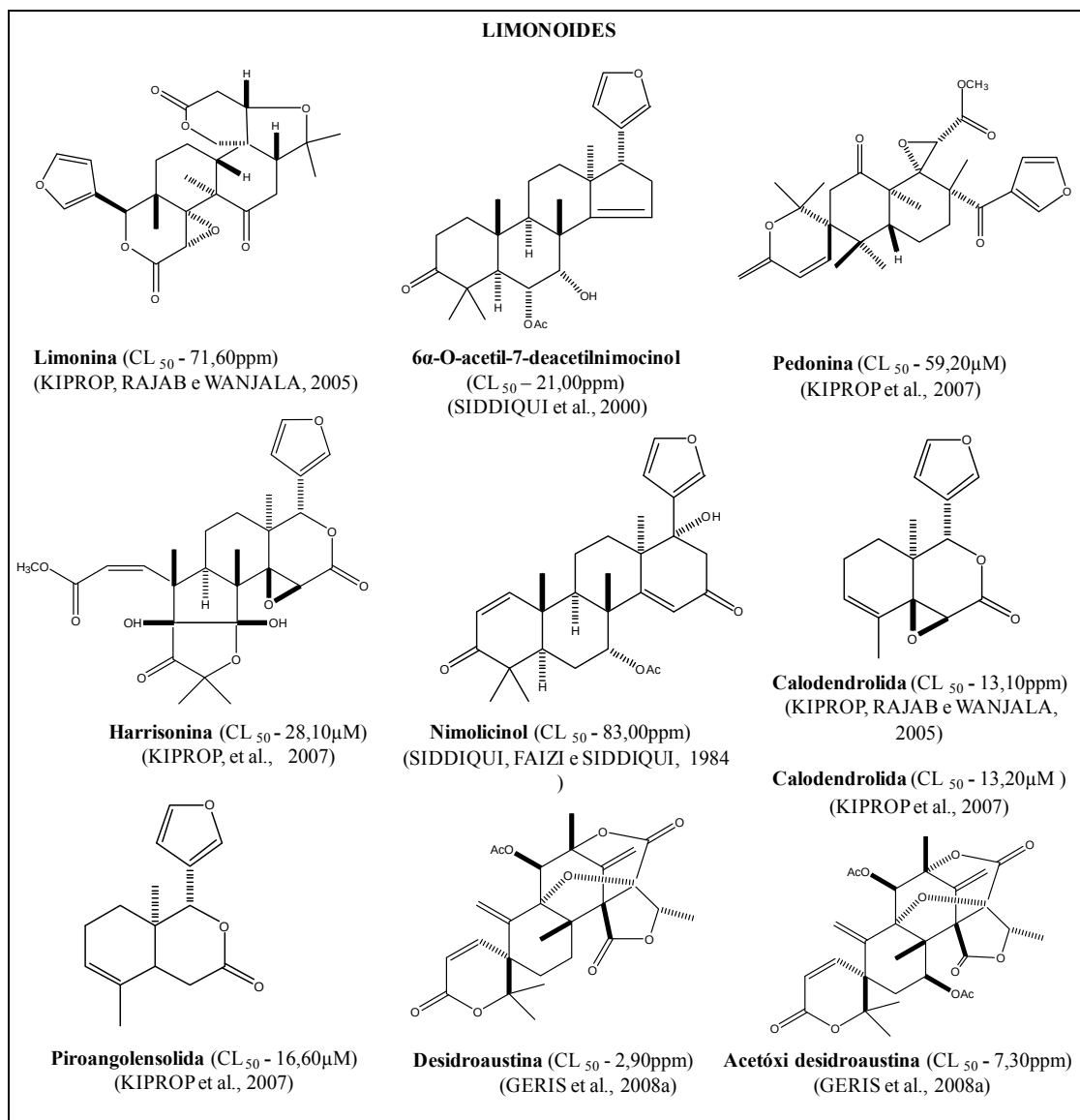


Figura 15 - Limonoides isolados de plantas com atividade larvicida.

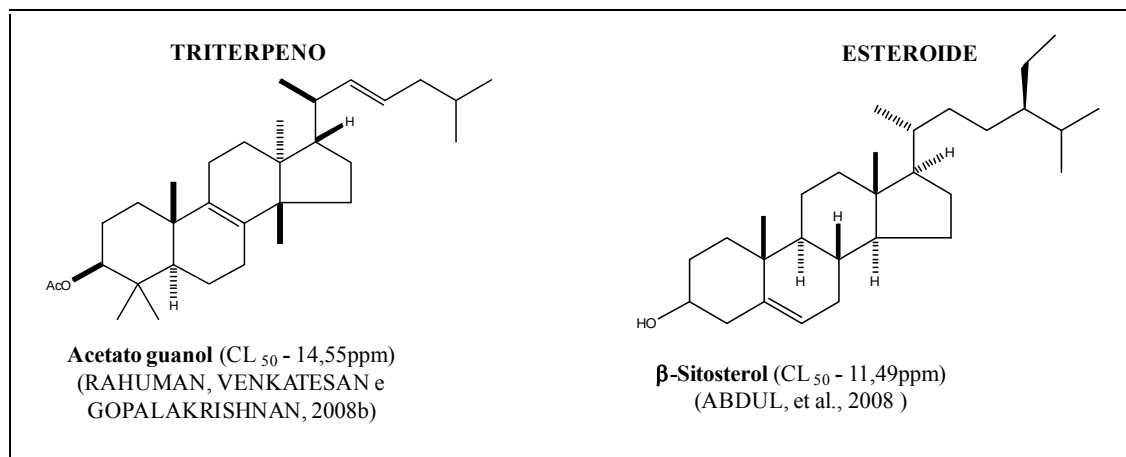


Figura 16 - Triterpeno e Esteróide isolados de plantas com atividade larvicida.

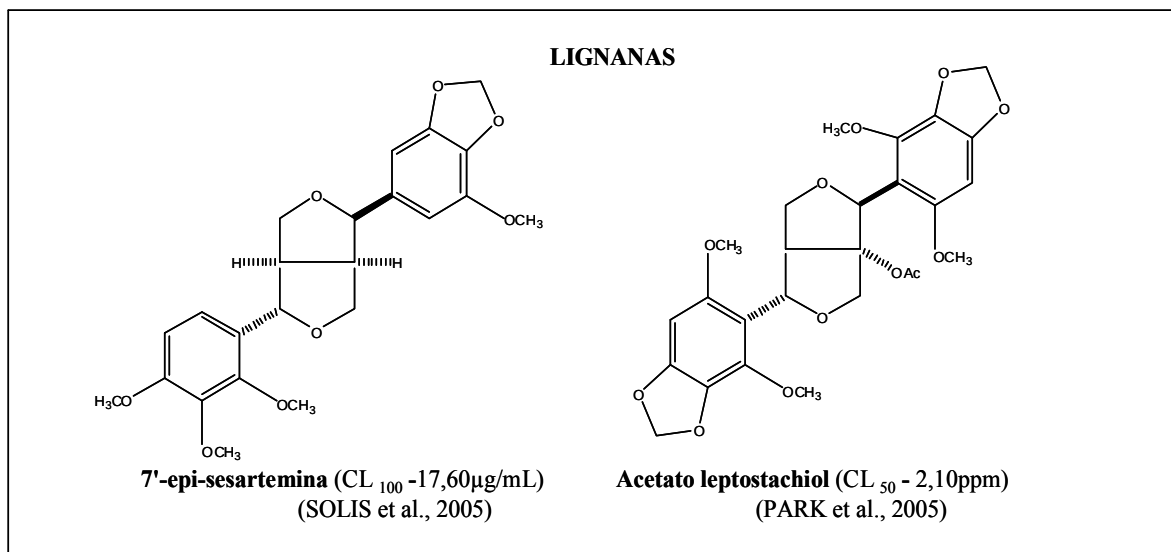


Figura 17 - Lignanais isoladas de plantas com atividade larvica.

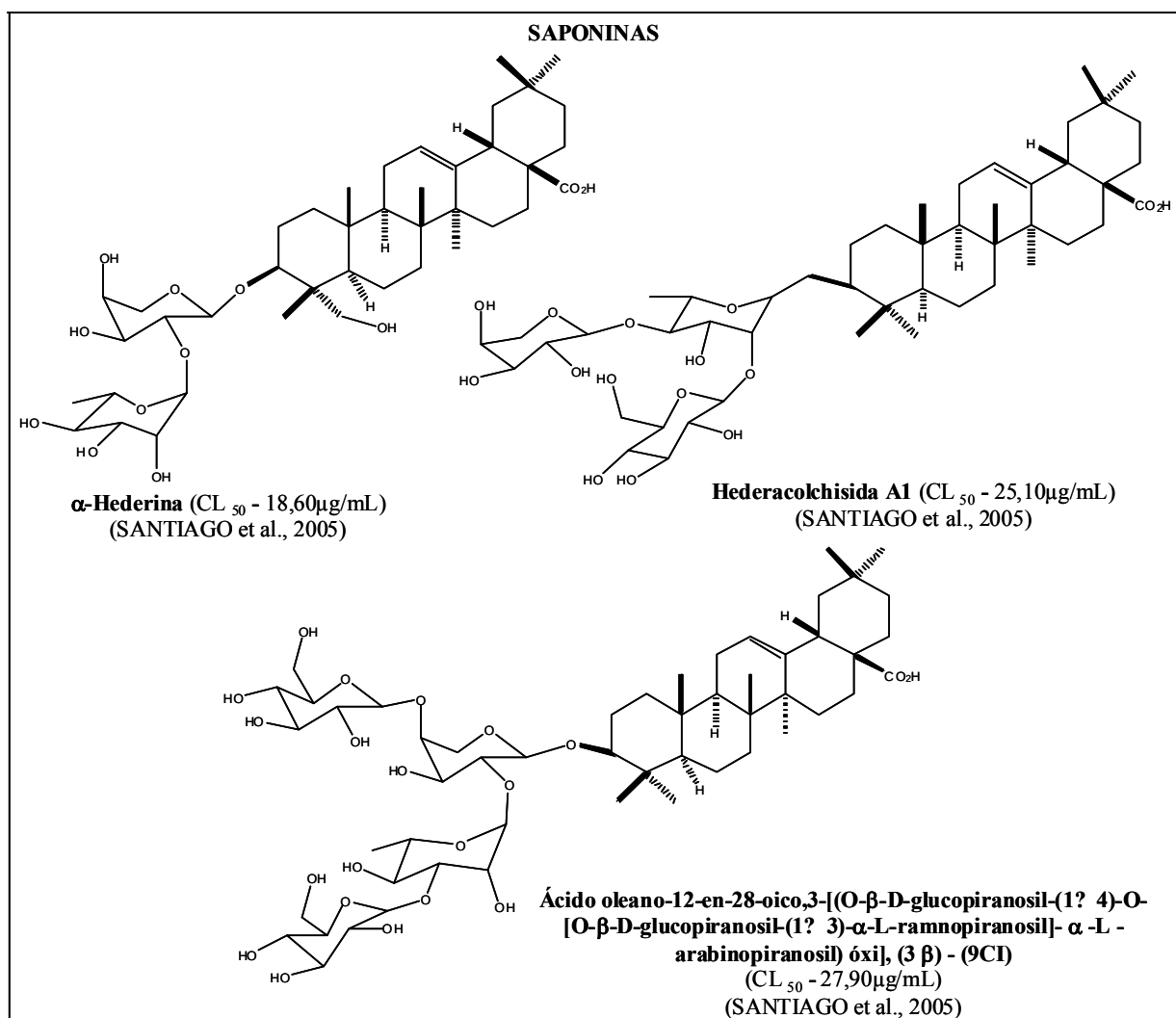


Figura 18 - Saponinas isoladas de plantas com atividade larvica.

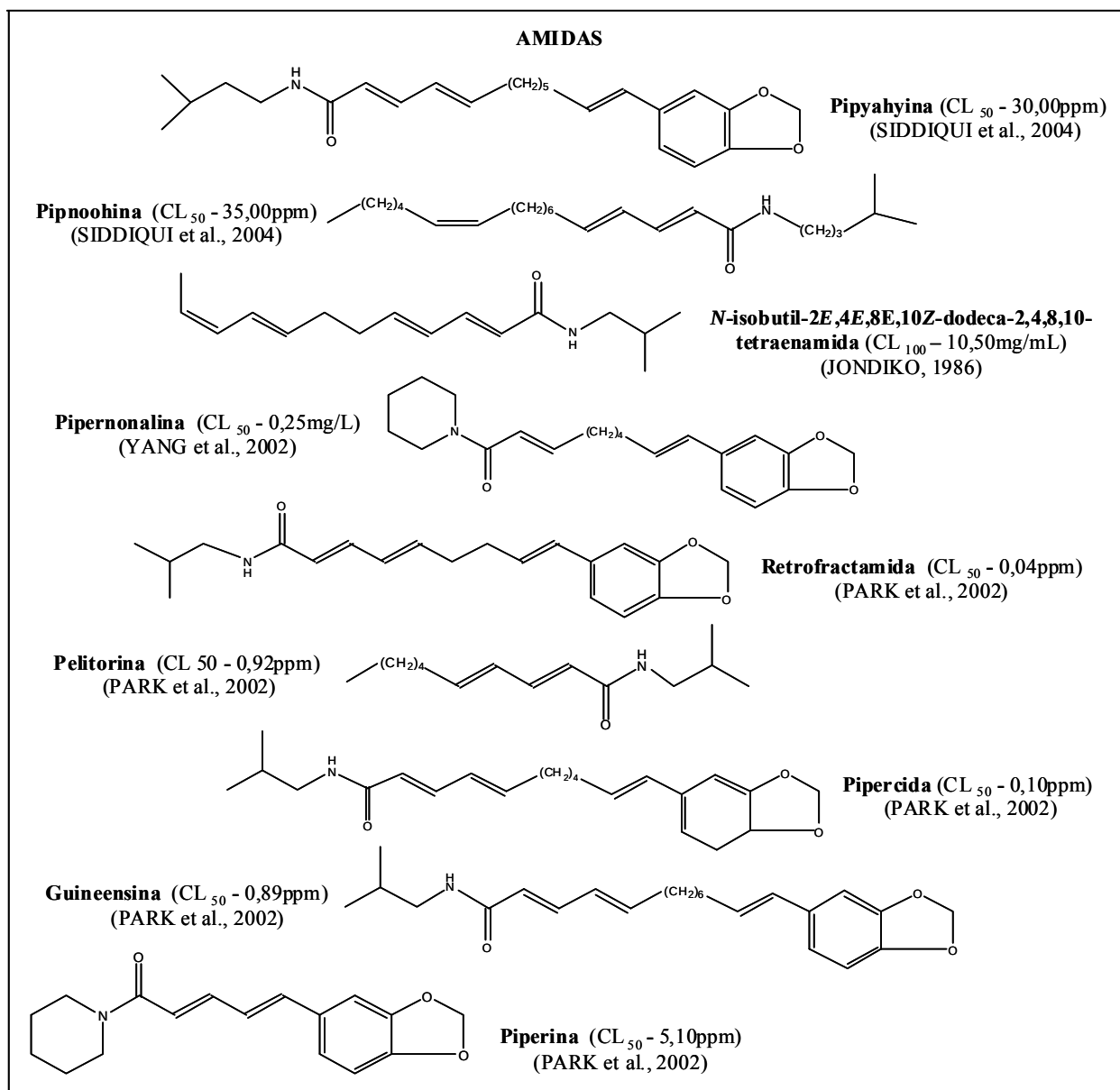


Figura 19 - Amidas isoladas de plantas com atividade larvicida.

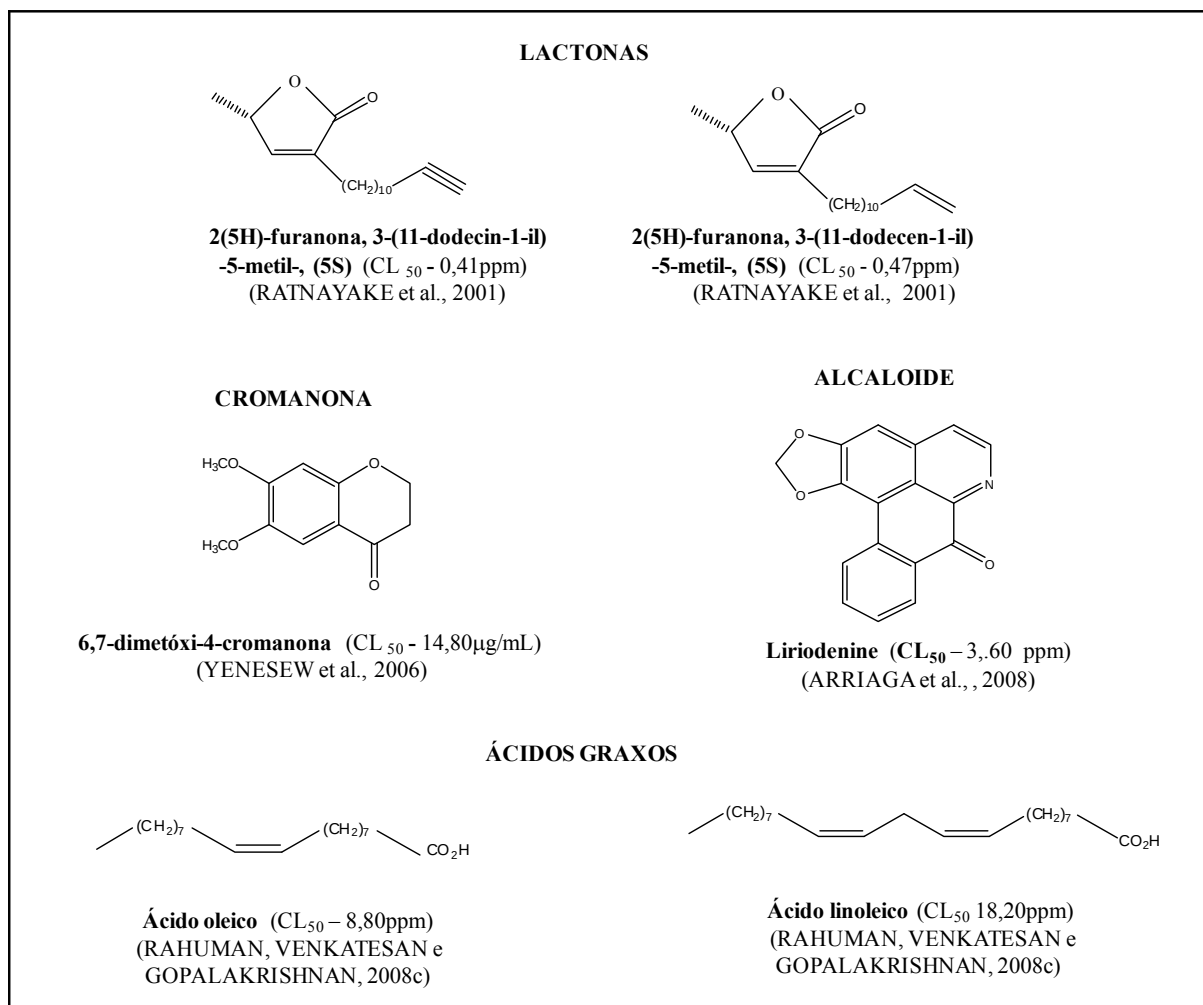


Figura 20 - Lactonas, cromanona, alcaloide e ácidos graxos isolados de plantas com atividade larvicida.

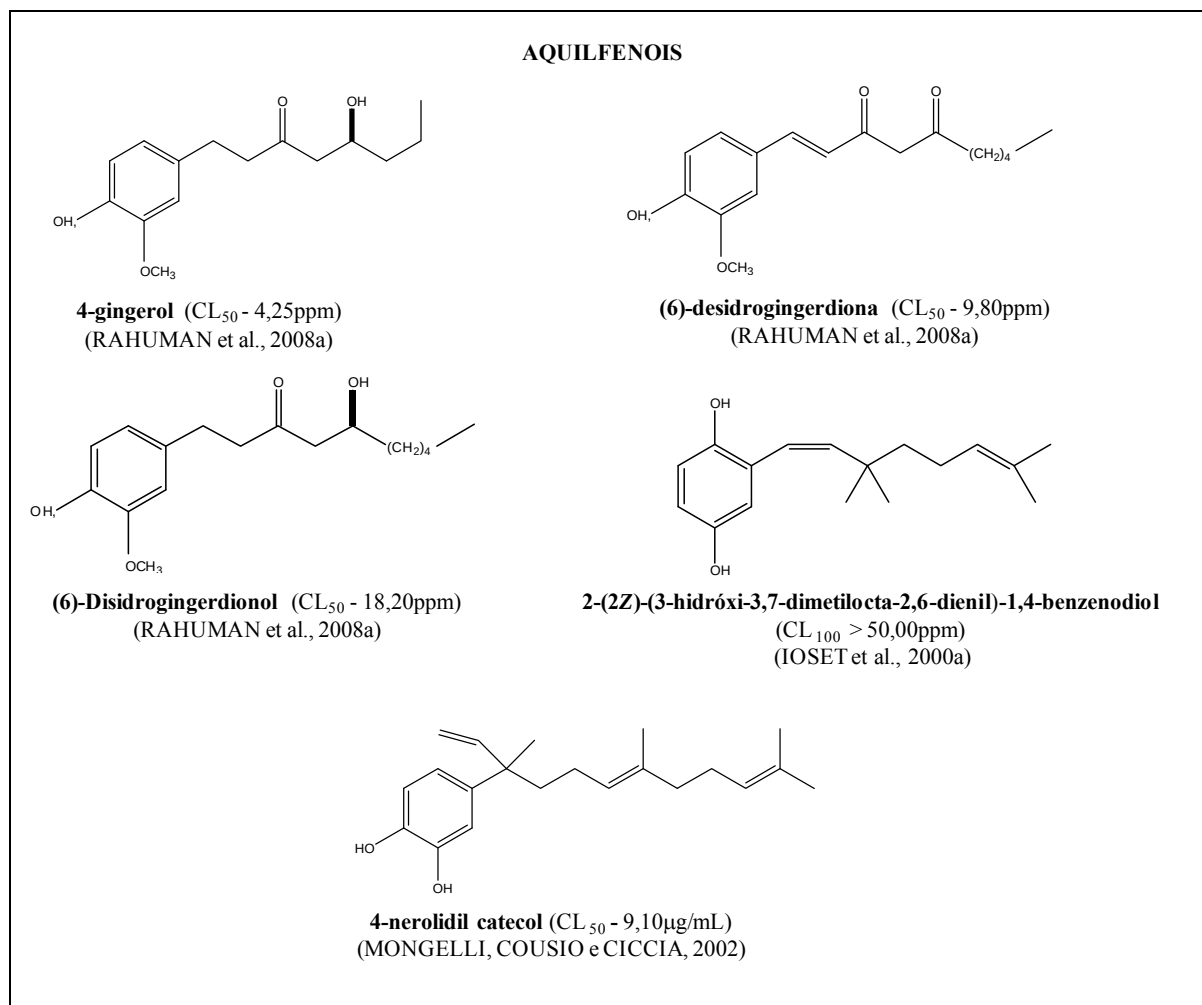


Figura 21 - Alquilfenóis isolados de plantas com atividade larvicida.

2.2 Cerrado e Pantanal

Considerado como o segundo maior bioma brasileiro, o Cerrado está localizado no Brasil Central e ocupa 21% do território nacional sendo denominado como a última fronteira agrícola do planeta (BORLAUG, 2002). A expressão Cerrado é empregada para determinar o conjunto de ecossistemas que o compõe: savanas, matas, campos e matas de galeria (EITEN, 1977; RIBEIRO, SANO e SILVA, 1981). Na sua exuberante flora encontram-se plantas que são consideradas endêmicas na região, constando na lista dos biomas que merecem atenção especial (MYERS et al., 2000).

O Pantanal foi considerado pela Constituição Federal de 1988, como patrimônio nacional e, mais recentemente, designado como patrimônio da humanidade pelas Nações Unidas, abrangendo uma área aproximada de 140 mil km², incluindo a Bacia do Alto Rio

Paraguai (BAP) e seus tributários que drenam o Cerrado do Brasil Central (ADÁMOLI, 1981). Apresenta vegetação heterogênea que é influenciada pelos biomas da Floresta Amazônica, Cerrado (predominante), Chaco e Floresta Atlântica (ADÁMOLI, 1981); e devido a essa diversidade possui riquíssima biota terrestre e aquática (POTT e ADÁMOLI, 1999).

Olson et al. (1998) ao se referirem quanto ao seu valor biológico e ao estado e prioridade de conservação, concluíram que o Pantanal é uma região de “grande significância global, vulnerável e com altíssima prioridade para a conservação em escala regional”.

2.3 Aspectos botânicos da família Lauraceae, gêneros *Ocotea* e *Aiouea*

A família Lauraceae composta por cerca de 2.750 espécies distribuídas em 54 gêneros apresenta prevalência nas regiões tropicais das Américas e da Ásia, apresentando também grande número de espécies na Austrália e Madagascar, porém com número insignificante de espécies na África (WERFF Van Der e RITCHER, 1996; MADRIÑÁN, 2004).

Alguns gêneros de lauráceas brasileiras merecem destaque especial, dentre estes se notabiliza o gênero *Ocotea*. Para este, relata-se a ocorrência de aproximadamente 350 espécies, estando a grande maioria na América Tropical e Subtropical (sul da Flórida e México até Argentina) (ROHWER, 1986; BAITELLO et al., 2003), enquanto no Brasil a estimativa é de 120 a 160 espécies (BAITELLO, 2001).

O gênero *Ocotea* se sobressai pela sua ampla distribuição no território nacional e pela sua utilização no comércio madeireiro. Como exemplo, refere-se às espécies *Ocotea porosa*, a popular imbuia, e *Ocotea odorifera*, o popular sassafrás (LORENZI, 2002).

Os relatos do uso etnomedicinal das espécies deste gênero tem estimulado o interesse dos fitoquímicos, visando o isolamento e a caracterização de compostos químicos. No que concerne ao seu uso popular destacam-se alguns exemplos como: folhas de *O. aciphylla* (Nees) Mez são utilizadas como tônico e estomáquico e sua casca como anti-reumática e depurativa; casca e as folhas de *O. pulchella* Mart. foram relatadas como sendo estomáquicas, emenagogas e tônicas do útero; outro exemplo de uso popular de plantas deste gênero é a utilização da casca de *O. indecora* Schott como sudorífica e anti-reumática (MARQUES, 2001).

Muitas outras espécies do gênero encontram-se na relação da flora brasileira ameaçadas de extinção, visto que as ocoteas não possuem constância na frutificação, o que

dificulta sua propagação, além do desmatamento que abrange grande parte dos biomas onde essas estão localizadas (CARVALHO, 2003).

Estudos feitos com gênero *Ocotea* descrevem diversas atividades biológicas de alcaloides da classe dos aporfínicos, como a nantenina (bloqueador de contração muscular, translocação de Ca^{2+}) (RIBEIRO et al., 2003), derivados da nantenina (antagonista $\alpha 1$ -adrenoreceptor) (INDRA et al., 2002), glaucina (citotóxica) (HOET et al., 2004), derivados halogenados da predicentrina (aumento da afinidade aos receptores dopaminérgicos D1) (ASENCIO et al., 2005), dicentrina (antifúngica e anti-tripanosomal) (MORTEZA et al., 2003; HOET et al., 2004), S-dicentrina (inibição da topoisomerase II e agregação plaquetária (WOO et al. 1999; CHEN et al., 1997), R-dicentrina (atividade antineoplásica) (HUANG et al., 1998), dicentrinona (inibição da topoisomerase I) (ZHOU et al., 2000).

Para o gênero *Aiouea* relata-se a ocorrência de mais de trinta espécies conhecidas quanto ao aspecto botânico, incluindo ecossistemas, anatomia e nomes populares (BASE DE DADOS CNIP, 2009). O uso etnomedicinal do gênero refere-se às folhas de *A. brasiliensis*, utilizadas para tratamento de úlceras. Já *A. guyanensis* conhecida como ajuba é utilizada na carpintaria (CORREIA, 1926).

Na literatura há apenas um relato de estudo químico realizado com *Aiouea trinervis* (raízes, caule subterrâneo e folhas), com o isolamento de quatro metabólitos secundários pertencentes à classe dos butanolídeos [(γ lactonas (-)-epilitsenolídeos C1, γ lactonas (-)-epilitsenolídeos C2, obtusilactona A, isoobtusilactona A)], duas lignanas [(+)-sesamina C, (+)-metil piperitol] e um poliprenol [poliprenol-12] (MARTINS, 2004).

Estudos anteriores com lauráceas demonstraram que a isoobtusilactona A apresenta atividade citotóxica em linhagens de células MCF-7 e MDA-MB-231 (câncer de mama em humanos) Hep G2 (hepatoma humano) e P-388 (leucemia em ratos), bem como efeitos genotóxicos em linhagens de células CHO-K1 (ovário de hamster) e HTC (hepatoma em ratos) (TSAI et al., 2002; GARCEZ et al. 2005; KUO, CHEN e HSU 2007; CHEN et al., 2007). Para obtusilactona A não foi encontrado relato na literatura referente a atividades biológicas.

2.4 Espécie *Ocotea velloziana*

A espécie *Ocotea velloziana* (Meisn.) Mez. (Figura 22) tem como nome popular canela-preta. É uma espécie arbórea nativa, sendo descrita no Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste. Apresenta sua florescência com predominância nos meses de abril a agosto e

frutificação de maio a outubro. A madeira é geralmente destinada à fabricação de móveis e construção de casas (MORAES, 2005).

O estudo fitoquímico dos frutos da espécie *Ocotea velloziana* foi realizado (GARCEZ, 1991; GARCEZ, YOSHIDA e GOTTLIEB, 1995) sendo isoladas substâncias de várias classes: alcaloides aporfinicos e benzilquinolínicos, flavonol-glicosídeos, flavonol-glicosídeos acilados, fenolglicosídeo e diglicosídeo acilado, porém não foram realizados ensaios biológicos com as mesmas.



Figura 22 - *Ocotea velloziana* – ampliação fruto e folhas. Fonte: <http://www.arbolesornamentales.com>. Acesso em: 03/05/07

2.5 Espécie *Aiouea trinervis*

O gênero *Aiouea* encontra-se em sua maior parte na América do Sul, sendo encontrado no Brasil 15 a 16 espécies sendo a espécie *Aiouea trinervis* é limitada à região neotropical (KUBITZKI e RENNER 1982; BAITELLO et al., 2003).

Aiouea trinervis Meisn. (Figura 23) tem como nomes populares: brinco-de-princesa, louro-de-goíás, uridol, urinosa, vergateza. É espécie arbustiva encontrada no Planalto Central brasileiro. Seu florescimento ocorre entre os meses de maio e junho e sua frutificação no período de agosto e setembro (BASE DE DADOS TROPICAL, 2009).

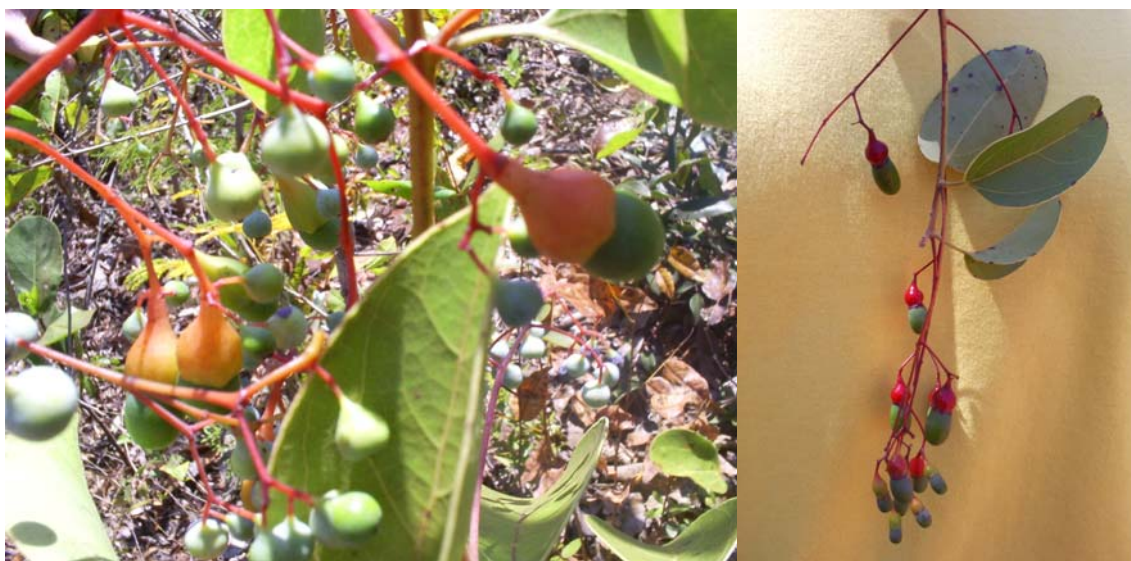


Figura 23 - *Aiouea trinervis* - ampliação dos frutos. Foto – Lilliam May – 02/12/07

2.6 Considerações gerais sobre ensaios biológicos

2.6.1 Atividade de toxicidade sobre *Artemia salina*

O trabalho de investigação fitoquímica quando associado ao monitoramento com bioensaios, confere àquele uma dimensão complementar. Sendo assim, muitos laboratórios de produtos naturais têm inserido em suas rotinas os ensaios biológicos, com a finalidade de monitorar a pesquisa com extratos de plantas à procura de substâncias bioativas. Neste item, dentre os ensaios realizados, encontra-se o de toxicidade sobre *Artemia salina* (TAS) considerado um ensaio preliminar por apresentar correlações com atividades antitumoral, inseticida e outras (MICHAEL, THOMPSON e ABRAMOVITZ, 1956; McLAUGHLIN e GROWN-GALL, 1991) e caracteriza-se por ser de baixo custo e de considerável sensibilidade.

2.6.2 Atividade larvicida

Devido à existência de populações resistentes do *Ae. aegypti* aos inseticidas convencionais empregados na atualidade e aos insucessos no controle desses vetores, a busca por alternativas efetivas e baixa toxicidade para o meio ambiente no combate ao mosquito adulto e/ou à larva, inclui a investigação de extratos vegetais e substâncias naturais com atividade larvicida (HEMINGWAY e RANSON, 2000).

3 OBJETIVOS

3.1 Gerais

- Preparar extratos de plantas nativas coletadas em MS e avaliar suas atividades biológicas.

3.2 Específicos

- Avaliar os extratos de plantas de Mato Grosso do Sul a ensaios de atividade larvicida (larvas de *Ae. Aegypti*) e toxicidade sobre *Artemia salina*;
- Selecionar duas espécies vegetais que apresentarem resultados significativos no ensaio realizado com atividade larvicida e submetê-las a um estudo químico biomonitorado;
- Isolar e identificar os constituintes bioativos das espécies vegetais selecionadas;
- Realizar bioensaio com larvas (cepa Rockefeller) das substâncias isoladas.

4 EXPERIMENTAL

4.1 Material e métodos

4.1.1 Solventes

Os solventes utilizados foram destilados no Laboratório LP-1 do Departamento de Química da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, a partir de solventes de grau PA adquiridos da Merck, VETEC, QM, Synth. Os solventes de grau HPLC e deuterado foram adquiridos da Tedia e Merck, respectivamente.

4.1.2 Cromatografia clássica em coluna e em camada delgada (CCD)

As separações cromatográficas foram realizadas utilizando-se como suportes, sílica gel (70-230 e 230-400 mesh, Merck) e sílica gel 60 RP-18 (40-63 μ m, Merck), Sephadex LH-20 (100 μ m, Sigma).

As análises comparativas foram realizadas através de cromatografia em camada delgada (CCD) utilizando-se placas cromatográfica sílica G TLC-UV 254 (200 μ m, Sorbent Technologies).

4.1.3 Cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE

As análises qualitativas foram realizadas em aparelho Shimadzu, com bomba ternária Shimadzu LC-6AD e detector UV/VIS (254 nm) Shimadzu SPDV-6AV, coluna de fase reversa C-18 (base sílica derivatizada com octadecilsilano - 4,6 mm/ 25 cm; Luna C-18 (2) 5 μ - Phenomenex) fluxo 0,5 mL/min com eluente ACN/H₂O 90:10.

Para as separações preparativas utilizou-se aparelho marca Shimadzu, com bomba ternária Shimadzu LC-6AD e detector UV/VIS (254 nm) Shimadzu SPDV-6AV, coluna semi-preparativa fase reversa C-18 (base sílica derivatizada com octadecilsilano - 21,2 mm/ 25 cm; Luna C-18 100° 5 μ - Phenomenex) fluxo 10 mL/min, com eluente ACN/H₂O 90:10.

4.1.4 Reagentes reveladores

As placas cromatográficas foram visualizadas por irradiação de luz ultravioleta (Monitor UV de mão, modelo UVGL – 25, UVP com lâmpada Black Ray de 254 e 365 nm), após borrifação com solução ácida de Sulfato Cérico (solução a 2% de sulfato de cério em H₂SO₄ 2N) ou vanilina (1% em EtOH) /ácido sulfúrico (5% em EtOH). As placas

cromatográficas foram aquecidas em placas de aquecimento (Fisaton) a 100°C até o aparecimento das manchas.

4.1.5 Espectros de RMN

Os espectros de RMN unidimensionais ^1H , ^{13}C e DEPT 135° e bidimensionais HSQC e HMBC foram registrados no espectrômetro Bruker, modelo DPX-300, operando a 300 MHz para hidrogênio e a 75 MHz para carbono-13. As amostras foram solubilizadas em solvente deuterado DMSO- d_6 e/ou CDCl_3 . Como referência interna foram utilizados os sinais relativos ao hidrogênio residual do solvente para o RMN ^1H e do solvente e/ou ao tetrametilsilano (TMS) para o RMN de ^{13}C .

4.1.6 Espectros no Infravermelho

Os espectros na região do infravermelho (IV) foram registrados em espectrofotômetro Bomem-Hartmann & Braum, modelo Michelson MB Series, FT-IR, utilizando pastilhas de KBr ou filme, utilizando janela de NaCl. A frequência de absorção foi medida em unidade de número de onda (cm^{-1}).

4.1.7 Determinação da rotação óptica específica

As medidas de rotação óptica específica, $[\alpha]_D^{20}$, foram feitas em polarímetro digital Perkin-Elmer 341 EM, filtro de sódio (589) e cela 1 dm.

4.1.8 Espectros de Massas

Os espectros de massas foram obtidos na Universidade Federal do Rio de Janeiro, por experimento de impacto eletrônico.

4.1.9 Material biológico

Os ovos de *Ae. aegypti* da linhagem Rockefeller foram fornecidos pelo IBEX/Entomologia/LAFICAVE/IOC/FIOCRUZ - Rio de Janeiro-RJ; essa cepa foi estabelecida no Rockefeller Institute (Nova York, NY) por DW Jenkins em 1959 sendo utilizada como padrão de susceptibilidade a inseticida para a espécie *Aedes aegypti* (HARTBERG e CRAIG-Jr, 1970).

4.1.10 Ensaios biológicos

Para a incubação dos ovos e *Ae. aegypti* e para o bioensaio com larvas foi utilizado estufa BOD marca TECNAL com temperatura ($T = 27 \pm 2^\circ\text{C}$), umidade relativa ($UR = 70 \pm 5\%$). A dieta das larvas consistiu de ração de peixe (aldon basic, MEP 200 complex) do, período de eclosão até o 3º estágio larval.

Solução aquosa de DMSO 0,5% foi utilizada como controle negativo.

Temephos pestanal (Fluka) – 31526 foi utilizado como controle positivo.

No ensaio de toxicidade sobre *Artemia salina* foi utilizado: sal marinho (38g/L), ovos de *Artemia salina* (Maramar-alta eclosão), sulfato de quinidina, DMSO (0,5%).

4.2 Coleta e identificação do material botânico

O material botânico foi coletado em Mato Grosso do Sul, nas regiões de Cerrado e no Pantanal. As coletas foram efetuadas com a colaboração dos botânicos da UFMS Ubirazilda Rezende, Arnildo Pott e Valli J. Pott, os quais foram responsáveis pela identificação das plantas. As exsiccatas encontram-se depositadas no Herbário CG/MS/UFMS, Campo Grande – MS, sendo que as espécies *Ocotea velloziana* e *Aiouea trinervis* correspondem às exsiccatas nº 15427 e nº 8810, respectivamente.

A coleta do material vegetal foi conduzida visando exemplares mais abundantes na região de coleta, privilegiando aqueles pertencentes às famílias que são ricas em metabólitos secundários ou fornecedores de substâncias bioativas e/ou pertencentes a famílias, gêneros, espécies pouco ou não investigadas quanto à sua composição química (Tabela 2).

As espécies de plantas selecionadas para estudo tiveram como critério de seleção o teste biológico de atividade de toxicidade sobre *Artemia salina*. Foram selecionados para o teste 50 extratos etanólicos de diferentes órgãos de 35 espécies.

4.2.1 Preparo dos extratos

As partes selecionadas de cada planta foram separadas, secas ao ar livre e trituradas a pó em moinho de laboratório. O material depois de pulverizado (3,4Kg da casca do caule de *Ocotea velloziana*; 609,57g dos frutos maduros de *Aiouea trinervis* e 500g das demais espécies) foi submetido à extração com etanol P.A. (2L de álcool/ 500g de material vegetal) à temperatura ambiente por três dias e filtrado. O resíduo foi extraído mais duas vezes da mesma maneira e após foi descartado.

O filtrado foi concentrado por destilação à pressão reduzida em evaporador rotatório à temperatura de 40°C, obtendo-se os respectivos extratos brutos (Tabela 2). Esses extratos foram mantidos em “freezer” a - 20°C até a realização dos bioensaios.

Tabela 2 - Material vegetal de plantas de Mato Grosso do Sul (folhas, cascas, galhos, frutos, ramos ou flores), selecionadas para avaliação em ensaios biológicos.

Código	Espécies	Família	Parte estudada
WG 64	<i>Tapirira guianensis</i> Aubl.	Anacardiaceae	Folhas
WG 61	<i>Dendropanax cuneatus</i> (DC.) Decne. & Planch.	Araliaceae	Caule
WG 61	<i>Dendropanax cuneatus</i> (DC.) Decne. & Planch	Araliaceae	Folhas
WG151	<i>Tabebuia avellanedae</i> Lorentz ex Griseb.	Bignoniaceae	Cascas do caule
WG150	<i>Tabebuia avellanedae</i> Lorentz ex Griseb.	Bignoniaceae	Cascas do caule
WG 84	<i>Arrabidaea brachypoda</i> (DC.) Bur.	Bignoniaceae	Folhas
WG 49	<i>Protium spruceanum</i> (Benth.) Engl.	Burseraceae	Folhas
WG 59	<i>Buchenavia tomentosa</i> Eichler	Combretaceae	Fruto
WG 178	<i>Terminalia fagifolia</i> Mart. & Zucc.	Combretaceae	Caule
WG 56	<i>Erythroxylum</i> sp.	Erythroxylaceae	Folhas
WG 167	<i>Sebastiania hispida</i> (Mart.) Pax	Euphorbiaceae	Folhas
WG 88	<i>Copaifera langsdorffii</i> Desf.	Fabaceae	Folhas
WG 88	<i>Copaifera langsdorffii</i> Desf.	Fabaceae	Parte aérea
WG 25	<i>Diptychandra aurantiaca</i> Tul.	Fabaceae	Caule
WG 170	<i>Inga uruguensis</i> Hook. & Arn.	Fabaceae	Folhas
WG 85	<i>Andira cubensis</i> Benth.	Fabaceae	Folhas
WG 18	<i>Indigofera hirsuta</i> Linnaeus	Fabaceae	Frutos
WG 62	<i>Lacistema hasslerianum</i> Chodat.	Lacistemataceae	Ramos
WG 42	<i>Aiouea trinervis</i> Meisn.	Lauraceae	Caule
WG 42	<i>Aiouea trinervis</i> Meisn.	Lauraceae	Folhas
WG 42	<i>Aiouea trinervis</i> Meisn.	Lauraceae	Frutos
11467	<i>Ocotea minarum</i> (Nees & C. Mart.) Mez	Lauraceae	Folhas
11467	<i>Ocotea minarum</i> (Nees & C. Mart.) Mez	Lauraceae	Frutos
11467	<i>Ocotea minarum</i> (Nees & C. Mart.) Mez	Lauraceae	Casca do caule
15427	<i>Ocotea velloziana</i> (Meisn.)Mez	Lauraceae	Casca do caule
WG 172	<i>Ocotea suaveolens</i> (Meissn.)Hassler	Lauraceae	Galho
WG 172	<i>Ocotea suaveolens</i> (Meissn.)Hassler	Lauraceae	Folha
WG 21	<i>Lafoensia densiflora</i> Pohl.	Lythraceae	Casca do caule
WG 21	<i>Lafoensia densiflora</i> Pohl.	Lythraceae	Flores

Continuação			
WG 204	<i>Peixotoa cordistipula</i> AE. Juss.	Malpighiaceae	Folhas
WG 171	<i>Trichilia catigua</i> AE. Juss.	Meliaceae	Folhas
WG 171	<i>Trichilia catigua</i> AE. Juss.	Meliaceae	Galho
WG154	<i>Albizia polyantha</i> (Spreng.f.) G.P.Lewis	Mimosaceae	Folha
WG 154	<i>Albizia polyantha</i> (Spreng.f.) G.P.Lewis	Mimosaceae	Galho
WG 96	<i>Virola sebifera</i> Aubl.	Myristicaceae	Partes aéreas
WG 24	<i>Rapanea guianensis</i> Aubl.	Myristicaceae	Frutos
WG 78	<i>Neea hermaphrodita</i> sp. Moore	Nyctaginaceae	Frutos
WG 54	<i>Piper angustifolium</i> Lam.	Piperaceae	Partes aéreas
WG 157	<i>Psychotria carthagenensis</i> Jacq.	Rubiaceae	Folhas
WG 164	<i>Zanthoxylum</i> sp	Rutaceae	Caule
WG 164	<i>Zanthoxylum</i> sp	Rutaceae	Folhas
WG 165	<i>Zanthoxylum</i> sp	Rutaceae	Folhas
WG 160	<i>Melochia parvifolia</i> Kunth.	Sterculiaceae	Caule
WG 160	<i>Melochia parvifolia</i> Kunth.	Sterculiaceae	Casca
WG 95	<i>Lantana camara</i> L.	Verbenaceae	Folhas
WG 95	<i>Lantana camara</i> L.	Verbenaceae	Caule
WG 173	<i>Vitex cymosa</i> Bertero ex Spreng.	Verbenaceae	Folhas
WG 173	<i>Vitex cymosa</i> Bertero ex Spreng.	Verbenaceae	Galho
WG 87	<i>Callisthene fasciculata</i> Mart.	Vochysiaceae	Folhas
WG 34	<i>Qualea parviflora</i> Mart.	Vochysiaceae	Caule

4.2.2 Avaliação biológica dos extratos

4.2.2.1 - Toxicidade sobre *Artemia salina*

A uma solução de sal marinho sintético (38g/L, pH=8-9) foram adicionados os ovos (80mg) de *Artemia salina*. Após 24h, as larvas eclodidas atingiram o estágio de náuplio e foram transferidas para frasco contendo soluções teste (extratos) e controles (branco e sulfato de quinidina); 24h após esta operação foi realizada a leitura. As diluições das amostras e do controle positivo (sulfato de quinidina nas concentrações de 1000, 500, 250 e 125µg/mL) foram feitas pelo método de diluição aritmética em solução aquosa de sal marinho sintético (38g/L de H₂O) com DMSO (0,5%). Em cada frasco foram adicionadas 10 larvas, 3 mL de solução (amostra teste e controles), sendo que as concentrações foram

testadas sempre em triplicatas. Para a análise dos dados, obtenção das CL_{50} , foi utilizado o método de análise Probit (FINNEY, 1974).

4.2.2.3 Atividade larvicida contra a larva do *Aedes aegypti*

Este ensaio foi realizado de acordo com metodologia descrita na literatura (WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO, 1981) com modificações.

No bioensaio, os ovos de *Ae. aegypti* foram deixados em um copo plástico contendo 20 mL de água isenta de cloro, por uma hora, para a eclosão, sob condições controladas de temperatura ($T = 27 \pm 2^\circ\text{C}$) e umidade relativa ($UR = 70 \pm 5\%$). Nessas condições os ovos embrionados deram origem às larvas do mosquito. As larvas (1000 espécimes) foram colocadas em uma bandeja plástica e alimentadas com ração de peixe (1g/L) e após atingirem o terceiro estágio de desenvolvimento (GADELHA e TODA, 1985) foram utilizadas no presente estudo.

As amostras a serem testadas (extratos brutos, frações e substâncias puras) foram pesadas, dissolvidas em dimetilsulfóxido (DMSO) a 0,5% sob agitação em ultra-som e, posteriormente foi acrescentado água (volume de 20 mL) isenta de cloro, e distribuídos em 5 mL por copo plástico, à temperatura ambiente. Foram utilizadas, em cada ensaio, sete concentrações, sendo que, para cada uma destas eram preparados quatro copos. Grupos de 10 larvas de terceiro estágio foram separados e transferidos para copos plásticos com 5 mL da amostra.

Após 24h de exposição das larvas aos tratamentos, à temperatura $27 (\pm 2^\circ\text{C})$, foi registrado o número de larvas mortas, sendo consideradas mortas àquelas que não apresentavam movimento ou não respondiam aos estímulos com a pipeta Pasteur. Para a análise dos dados, obtenção das CL_{50} , utilizou-se o método de análise Probit (FINNEY, 1974). Todos os ensaios foram repetidos duas a três vezes, em dias diferentes.

Paralelamente, todos os experimentos foram acompanhados de uma série controle, utilizando solução aquosa de DMSO 0,5% (controle negativo).

4.3 Estudo químico biomonitorado por bioensaio com larvas *Aedes aegypti* das espécies *Ocotea velloziana* (Meisn.) Mez. e *Aiouea trinervis* (Meisn.).

4.3.1 Estudo químico biomonitorado da casca do caule de *Ocotea velloziana*.

O extrato bruto etanólico seco da casca do caule de *Ocotea velloziana* (345,80g) foi submetido à partição com ButOH/H₂O (1:1), originando duas fases distintas: fase ButOH

(135,00g) e fase aquosa (210,00g). Após a concentração destas fases, em evaporador rotatório à baixa pressão, foi realizado o bioensaio com larvas para avaliar a atividade larvicida. A fase butanólica foi selecionada para o estudo. Esta fase foi submetida (130,00g) a uma filtração em funil de vidro sinterizado (ϕ -13,5cm) sobre uma camada (7,0cm) de sílica gel 60 RP-18 (40-63 μ m). A eluição foi realizada utilizando-se 1920 mL dos seguintes eluentes: H₂O-(F-1), H₂O:MeOH-8:2-(F-2), H₂O:MeOH-6:4-(F-3) e MeOH-(F-4) (Tabela 3), coletadas separadamente e codificadas: F-1; F-2; F-3 e F-4 respectivamente. Após a concentração das frações foi realizado o bioensaio com larvas.

Tabela 3 - Fracionamento em sílica RP-18 (40-63 μ m) da fase butanólica do extrato de *Ocotea velloziana* e suas correspondentes massas.

Frações	Proporção do eluente	Massa (g)
F-1	H ₂ O (1920 mL)	94,50
F-2	H ₂ O: MeOH (8:2) - (1536:384 mL)	9,86
F-3	H ₂ O: MeOH (6:4) - (1152:768 mL)	19,08
F-4	MeOH (1920 mL)	2,33

A fração F-4 foi selecionada para o estudo. Parte dessa fração (1,04g) foi dissolvida em 5 mL de metanol e incorporada em sílica gel (70-230 mesh); após a remoção do metanol por ventilação forçada, o material foi submetido a um processo de filtração em coluna de sílica gel (230-400mesh). A eluição foi realizada utilizando os seguintes solventes: AcOEt:MeOH (7:3) – 180 mL e MeOH – 150 mL perfazendo um total de 23 frações ($\pm$ 10mL cada) (Tabela 4). A análise comparativa através de cromatografia em camada delgada, utilizando como eluente CHCl₃:MeOH (10%) permitiu reuni-las em quatro grupos: F4.1; F4.2; F4.3 e F4.4. As frações foram colocadas na capela para evaporação do solvente e após cinco minutos observou-se a formação de cristais brancos, os quais foram recolhidos com pipeta Pasteur e colocados em frascos separados denominados, S-D.1c; S-D.2c e S-D.3c.

Os frascos com os sobrenadantes (F4.1; F4.2; F4.3) e F4.4 foram deixados na capela para evaporação do solvente. A figura 24 mostra as etapas realizadas no estudo biomonitorado com a casca do caule de *Ocotea velloziana*. Após a remoção do solvente as frações foram submetidas ao bioensaio com larvas.

As frações que continham os cristais (S-D.1c; S-D.2c e S-D.3c) foram selecionadas para o estudo e submetidas às técnicas de ressonância magnética nuclear uni e bidimensional, rotação óptica específica e infravermelho.

Tabela 4 - Fracionamento da fração MeOH (coluna de sílica gel-230-400mesh) do extrato da casca do caule de *Ocotea velloziana* e suas correspondentes massas.

Frações reunidas	Massa (mg)
F4.1 (sobrenadante)	10,14
F4.2 (sobrenadante)	13,68
F4.3 (sobrenadante)	12,65
F4.4	56,10
S-D.1c (cristais)	30,09
S-D.2c (cristais)	56,67
S-D.3c (cristais)	10,05

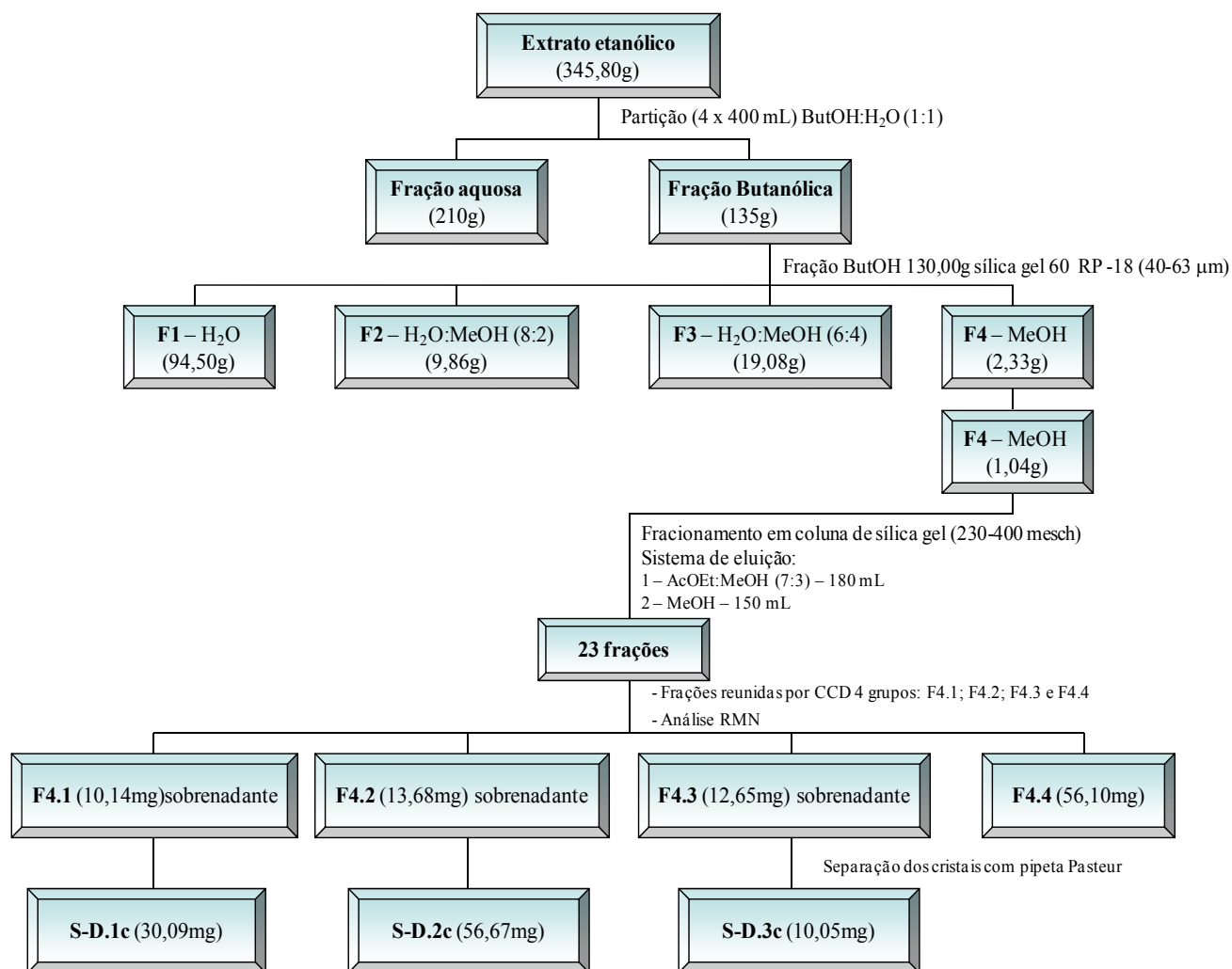


Figura 24 - Fracionamento biomonitorado por ensaio com larvas (*Aedes aegypti*) de *O. velloziana* para obtenção da substância ativa larvicida.

4.3.2 Estudo químico biomonitorado dos frutos de *Aiouea trinervis*

O extrato etanólico dos frutos (44,70g) da espécie *Aiouea trinervis*, foi submetido à partição com ButOH/H₂O (1:1) (4x400mL), originando duas fases distintas: fase ButOH (20,94g) e fase aquosa (20,44g). Após a concentração destas fases em evaporador rotatório à baixa pressão, foi realizado o bioensaio com larvas. A fase butanólica foi selecionada para o estudo. Esta fase foi submetida (20,50g) a uma filtração em funil de vidro sinterizado (ϕ - 6cm) sobre uma camada (7,0cm) de sílica gel 60 RP-18 (40-63 μ m). A eluição foi realizada utilizando-se 243 mL dos seguintes eluentes: H₂O:MeOH-8:2, H₂O:MeOH-6:4, H₂O:MeOH-4:6, H₂O:MeOH-2:8, MeOH e AcOEt (Tabela 5); as frações foram coletadas separadamente e codificadas: B.1; B.2; B.3; B.4; B.5 e B.6 respectivamente. Após a concentração em evaporador rotatório à baixa pressão, foi realizado o bioensaio com larvas. A fração (B.4)-H₂O:MeOH-2:8 foi selecionada para o estudo.

Tabela 5 - Fracionamento em sílica RP-18 da fase butanólica do extrato dos frutos de *Aiouea trinervis* e suas correspondentes massas.

Frações	Proporção do eluente	Massa (g)
B.1	H ₂ O-MeOH (8:2)	0,48
B.2	H ₂ O-MeOH (6:4)	0,25
B.3	H ₂ O-MeOH (4:6)	0,44
B.4	H ₂ O-MeOH (2:8)	4,80
B.5	MeOH	10,11
B.6	AcOEt	3,75

A fração B.4-H₂O-MeOH (2:8) (4,70g), foi dissolvida em 8 mL de hexano e incorporada em sílica gel (70-230 mesh); após a remoção do hexano por ventilação forçada, o material foi submetido a um processo de filtração em coluna de sílica gel (230-400mesh-40g). A eluição foi realizada utilizando 450 mL dos respectivos solventes: Hexano; Hexano:AcOEt (95:5); Hexano:AcOEt (90:10); Hexano:AcOEt (80:20); Hexano:AcOEt (60:40); Hexano:AcOEt (40:60); Hexano:AcOEt (20:80); AcOEt e MeOH (Tabela 6). Foram coletadas nove frações com um volume médio de 430 mL cada e codificadas: B4.1; B4.2; B4.3; B4.5; B4.6; B4.7; B4.8 e B4.9 respectivamente. Após a concentração em evaporador rotatório a baixa pressão, estas frações foram submetidas ao bioensaio com larvas.

Tabela 6 - Frações obtidas da filtração em coluna de sílica gel (230-400mesh) em gradiente de polaridade crescente: Hex.; AcOEt e MeOH da fração B.4-H₂O-MeOH (2:8) do extrato dos frutos de *Aiouea trinervis* e suas correspondentes massas.

Frações	Proporção do eluente	Massa (g)
B4.1	Hexano	0,68
B4.2	Hexano: AcOEt- (95:5)	0,23
B4.3	Hexano: AcOEt- (90:10)	0,17
B4.4	Hexano: AcOEt- (80:20)	2,97
B4.5	Hexano: AcOEt- (60:40)	0,58
B4.6	Hexano: AcOEt- (40:60)	0,32
B4.7	Hexano: AcOEt- (20:80)	0,17
B4.8	AcOEt	0,87
B4.9	MeOH	0,44

A fração B.4.4-Hexano: AcOEt-(80:20), material oleoso, foi selecionada para o estudo. Inicialmente foi feita uma análise espectroscópica no RMN ¹H e ¹³C para a obtenção do perfil da fração e após essa análise foi observado que esta apresentava uma mistura complexa que dificilmente seria isolada por cromatografia em sílica gel ou fase reversa. Feita esta constatação, o passo seguinte foi fazer análise em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em coluna analítica [4,6 mm/ 25 cm; Luna C-18 (2) 5μ - Phenomenex,], fluxo 0,5 mL/min: no eluente ACN/H₂O 90:10; detector UV, 254 nm, com alíquotas de 5 μL cada injeção para determinar a condição de separação em coluna semi-preparativa.

Após determinar a condição mais adequada para separação das substâncias, 1,50g da fração B.4.4-Hexano:AcOEt-(80:20) foi submetida à HPLC em coluna semi-preparativa [21,2 mm/25 cm; Luna C-18 100° 5μ - Phenomenex] fluxo 10 mL/min com eluente ACN/H₂O 90:10; detector UV, 254 nm, com alíquotas de 1 mL cada injeção, obtendo-se as frações B4.4.1 a B4.4.4 (Tabela 7), que após a remoção do solvente foram submetidas ao bioensaio com larvas, e a fração B4.4.4 foi selecionada para o estudo.

Tabela 7 - Frações obtidas da separação em HPCL, coluna semi-preparativa; fração B.4.4-Hexano:AcOEt- (80:20) do extrato dos frutos de *Aiouea trinervis* e suas correspondentes massas.

Frações obtidas (picos)	Massa (mg)
B4.4.1 (pico 1)	75,10
B4.4.2 (pico 2)	319,30
B4.4.3 (pico 3)	10,10
B4.4.4 (pico 4)	768,10

A fração B4.4.4 (400,00mg) foi submetida à HPLC em coluna semi-preparativa [21,2 mm/ 25 cm; Luna C-18 100° 5µ - Phenomenex] fluxo 10 mL/min com eluente ACN/H₂O 90:10. detector UV, 254 nm, com alíquotas de um mL cada injeção, com intuito de separar as substâncias do pico 4 (B4.4.4) que estavam em mistura. Da fração B4.4.4 foram obtidos dois compostos codificados como: IOL.1 (45,23mg) e outro OL (20,06 mg). As duas substâncias isoladas (IOL.1 e OL) foram submetidas ao bioensaio com larvas.

A figura 25 demonstra as etapas realizadas no estudo biomonitorado com os frutos de *Aiouea trinervis*.

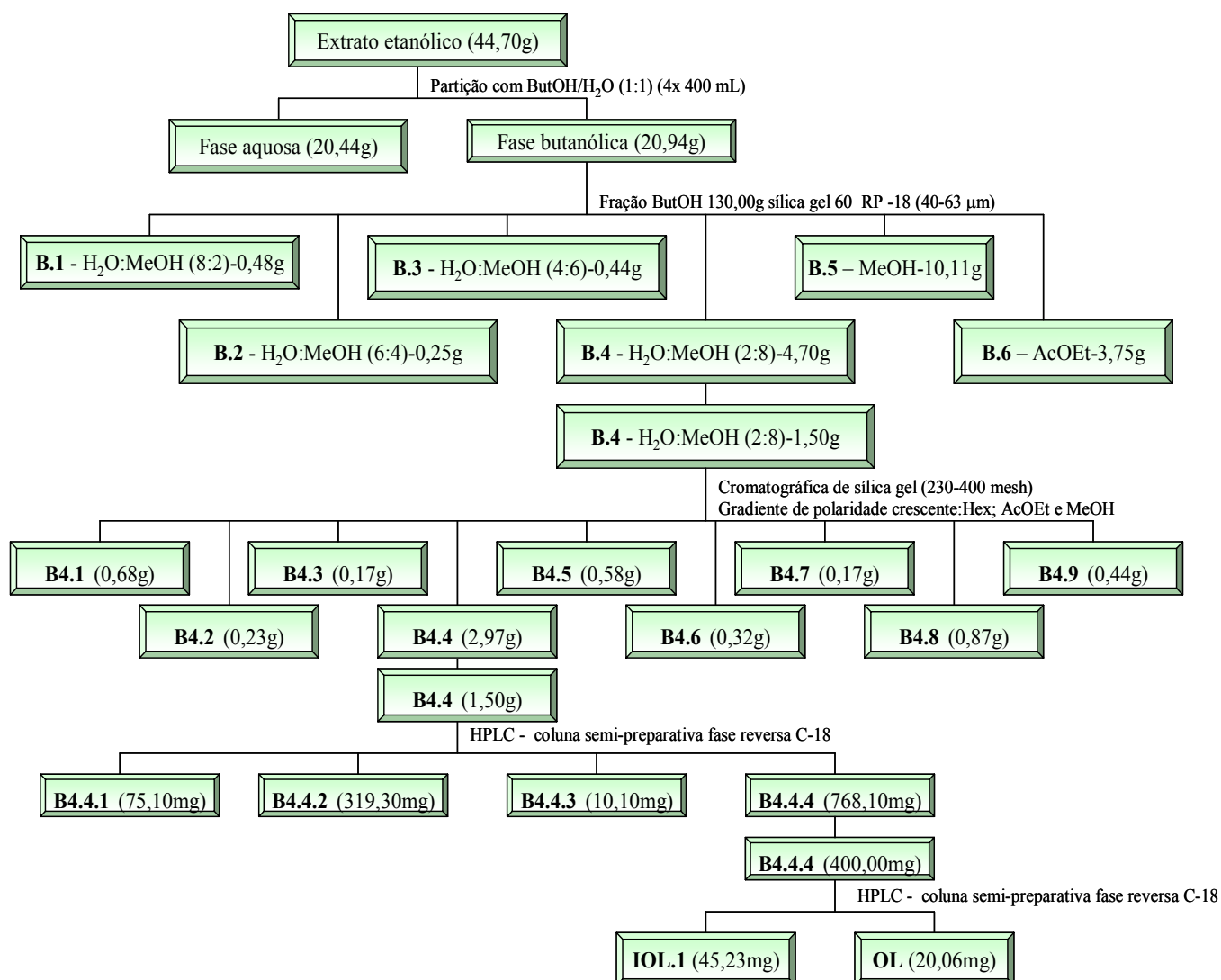


Figura 25 - Fracionamento biomonitorado por bioensaio com larvas (*Aedes aegypti*) de *Aiouea trinervis* para obtenção das substâncias puras.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação da toxicidade sobre *Artemia salina* e atividade larvicida das plantas selecionadas para estudos biológicos e escolha das plantas para estudo químico biomonitorado.

Os resultados dos valores das concentrações letais para atividade da toxicidade sobre *A. salina* e atividade larvicida contra larvas do mosquito *Ae. aegypti* estão apresentados na tabela 8.

Tabela 8 - Valores das concentrações letais para atividade contra toxicidade sobre *A. salina* e atividade larvicida contra *Ae. aegypti* (cepa Rockefeller) dos 50 extratos das plantas selecionadas .

Código	Espécies coletadas para o estudo	<i>A. salina</i> (CL ₅₀)µg/mL	Larvicida (CL ₅₀)µg/mL
WG 64	<i>Tapirira guianensis</i> Aubl.	>1000	>1000
WG 61	<i>Dendropanax cuneatus</i> (DC.) Decne. & Planch.	751,22	>1000
WG 61	<i>Dendropanax cuneatus</i> (DC.) Decne. & Planch	108,58	>1000
WG151	<i>Tabebuia avellanedae</i> Lorentz ex Griseb.	>1000	>1000
WG150	<i>Tabebuia avellanedae</i> Lorentz ex Griseb.	>1000	441,95
WG 84	<i>Arrabidaea brachypoda</i> (DC.) Bur.	442,63	>1000
WG 49	<i>Protium spruceanum</i> (Benth.) Engl.	>1000	>1000
WG 59	<i>Buchenavia tomentosa</i> Eichler	821,41	>1000
WG 178	<i>Terminalia fagifolia</i> Mart. & Zucc.	300,95	373,14
WG 56	<i>Erythroxylum</i> sp.	922,18	>1000
WG 167	<i>Sebastiania hispida</i> (Mart.) Pax	>1000	>1000
WG 88	<i>Copaifera langsdorffii</i> Desf.	527,98	>1000
WG 88	<i>Copaifera langsdorffii</i> Desf.	>1000	>1000
WG 25	<i>Diptychandra aurantiaca</i> Tul.	>1000	>1000
WG 170	<i>Inga uruguensis</i> Hook. & Arn.	>1000	>1000
WG 85	<i>Andira cubensis</i> Benth.	>1000	>1000
WG 18	<i>Indigofera hirsuta</i> Linnaeus	>1000	>1000
WG 62	<i>Lacistema hasslerianum</i> Chodat.	240,55	>1000
WG 42	<i>Aiouea trinervis</i> Meisn.	51,93	180,00
WG 42	<i>Aiouea trinervis</i> Meisn.	896,28	>1000
WG 42	<i>Aiouea trinervis</i> Meisn.	31,67	150,17

Continuação

11467	<i>Ocotea minarum</i> (Nees & C. Mart.) Mez	>1000	>1000
11467	<i>Ocotea minarum</i> (Nees & C. Mart.) Mez	263,53	>1000
11467	<i>Ocotea minarum</i> (Nees & C. Mart.) Mez	>1000	>1000
15427	<i>Ocotea velloziana</i> (Meisn.) Mez	555,94	213,70
WG 172	<i>Ocotea suaveolens</i> (Meissn.) Hassler	>1000	>1000
WG 172	<i>Ocotea suaveolens</i> (Meissn.) Hassler	>1000	>1000
WG 21	<i>Lafoensia densiflora</i> Pohl.	>1000	>1000
WG 21	<i>Lafoensia densiflora</i> Pohl.	>1000	>1000
WG 204	<i>Peixotoa cordistipula</i> AE. Juss.	>1000	>1000
WG 171	<i>Trichilia catigua</i> AE. Juss.	288,43	>1000
WG 171	<i>Trichilia catigua</i> AE. Juss.	>1000	>1000
WG 154	<i>Albizia polyantha</i> (Spreng.f.) G.P.Lewis	847,14	>1000
WG 154	<i>Albizia polyantha</i> (Spreng.f.) G.P.Lewis	504,56	547,76
WG 96	<i>Virola sebifera</i> Aubl.	>1000	>1000
WG 24	<i>Rapanea guianensis</i> Aubl.	302,95	>1000
WG 78	<i>Neea hermaphrodita</i> sp. Moore	431,67	>1000
WG 54	<i>Piper angustifolium</i> Lam.	459,19	>1000
WG 157	<i>Psychotria carthagenensis</i> Jacq.	>1000	>1000
WG 164	<i>Zanthoxylum</i> sp	298,42	537,60
WG 164	<i>Zanthoxylum</i> sp	824,56	>1000
WG 165	<i>Zanthoxylum</i> sp	783,52	435,29
WG 160	<i>Melochia parvifolia</i> Kunth.	400,00	>1000
WG 160	<i>Melochia parvifolia</i> Kunth.	216,97	>1000
WG 95	<i>Lantana camara</i> L.	251,83	>1000
WG 95	<i>Lantana camara</i> L.	862,74	>1000
WG 173	<i>Vitex cymosa</i> Bertero ex Spreng.	>1000	>1000
WG 173	<i>Vitex cymosa</i> Bertero ex Spreng.	464,92	875,38
WG 87	<i>Callisthene fasciculata</i> Mart.	509,25	>1000
WG 34	<i>Qualea parviflora</i> Mart.	953,89	>1000

Após análise dos resultados, os extratos da casca do caule de *Ocotea velloziana* ($CL_{50} = 213,70\mu\text{g/mL}$) e frutos *Aiouea trinervis* ($CL_{50} = 150,17\mu\text{g/mL}$) foram selecionados para o estudo químico biomonitorado.

5.2 Estudo fitoquímico e avaliação da atividade larvicida das frações obtidas pelo fracionamento químico biomonitorado do extrato da casca do caule *O. velloziana*.

Após ter sido feita a triagem com os 50 extratos, iniciou-se a investigação fitoquímica monitorada pelo bioensaio com larvas do mosquito *Ae. aegypti* com extrato etanólico da casca do caule de *Ocotea velloziana* utilizando ButOH/H₂O (1:1), que resultou duas fases distintas: fase ButOH ($CL_{50} = 193,00\mu\text{g/mL}$) e fase aquosa ($CL_{50} = >1000\mu\text{g/mL}$) sendo utilizada apenas a fase butanólica.

A fase butanólica foi submetida ao fracionamento, obtendo-se quatro frações: F-1-H₂O, F-2-H₂O:MeOH-8:2, F-3-H₂O:MeOH-6:4 e F-4-MeOH, que foram submetidas ao bioensaio com larvas (Tabela 9).

Tabela 9 - Valores das concentrações letais para atividade larvicida com larvas do mosquito *Ae. aegypti* (cepa Rockefeller) do fracionamento da fase butanólica em sílica RP-18, do extrato de *Ocotea velloziana*

Fração: Proporção do solvente	CL_{50} $\mu\text{g/mL}$ (cepa Rockefeller)
F-1- H ₂ O	>1000
F-2-H ₂ O:MeOH-8:2	>1000
F-3-H ₂ O:MeOH-6:4	>1000
F-4-MeOH	181,70

Após a obtenção dos resultados com as frações da fase butanólica (Tabela 9), observou-se que a fração MeOH ($CL_{50} = 181,70\mu\text{g/mL}$) poderia conter substâncias promissoras quanto à atividade larvicida. Essa fração foi submetida a uma filtração em sílica e forneceu ao final 23 frações que foram reunidas em quatro grupos, e, após análise em cromatografia de camada delgada, codificadas como: F4.1 (40,23mg); F4.2 (70,35mg); F4.3 (22,70mg) e F4.4 (56,10mg). As frações foram submetidas ao bioensaio com larvas do mosquito *Ae. Aegypti* (cepa Rockefeller) para avaliar a ação larvicida.

Tabela 10 - Valores das concentrações letais para atividade larvicida contra larvas do mosquito *Ae. Aegypti* (cepa Rockefeller) obtidas do fracionamento da fração MeOH (coluna de sílica gel-230-400mesh), do extrato de *Ocotea velloziana*.

Fração reunidas	CL ₅₀ µg/mL (cepa Rockefeller)
F4.1 (sobrenadante)	>1000
F4.2 (sobrenadante)	>1000
F4.3 (sobrenadante)	>1000
F4.4	>1000
S-D.1c (cristais)	30,02
S-D.2c (cristais)	33,61
S-D.3c (cristais)	98,57
Controle DMSO 0,5%	Inativo

Os resultados do bioensaio com larvas (cepa Rockefeller) evidenciaram que a substância com atividade larvicida estava presente nas frações que continham os cristais, pois os frascos com o sobrenadante apresentaram resultados CL₅₀= >1000µg/mL (Tabela 10).

Tendo em vista os resultados obtidos, pode-se sugerir que a substância (cristais) isolada da casca do caule de *Ocotea velloziana* é um promissor agente larvicida, pois de acordo com a literatura (CHENG et al., 2003), substâncias com valores de CL₅₀ menores que 100µg/mL são consideradas bons agentes larvicidas.

5.3 Estudo fitoquímico e avaliação da atividade larvicida das frações obtidas pelo fracionamento químico biomonitorado do extrato dos frutos de *Aiouea trinervis*.

O fracionamento fitoquímico monitorado pelo bioensaio com larvas do mosquito *Ae. aegypti* com extrato etanólico dos frutos de *Aiouea trinervis* (CL₅₀= 150,17µg/mL) utilizando ButOH/H₂O (1:1), resultou em duas fases distintas: fase ButOH (CL₅₀= 110,25µg/mL) e fase aquosa (CL₅₀= >1000µg/mL). Segundo Sukumar, Perich e Boobar (1991), a obtenção de extratos ou substâncias em solventes específicos poderá influenciar na bioatividade, possivelmente pelo fato do constituinte responsável pela atividade ser extraído

em grande quantidade somente com solventes adequados, fato que justifica a atividade concentrada na fase ButOH.

A fase butanólica após ser submetida à filtração forneceu seis frações. Após realizar o teste larvicida com todas as frações observou-se que houve acúmulo de substâncias bioativas na fração B.4-H₂O:MeOH (2:8) - (Tabela 11).

Tabela 11 - Valores das concentrações letais para atividade larvicida contra larvas do mosquito *Ae. aegypti* (cepa Rockefeller) obtidas do fracionamento da fase butanólica em sílica RP-18 do extrato dos frutos de *Aiouea trinervis*

Fração-Proporção do solvente	CL₅₀ µg/mL (cepa Rockefeller)
B.1- H ₂ O-MeOH (8:2)	>1000
B.2- H ₂ O-MeOH (6:4)	113,40
B.3- H ₂ O-MeOH (4:6)	>1000
B.4- H ₂ O-MeOH (2:8)	52,18
B.5- MeOH	>1000
B.6- AcOEt	181,70

A fração selecionada, B.4-H₂O-MeOH (2:8), por ter sido a mais ativa (CL₅₀= 52,18µg/mL) e pela quantidade de material obtido (4,80g) foi submetida à filtração em sílica e forneceu nove frações, essas foram submetidas ao bioensaio com larvas (Tabela 12).

Tabela 12 - Valores das concentrações letais para atividade larvicida contra larvas do mosquito *Ae. aegypti* (cepa Rockefeller) obtidas do fracionamento da fração B.4-H₂O-MeOH (2:8) do extrato dos frutos de *Aiouea trinervis*.

Fração-Proporção do solvente	CL ₅₀ µg/mL (cepa Rockefeller)
B.4.1- Hexano	>1000
B.4.2- Hexano-AcOEt-(95:5)	>1000
B.4.3- Hexano-AcOEt-(90:10)	>1000
B.4.4- Hexano-AcOEt-(80:20)	47,67
B.4.5- Hexano-AcOEt-(60:40)	168,56
B.4.6- Hexano-AcOEt-(40:60)	119,70
B.4.7- Hexano-AcOEt-(20:80)	343,96
B.1.8- AcOEt	>1000
B.1.9- MeOH	170,80

As frações B.4.4-Hexano-AcOEt-(80:20)-CL₅₀= 47,67µg/mL; B.4.5-Hexano-AcOEt-(60:40)-CL₅₀= 168,56µg/mL; B.4.6-Hexano-AcOEt-(40:60)-CL₅₀= 119,70µg/mL; B.4.7-Hexano-AcOEt-(20:80)-CL₅₀= 343,96µg/mL B.1.9- MeOH-CL₅₀= 170,80µg/mL, foram enviadas a RMN ¹H para análise do perfil das amostras, notou-se misturas complexas e todas as frações apresentavam no espectro grupos de sinais semelhantes, sugerindo que a substância ativa está presente em diferentes concentrações nas frações em que apresentaram CL₅₀ >1000, corroborando os resultados obtidos, mas devido ao pouco rendimento do material não foram utilizadas para o estudo. Dentre as frações testadas, a fração B.4.4-Hexano:AcOEt 80:20 (CL₅₀= 47,67µg/mL) foi a mais ativa.

Após análise de RMN ¹H da fração B.4.4- Hexano:AcOEt 80:20 observou-se que a fração não estava pura, sendo submetida a HPLC para separação das substâncias.

No cromatograma analítico (Figura 26) observou-se a presença de quatro grupos, com tempo de retenção a: 18 (B4.4.1 - 75,10mg), 30 (B4.4.2 - 319,30 mg), 40 (B4.4.3 - 10,10mg) e 55 (B4.4.4 - 768,10mg) minutos.

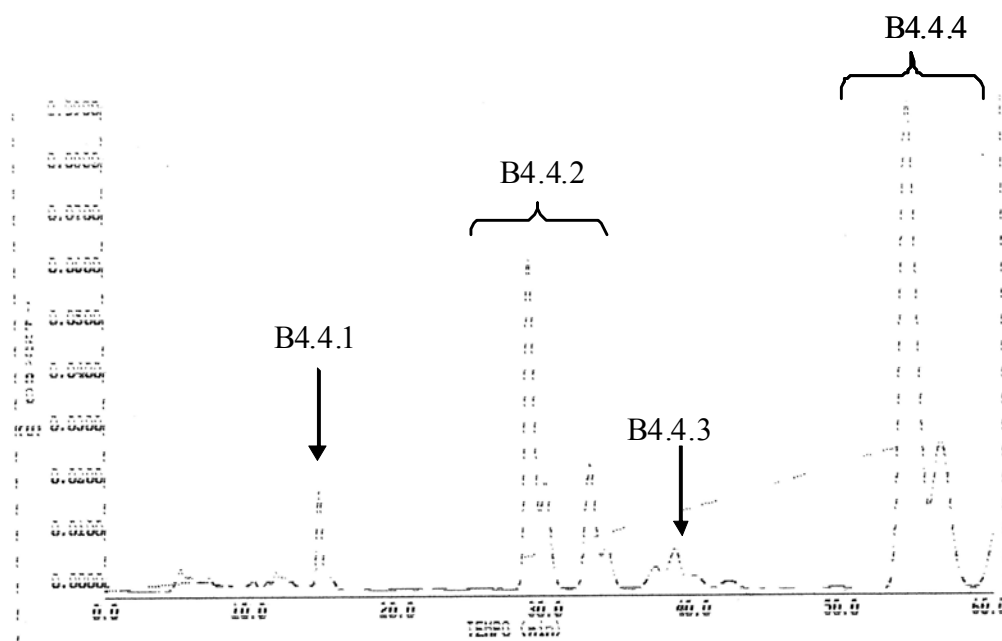


Figura 26 - Cromatograma analítico HPLC obtido da fração B4.4-Hexano: AcOEt-(80:20) do extrato dos frutos de *Aiouea trinervis*. Condições analíticas: coluna [4,6 mm/ 25 cm; Luna C-18 (2) 5 μ - Phenomenex] fluxo 0,5 mL/min.; no eluente ACN/H₂O 90:10 (210 nm); detector UV, 254 nm, com tempo de retenção a: 18 (B4.4.1), 30 (B4.4.2), 40 (B4.4.3) e 55 (B4.4.4) minutos.

Após análise do cromatograma analítico foi possível observar que a amostra continha mistura, sendo necessário purificá-las em coluna semi-preparativa. Após a purificação as frações em grupos foram submetidas ao bioensaio com larvas (Tabela 13).

Tabela 13 - Valores das concentrações letais para atividade larvicida contra larvas do mosquito *Ae. aegypti* (cepa Rockefeller) dos grupos obtidos em HPLC (coluna semi-preparativa) da fração B.4.4-Hex:AcOEt 80:20 do extrato dos frutos de *Aiouea trinervis*.

Frações obtidas (grupos)	CL ₅₀ μ g/mL (cepa Rockefeller)
B4.4.1 (pico 1)	>1000
B4.4.2 (pico 2)	56,13
B4.4.3 (pico 3)	67,98
B4.4.4 (pico 4)	19,82
Controle DMSO 0,5%	Inativo

O grupo com atividade mais pronunciada foi B4.4.4 (pico 4) (CL_{50} = 19,82 μ g/mL), sendo este submetido à HPLC em coluna semi-preparativa, pois estava em mistura, conforme observado na figura 27. Após a purificação (B4.4.4 (pico 4) foram obtidas duas substâncias codificadas como: IOL.1 (45,23mg) e outra OL (20,06 mg), observadas no cromatograma (Figura 27).

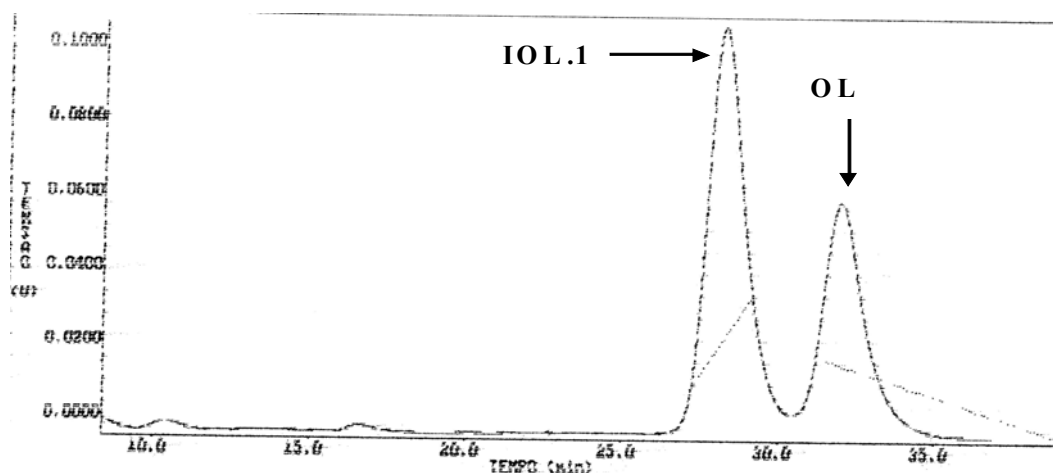


Figura 27 - Cromatograma semi-preparativo obtido do HPCL da fração B4.4.4 (pico 4), com tempo de retenção a: 29 (IOL.1) e 33 (OL) minutos do extrato dos frutos de *Aiouea trinervis*. Condições semi-preparativas: 21,2 mm/ 25 cm; Luna C-18 100° 5 μ - Phenomenex, fluxo 10 mL/min com eluente ACN/H₂O 90:10. detector UV, 254 nm.

No ensaio realizado com as duas substâncias (OIL.1 e OL) observou-se que ambas apresentaram resultados significativos para atividade larvicida, sendo que OIL.1 foi menos ativa (CL_{50} = 3,20 μ g/mL) que sua forma isomérica OL (CL_{50} = 0,50 μ g/mL).

Os valores da CL_{50} obtidos em laboratório com as larvas (cepa Rockfeller) diante do larvicida Temefós (CL_{50} 0,0094 μ g/mL) demonstraram que essas larvas são susceptíveis ao inseticida.

5.4 Identificação estrutural das substâncias isoladas com atividade larvicida

A investigação fitoquímica monitorada pelo bioensaio com larvas dos extratos da casca do caule de *Ocotea velloziana* e frutos de *Aiouea trinervis* conduziu ao isolamento de três substâncias, as quais foram denominadas por letras referentes à substância isolada: S-D - isolada de *Ocotea velloziana* e OL e IOL.1 - isoladas de *Aiouea trinervis* (Figura 28). A identificação estrutural dessas substâncias foi efetuada com base na análise de dados de: IV,

rotação óptica específica, RMN unidimensionais ^1H , ^{13}C e DEPT 135° e bidimensionais HSQC e HMBC, massa impacto eletrônico e comparação com dados da literatura.

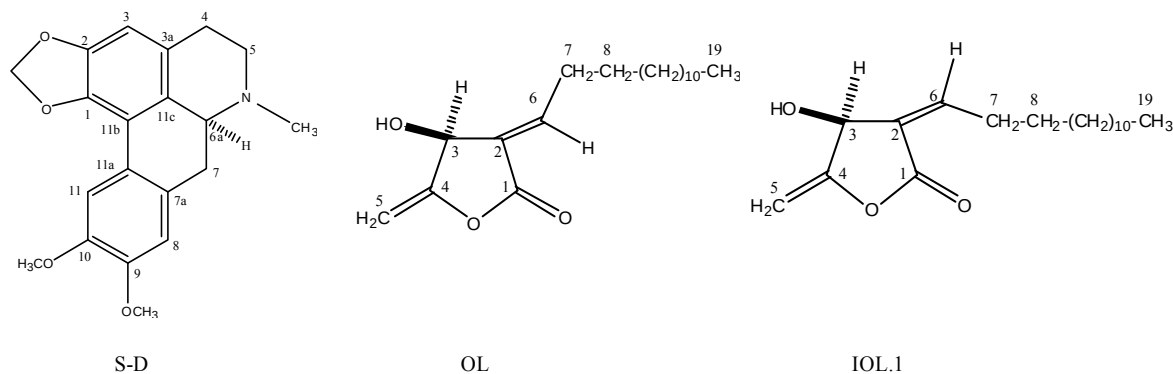


Figura 28 - Estruturas químicas isolados da casca do caule *Ocotea velloziana* (S-D) e frutos de *Aiouea trinervis* (OL e IOL.1).

5.4.1 Substância isolada do extrato etanólico da casca do caule de *Ocotea velloziana*.

Das frações F1.1, F4.2 e F4.3 (casca do caule) foram isolados cristais brancos solúveis em DMSO- d_6 , designados: S-D.1c, S-D.2c, S-D.3c.

O espectro de RMN ^1H (Figura 29, Tabela 9) apresentou três grupos de sinais. O primeiro grupo (hidrogênios mais protegidos) localiza-se na região em δ 2,32 e 2,88, referentes a três grupos metilênicos e um singlete em δ 2,41 proporcional a três hidrogênios de uma metila ligada a nitrogênio (N-CH₃).

Um segundo grupo corresponde a singletos referentes a hidrogênios aromáticos em δ 7,53, 6,93 e 6,56, e a sinais de metileno dióxido em δ 6,01 e 5,87, e o terceiro grupo referente a duas metoxilas aromáticas em δ 3,95 e 3,66.

No espectro de RMN ^{13}C (Figura 31, Tabela 14) foram observados sinais para 20 carbonos. Com auxílio das informações obtidas do espectro DEPT 135° (Figura 32), estes sinais foram atribuídos a três carbonos metílicos (δ 56,2, 56,9 e 44,7) este último referente a uma metila ligada a nitrogênio. Também foram observados três sinais referentes a carbonos metilênicos em δ 29,2; 53,4 e 34,3 e em δ 101,0 referente a um grupo metileno dioxílico. Observaram-se também sinais de quatro carbonos metínicos em δ 111,1; 112,5; 107,0; 62,4 e a nove carbonos tetrassubstituídos.

Os dados obtidos na determinação estrutural são compatíveis com a estrutura de um alcaloide aporfinico contendo grupos metileno dióxido, N-Me e duas OMe, além de três CH de anéis aromáticos.

O espectro na região IV (Figura 33) revelou a presença de banda característica de grupo N (3.448 cm^{-1}) e banda indicativa da presença do grupo metilenodióxido (1.589 cm^{-1}).

Comparando estas possibilidades com as substâncias anteriormente isoladas de *O. velloziana* (GARCEZ et al., 1995) foi possível constatar que os dados de RMN ^1H e ^{13}C dos cristais codificados S-D.1c, S-D.2c e S-D.3c mostravam boa correlação com o alcaloide aporfinico S-dicentrina (Tabela 9 - RMN ^1H e ^{13}C). A estereoquímica do C6a foi estabelecida através de sua rotação óptica específica ($[\alpha]_D^{20} = +61,05$) que por ser dextrógira, permite concluir que o mesmo pertence à série S, portanto tem configuração relativa do C6a como indicada na estrutura (Figura 30).

Os resultados das CL_{50} mostraram que os cristais eram ativos, mas estavam em concentrações diferentes, sendo os cristais S-D.1c ($\text{CL}_{50} = 30,02\mu\text{g/mL}$) o mais puro.

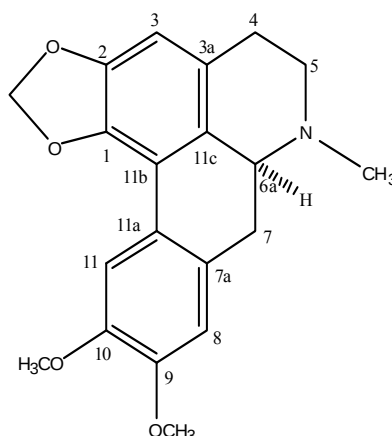


Figura 29 - Estrutura química da substância S-dicentrina isolada da casca do caule *Ocotea velloziana*.

Tabela 14 - Dados de deslocamentos químicos (δ) de RMN ^1H (300 MHz), ^{13}C (75 MHz) em DMSO- d_6 da substância S-dicentrina, obtida do extrato de *Ocotea velloziana* e do alcaloide citado na literatura (GARCEZ, YOSHIDA e GOTTLIEB, 1995) (75 MHz, CDCl_3).

Posição	δ H J (Hz)	Literatura δ H	δ C	Literatura δ C
1	-	-	166,64	166,7
2	-	-	127,29	127,2
3	5,23 sl	5,22 dl ($J = 6,3$)	66,43	66,4
3 ^a	-	-	157,68	157,5
4	4,93(dd $J = 2,5/1,5$)	4,92 (dd $J = 2,8/1,4$)	91,32	91,4
5	4,70 dd (dd $J = 2,7/1,3$)	4,70 (dd $J = 2,9/1,7$)	91,32	91,4
6 ^a	7,06 (dt $J = 8,0/2,0$)	7,05 (td $J = 8,0/2,1$)	150,19	150,2
7 ^a	-	-	128,3	128,3
7	2,88 (dd, $J = 15,3; 3,1$)	-	34,3	34,3
8	6,93 sl	-	112,5	110,5
9	-	-	148,7	148,2
10	-	-	147,7	147,6
11	7,53 sl	-	111,1	111,2
11 ^a	-	-	123,1	123,4
11b	-	-	116,3	116,6
11c	-	-	127,2	126,4
N-CH ₃	2,41 s	-	44,7	44,0
O-CH ₃	3,95 s	-	56,2	55,9
O-CH ₃	3,66 s	-	56,9	56,1
O-CH ₂ -O	5,87 sl, 6,01sl	-	101,0	100,2

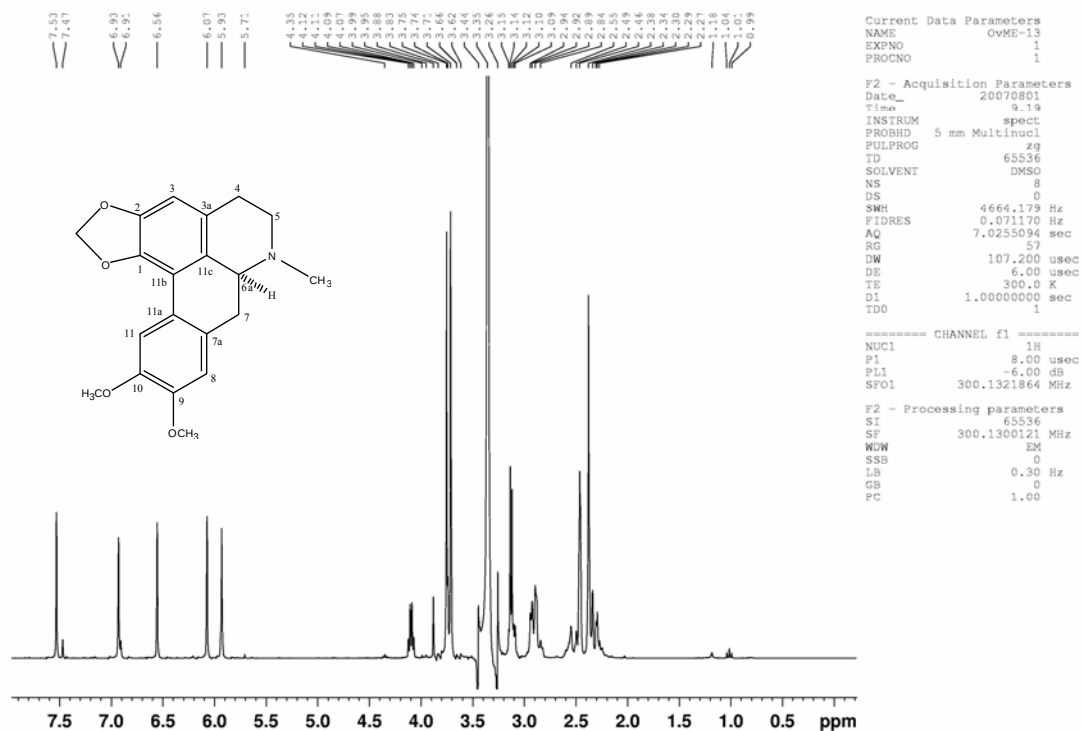


Figura 30 - Espectro de RMN ^1H (300 MHz – DMSO- d_6) da substância S-dicentrina.

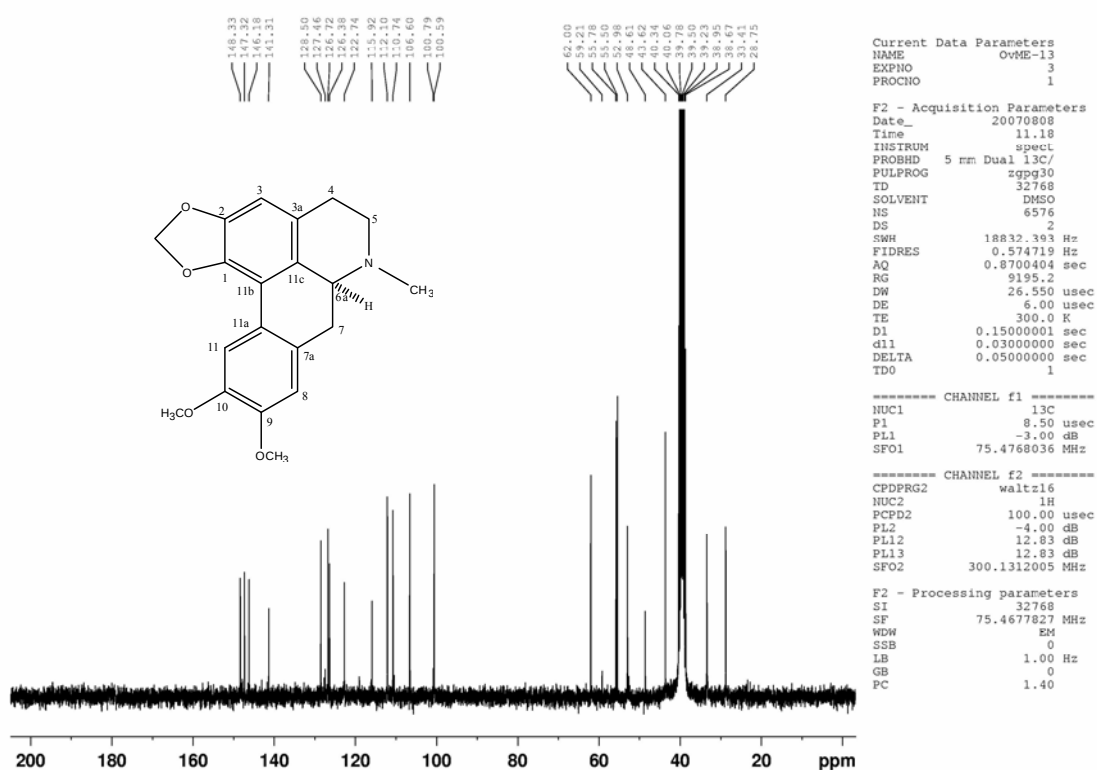


Figura 31 - Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz- DMSO- d_6) da substância S-dicentrina.

5.4.2 Substância isolada (IOL.1) do extrato etanólico dos frutos *Aiouea trinervis*.

Da fração Hexano:AcOEt-(80:20) dos frutos *Aiouea trinervis* foi isolada uma substância oleosa, designada por IOL.1(Figura 35).

O espectro de RMN ^1H (Figura 36, Tabela 10) de IOL.1 apresentou um conjunto de sinais que inclui um sinal intenso a δ 1,23 ppm (singleto largo) e um tripleto ($J = 6,3$ Hz) a δ 0,86, demonstrando a presença de uma cadeia alquílica linear e longa na estrutura do composto. O espectro de RMN ^1H mostrou também sinais referentes a um par de hidrogênios metilênicos de ligação dupla (δ 4,70 e 4,93 ppm) e a um metino em posição β de uma ligação dupla conjugada (δ 7,06; dt $J = 8,0/2,1$ Hz). Além destes sinais observou-se um singleto largo a δ 5,23 ppm e sinais de hidrogênios alílicos a δ 2,55-2,33 ppm e sinais a δ 1,44- 1,49 ppm, pertencentes à cadeia alquílica longa (Tabela 15).

O espectro de RMN ^{13}C (Figura 37) de IOL.1 apresentou quatro sinais com valores de δ acima de 100 (166,64 – C; 157,68 – CH; 150,19 – C e 127,29 – C), um sinal a δ 91,32 – CH_2 e outro a δ 66,43 – CH, além dos sinais correspondentes à cadeia alquílica longa (Tabela 10).

Os sinais obtidos pelo espectro de RMN ^{13}C são indicativos de que a substância IOL.1 possui uma estrutura tipo lactona de cinco membros com um metileno exocíclico, do tipo já isolado anteriormente das folhas e raízes da planta (MARTINS, 2004).

A geometria da ligação dupla trissubstituída exocíclica ao anel γ -lactônico pode ser definida como (E), com base no valor do deslocamento químico do hidrogênio olefínico (H-6), observado a δ 7,06 ppm, enquanto que no caso de estereoquímica (Z) apresenta-se mais protegido, sendo observado na região do espectro a δ 6,65 ppm. Também são observadas diferenças no espectro de RMN ^{13}C que, quando a ligação dupla apresenta geometria (E), a ressonância de C-7 é observada na região de 29 ppm enquanto que o isômero (Z) o sinal para este carbono é observado na região de 27 ppm.

A substância designada como IOL.1, possui um centro quiral, indicando a possibilidade de duas formas configuracionais (enantiômeros), representadas na figura 34.

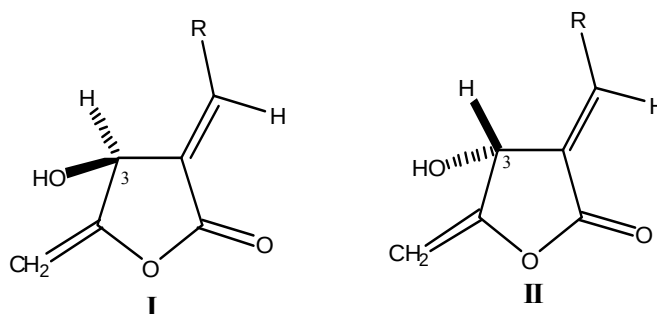


Figura 34 - Estruturas químicas possíveis para a substância IOL.1 isolada dos frutos *Aiouea trinervis*.

De acordo com a literatura, butanolídeos com configuração I são levorrotatórios, e os de configuração II dextrorrotatórios (CHENG et al., 2001; TSAI et al., 2002).

Com base no valor negativo da rotação óptica apresentado por IOL.1, $[\alpha]_D^{20} = -38,0^\circ$ (0,425; CHCl_3) conclui-se que a hidroxila possui em C-3 orientação β (Estrutura I), configuração absoluta de C-3 é S.

O experimento HSQC (Figura 38) mostrou o correlacionamento dos sinais entre hidrogênios olefinicos a $\delta 4,70$ e $4,93$ e o carbono metilênico a $\delta 91,32$.

A extensão da cadeia alquílica em C-6 presente na estrutura de IOL.1 pode ser determinada com base nos dados obtidos através da espectrometria de massas por impacto eletrônico (Figura 39). O pico observado neste espectro a m/z 290 foi atribuído ao íon pseudo molecular $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^+$ compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{19}\text{H}_{32}\text{O}_3$ (PM 308).

O espectro na região do IV (Figura 40) apresentou bandas de absorção em 3413cm^{-1} , característica de deformação axial de grupo hidroxila e $1770,5\text{cm}^{-1}$ e $1681,8\text{cm}^{-1}$ atribuídas ao anel γ -lactônico- α, β' -insaturado.

A comparação dos dados de RMN ^1H e ^{13}C , além dos experimentos de RMN bidimensionais mostrou tratar-se de uma estrutura semelhante à isoobtusilactona A (MARTINS, 2004).

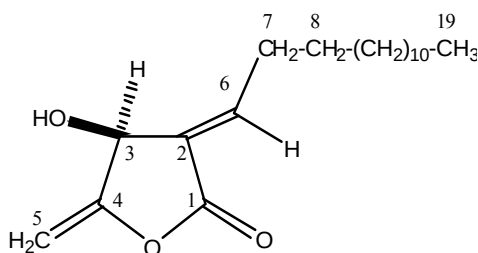


Figura 35 - Estrutura química da substância isoobtusilactona A isolada dos frutos *Aiouea trinervis*.

Tabela 15 - Dados de deslocamentos químicos (δ) de RMN ^1H (300 MHz), ^{13}C (75 MHz) em CDCl_3 da substância isoobtusilactona A, obtidos de *Aiouea trinervis* e do butanolídeo citado na literatura (ANDERSON et al., 1992) (60MHz, CDCl_3).

Posição	δ H J (Hz)	Literatura δ H	δ C	Literatura δ C
1	-	-	166,64	166,7
2	-	-	127,29	127,2
3	5,23 sl	5,22 dl ($J = 6,3$)	66,43	66,4
4	-	-	157,68	157,5
5°	4,93(dd $J = 2,5/1,5$)	4,92 (dd $J = 2,8/1,4$)	91,32	91,4
5b	4,70 dd (dd $J = 2,7/1,3$)	4,70 (dd $J = 2,9/1,7$)	91,32	91,4
6	7,06 (dt $J = 8,0/2,0$)	7,05 (dt $J = 8,0/2,1$)	150,19	150,2
7	2,33-2,55 m	2,40 (ddd $J =$	29,10	29,7
7'		14/8,0/1,0/7,5)		
7''		2,46 (ddd $J =$		
		14/8,0/1,0/7,5)		
8	1,44 -1,49	1,50 m	28,29	29,7
9-16	1,23 sl	1,23 s	29,50 29,20	29,6 – 28,3
17	-	-	31,90	31,9
18	-	-	22,67	22,7
19	0,85 t ($J = 6,3$)	0,85 (t $J = 6,5$)	14,10	14,2
OH	2,26m	2,46 (dl $J = 6,1$)	-	-

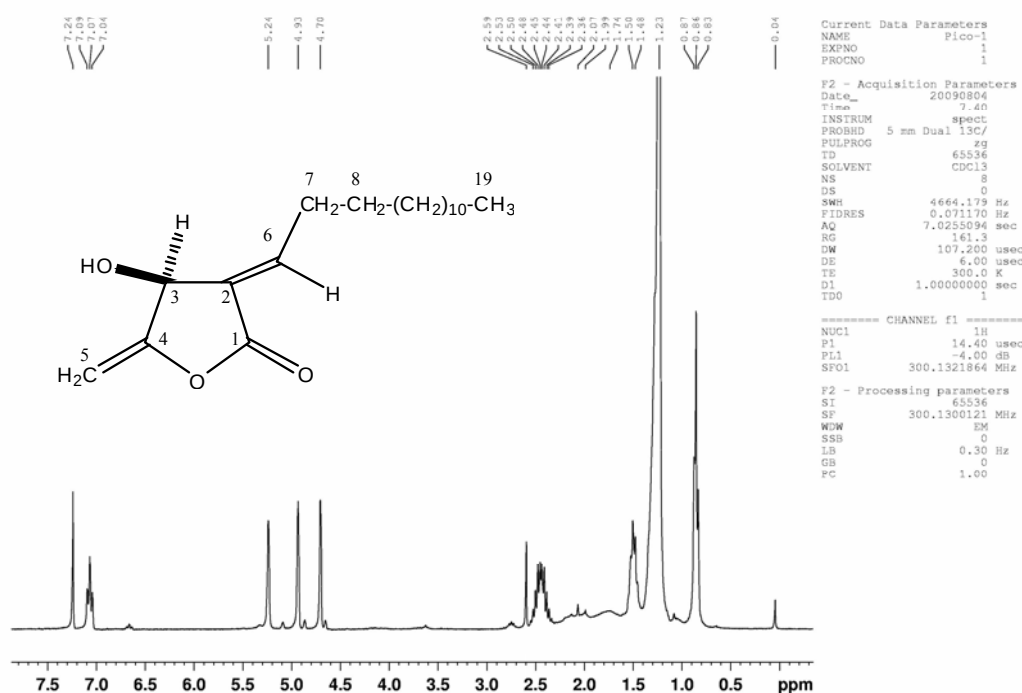


Figura 36 - Espectro de RMN ^1H (300 MHz - CDCl_3) da substância isoobtusilactona A.

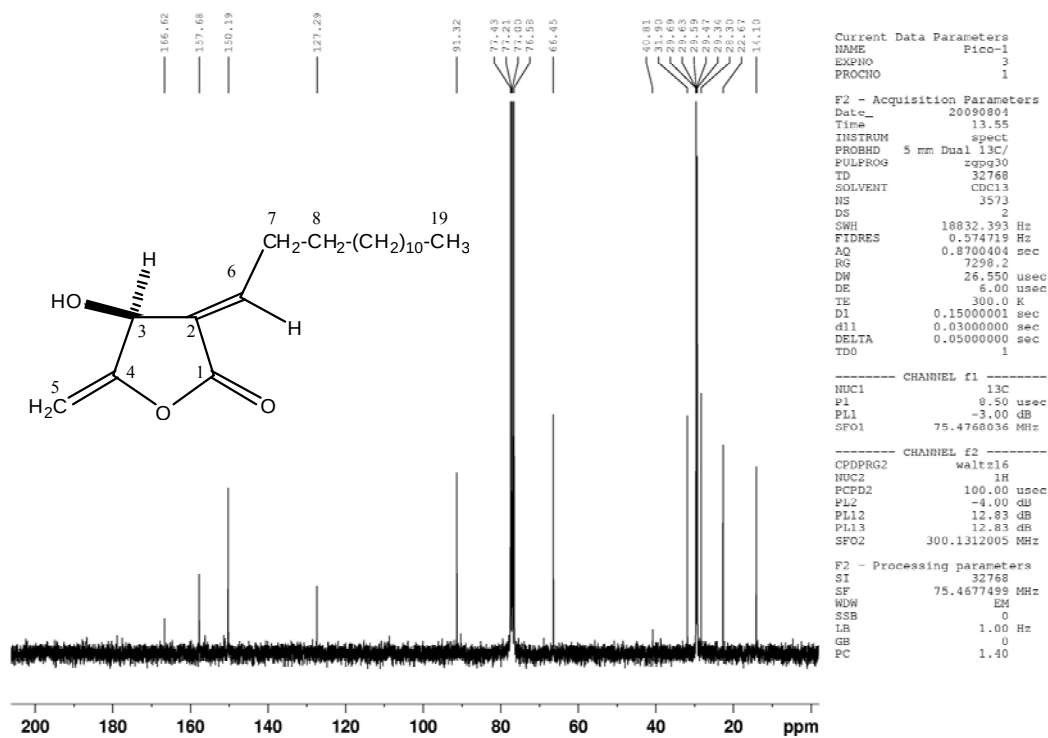


Figura 37- Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz- CDCl_3) da substância isoobtusilactona A.

5.4.3 Substância isolada (OL) do extrato etanólico dos frutos *Aiouea trinervis*

A substância codificada como OL (Figura 41) obtida do fracionamento Hexano:AcOEt- (80:20) dos frutos *Aiouea trinervis* teve sua estrutura identificada com base na análise dos dados obtidos dos espectros de RMN ^1H , ^{13}C , HSQC (Figuras 42, 43, 44).

A comparação dos dados espectrais de RMN ^1H e ^{13}C (Figuras 42 e 43) com os dados de IOL1 indicaram que suas estruturas eram bastante semelhantes, sendo possível propor para OL a estrutura de um sistema isomérico γ -lactona de IOL1.

No espectro de RMN ^1H de OL, as diferenças observadas com relação ao IOL1, são referentes aos valores de deslocamento químico do hidrogênio olefínico δ H-6 (6,65 ppm - dt $J = 7,8/1,9$ Hz), sendo mais protegido em OL, pela influência da carbonila no carbono vicinal (C-1).

A sugestão para a proposta estrutural entre IOL1 e OL situava-se na geometria da ligação dupla trissubstituída, sendo esta fortalecida pelos dados espectrais de RMN ^{13}C , particularmente pelo valor de deslocamento químico de C-3 (δ 68,76 ppm), ao qual se encontra mais protegido no isômero Z (OL) pelo efeito γ exercido pelo substituinte em C-6. Estes e os demais dados espectrais de OL apresentaram uma boa correlação com os relatados para os 3-hidróxi-4-metileno butanolídeos apresentando estereoquímica (Z) para a ligação trissubstituída.

Através da análise no espectro HSQC (Figura 44) foi possível observar as correlações entre os hidrogênios olefínicos a δ 4,64 e δ 4,84 ppm e o carbono metilênico a δ 90,05 ppm (Tabela 16).

O íon $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^+$ a m/z 290, presente no espectro de massas por impacto eletrônico de OL (Figura 45) estabeleceram o peso molecular 308 para OL. O espectro na região do infravermelho (Figura 46) apresentou bandas de absorção em $3390,6\text{cm}^{-1}$, característica de deformação axial de grupo hidroxila e $1785,9\text{cm}^{-1}$ e $1677,9\text{cm}^{-1}$ atribuídas ao anel γ -lactônico- α,β' -insaturado.

A análise conjunta dos dados espectrais discutidos, bem como a comparação com os dados do composto correspondente descrito da literatura (MARTINS, 2004) permitiram propor para OL a denominação de obtusilactona A (Figura 41).

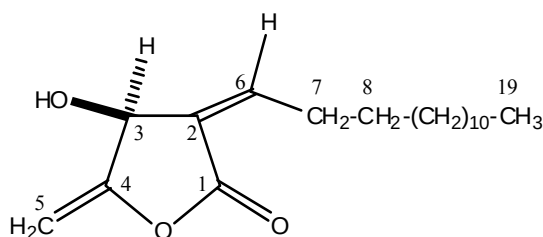


Figura 41 - Estrutura química da substância obtusilactona A isolada dos frutos *Aiouea trinervis*.

Tabela 16 - Dados de deslocamentos químicos (δ) de RMN ^1H (300 MHz), ^{13}C (75 MHz) em CDCl_3 da substância obtusilactona A, obtidos de *Aiouea trinervis* e do butanolídeo citado na literatura (ANDERSON et al., 1992) (60MHz, CDCl_3).

Posição	δ H J (Hz)	Literatura δ H	δ C	Literatura δ C
1	-	-	165,33	166,1
2	-	-	126,93	126,7
3	5,07 sl	5,09 sl	68,76	68,9
4	-	-	157,68	157,4
5a	4,84(dd $J=2,9/1,8$)	4,87 (dd $J=2,8/2,0$)	90,05	90,3
5b	4,64 dd (dd $J=2,9/1,5$)	4,65 (dd $J=2,8/1,7$)	90,05	90,3
6	6,65 (dt $J=7,8/1,9$)	6,67 (dt $J=7,8/1,9$)	151,08	151,3
7	2,68-2,76 m	2,75 (dddt $J=15/7,8/1,6/7,5$)	28,28	29,7
8	1,44 -1,49	1,46 m	28,69	29,7
9-16	1,23 sl	1,23 s	-	29,68-28,36
17	-	-	31,09	31,9
18	-	-	22,66	22,7
19	0,85 t ($J=6,0$)	0,86 (t $J=6,9$)	13,91	14,2
OH	1,98 m	-	-	-

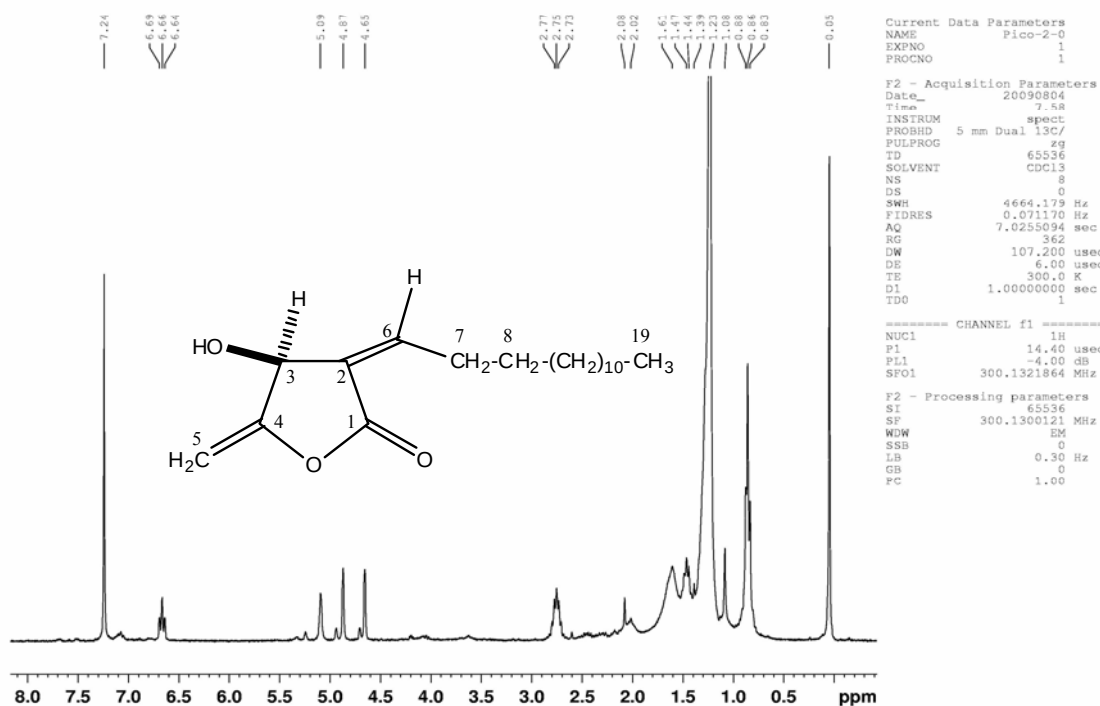


Figura 42 - Espectro de RMN ^1H (300 MHz - CDCl_3) da substância obtusilactona A.

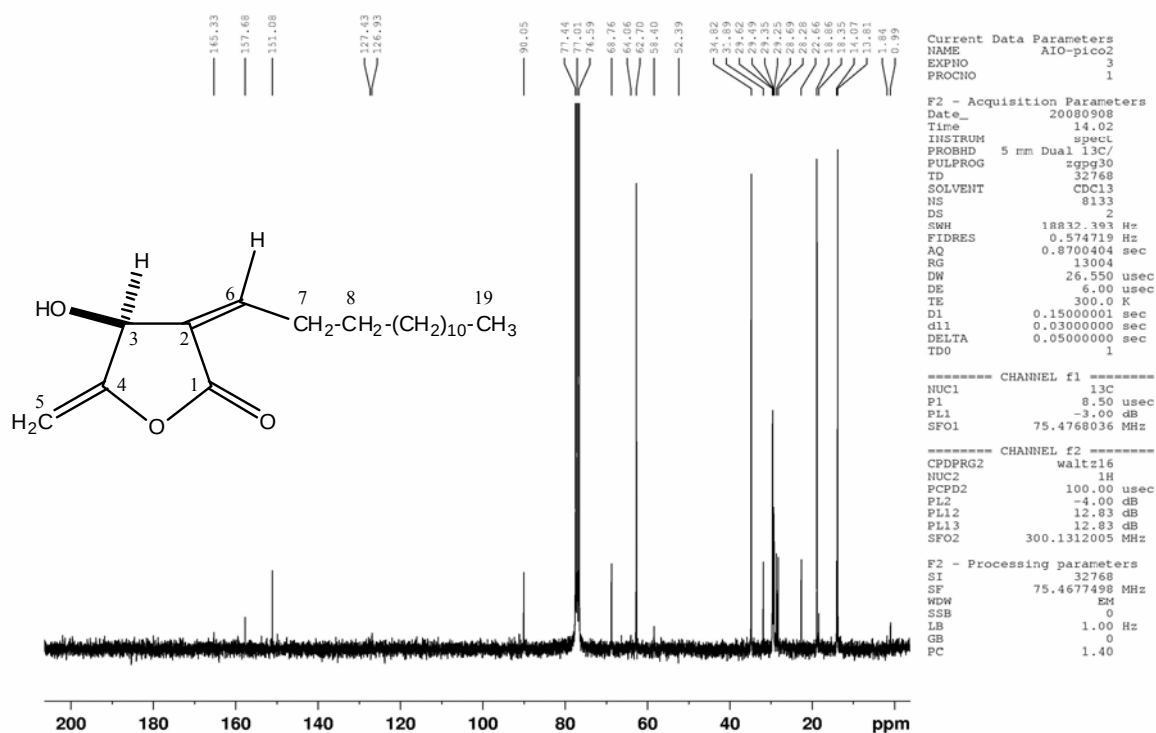


Figura 43 - Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz- CDCl_3) da substância obtusilactona A

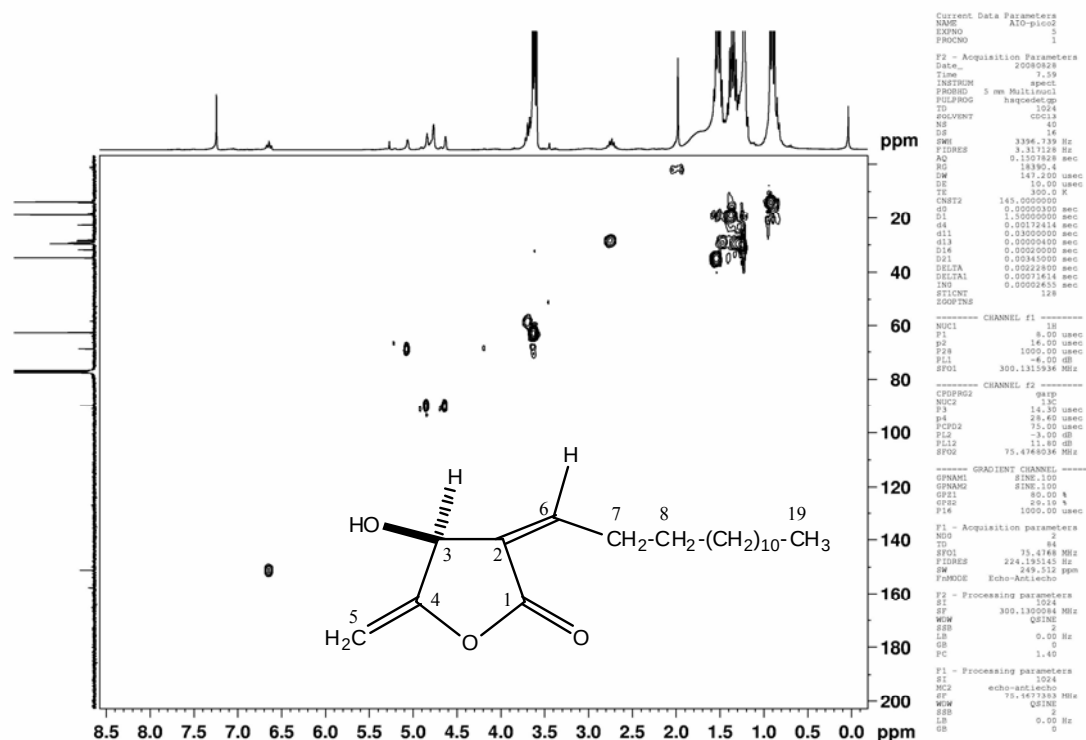


Figura 44 - Espectro HSQC da substância obtusilactona A (300/75 MHz- CDCl₃).

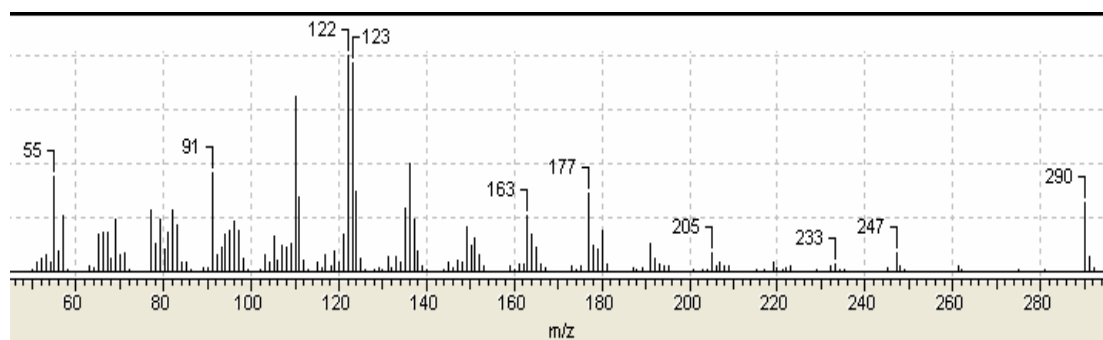


Figura 45 - Espectro de massas por impacto eletrônico da substância obtusilactona A.

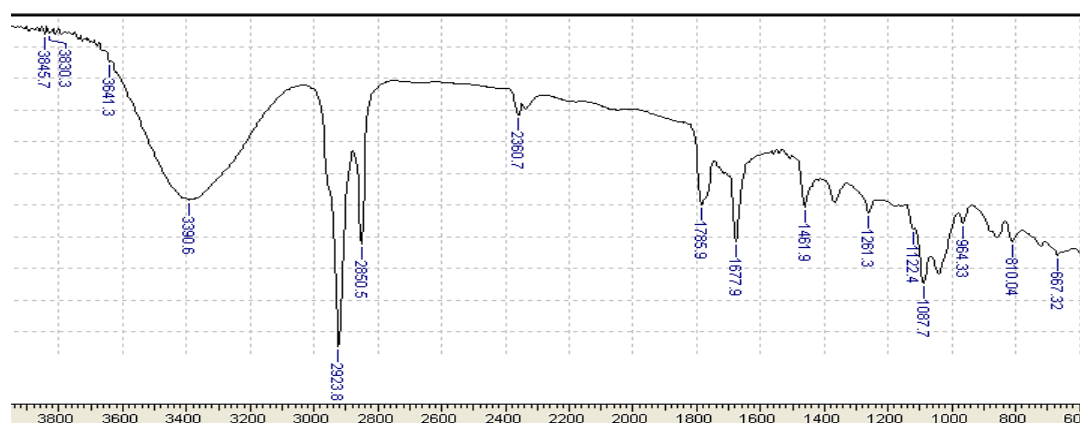


Figura 46 - Espectro na região do infravermelho da substância obtusilactona A em KBr.

5.5 Dados de concentração letal (CL) e “slope” (coeficiente angular) para as larvas de *Ae. Aegypti* (cepa Rockefeller) expostos a temefós, S-dicentrina isoobtusilactona A e obtusilactona A.

Os dados obtidos com os extratos das duas espécies selecionadas mostraram-se satisfatórios visto que muitos estudos (SHARMA, RANGASWAMI e SHARMA, 1978) utilizam para investigação extratos com CL₅₀ bem maiores que 250µg/mL ou estágio larval mais susceptível.

A substância S-dicentrina foi isolada anteriormente de outras espécies do gênero *Ocotea* (CAVA et al., 1968; VECCHIETTI et al., 1977, 1979; GARCEZ, YOSHIDA e GOTTLIEB, 1995), mas não há relatos de bioensaio com larvas *Ae. aegypti*.

Existe apenas um relato na literatura (RATNAYAKE et al., 2001) sobre atividade inseticida de butanolídeos, mas com estruturas diferentes das encontradas em *A. trinervis*.

Os valores de coeficiente angular “slope” obtidos pela análise da curva de mortalidade (Tabela 17) indicam que as substâncias avaliadas apresentam maior heterogeneidade que o inseticida temefós para a cepa Rockefeller.

Tabela 17 - Dados de concentração letal (CL) e slope (coeficiente angular) para as larvas de *Ae. Aegypti* (cepa Rockefeller) expostos a temefós, S-dicentrina isoobtusilactona A e obtusilactona A. As concentrações estão indicadas em µg/mL.

Substâncias	CL ₅₀	CL ₉₀	SLOPE
Temefós	0,0094	0,0175	7,68±0,43
S-dicentrina	30,0222	50,4048	6,27±1,40
Isoobtusilactona A	3,1979	9,4087	2,73±0,24
Obtusilactona A	0,4978	1,6783	2,43±0,60

O gráfico mortalidade em log-probit para a população Rockefeller com Temefós e substâncias isoladas (Figura 47) expressam mais claramente os valores das concentrações utilizadas para o bioensaio com larvas. Quanto mais distante (à direita) da curva de Rockefeller, maior é a concentração das substâncias a ser utilizada para mortalidade das larvas. A substância S-dicentrina é a mais distante da curva de Rockefeller em relação às outras substâncias testadas, portanto, é a substância menos ativa em relação às outras substâncias (isoobtusilactona A e obtusilactona A).

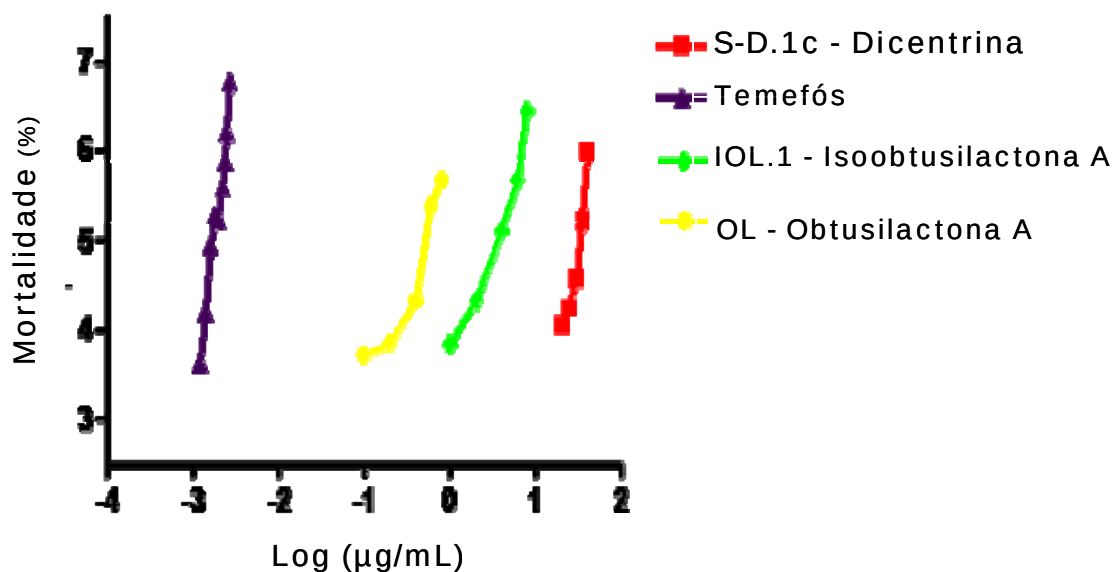


Figura 47 - Comparação das concentrações utilizadas para mortalidade das larvas entre o larvicida temefós e substâncias isoladas S-dicentrina, obtusilactona A e obtusilactona A. Curvas de regressão linear. Dose-log (µg/mL).

As substâncias isoladas S-dicentrina, isoobtusilactona A e obtusilactona A podem ser úteis para controlar populações larvas *Ae. aegypti*. No entanto, novas investigações para o modo de ação do inseticida, os seus efeitos nos organismos não-alvo, modificações estruturais, avaliação de campo, para o ambiente, potência e estabilidade são necessários para a sua utilização na prática como um agente natural de controle de larvas do mosquito.

5.6 Hipóteses para o mecanismo de ação das substâncias isoladas

Embora existam muitos relatos na literatura (IOSET et al., 2001; RATNAYAKE et al., 2001; HO et al., 2003; JANG, JEON e LEE, 2005; YENESEW et al., 2006; GERIS et al., 2008a;) mostrando a atividade inseticida de metabólitos secundários, poucos discutem a relação estrutura / atividade biológica de seus constituintes. Os inseticidas organonaturais ou botânicos que foram utilizados no passado como as piretrinas provenientes de *Chrysanthemum cinerariaefolium*, causavam nas larvas depressão e paralisia do sistema nervoso vegetativo (DEWICK, 1997).

Estudo realizado com a isoobtusilactona A (GARCEZ, 2005) com o ensaio Cometa e o teste SMART sugere atividade genotóxica e citotóxica. De acordo com Liu et al.(2008), as

lactonas levam a apoptose, morte celular programada. A atividade larvícida para as lactonas (isoobtusilactona A e obtusilactona A), provavelmente está relacionada com eventos genotóxicos e de indução de apoptose. Considerando que as larvas estão em crescimento, através do processo de divisão celular (mitose), compostos que interferem com os processos de divisão celular, podem impedir o desenvolvimento do inseto.

O alcaloide S-dicentrina também apresentou atividade larvícida e uma hipótese para explicar o mecanismo de ação pode estar relacionada com a inibição das enzimas Topoisomerase I e II, favorecendo eventos recombinacionais e genotóxicos. Verificou-se que a S-dicentrina atua como agente intercalante, uma vez que apresenta uma conformação planar, ideal para se ligar entre as fitas de DNA (WOO et al., 1997, 1999). A S-dicentrina comprovadamente inibe a enzima topoisomerase II, sendo, portanto, genotóxica (HOET et al., 2004). Este fato é compatível com a atividade recombinogênica observada para a S-dicentrina com o SMART. Portanto, a S-dicentrina, favorece os eventos genotóxicos e recombinacionais, impedindo as divisões celulares durante o desenvolvimento da larva.

6 CONCLUSÃO

- Foi avaliada a ação larvícida de 50 extratos vegetais sobre larvas de 3º estágio larval de *Ae. aegypti*, em condições de laboratório;
- Os dados obtidos para o ensaio com larvas revelaram que 82 % dos extratos brutos (41 extratos) testados foram inativos;
- Dentre os extratos testados, a casca do caule de *Ocotea velloziana* e os frutos de *Aiouea trinervis* foram selecionados para o estudo por apresentarem CL₅₀ significativas;
- Foram isolados da casca do caule de *Ocotea velloziana* S-dicentrina e dos frutos de *Aiouea trinervis* isoobtusilactona A e obtusilactona A as quais apresentaram atividades larvicidas promissoras;
- São relatadas pela primeira vez as atividades larvicidas das substâncias S-dicentrina, isoobtusilactona A e obtusilactona A.

REFERÊNCIAS

- Abdul RA, Gopalakrishnan G, Venkatesan P, Geetha K. Isolation and identification of mosquito larvicidal compound from *Abutilon indicum* (Linn.) Sweet. *Parasitology Research*. 2008; 102(5): 981-988.
- Adámoli J. O Pantanal e suas relações fitogeográficas com os cerrados. Discussão sobre o conceito de “Complexo do Pantanal”. In: *Anais do 32º Congresso Nacional de Botânica Sociedade Brasileira de Botânica*. Teresina-Piauí, Brasil, SBB. 1981; 109-119.
- Anderson JE, Ma W, Smith DL, Chang CJ, McLaughlin JL. Biologically active γ -lactones and methylketoalkenes from *Lindera benzoin*. *Journal Natural Product*. 1992; 55(1): 71-83.
- Arriaga AMC, Feitosa EMA, Lemos TLG, Santiago GMP, Lima JQ, Oliveira de MCF, Vasconcelos JN, Rodrigues FEA, Gomes TBM, Braz-Filho R. Chemical constituents and insecticidal activity of *Rollinia leptopetala* (Annonaceae). *Natural Product Communications*. 2008; 3(10): 1687-1688.
- Asencio M, Guzmán CH, López JJ, Cassels BK, Protais P, Chagraoui A. Structure–affinity relationships of halogenated predicine and glaucine derivatives at D1 and D2 dopaminergic receptors: halogenation and D1 receptor selectivity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2005; 13(11): 3699-3704.
- Badii MH e Almanza VG. Resistencia en insectos, plantas y microorganismos. *Cultura Científica y Tecnológica*. 2007; 4(18): 9-25.
- Baitello JB, Wanderley MGL, Shepherd GJ, Giulietti AM, Melhem TS. Lauraceae. In: *Flora fanerogâmica do Estado de São Paulo FAPESP/RiMa*, São Paulo. 2003; 3: 149-223.
- Baitello JB. Novas espécies de Lauraceae para a Flora Brasileira. *Acta Botanica Brasílica*. 2001; 15(3): 445-450.
- Bancroft TL. On the etiology of dengue fever. *Australasian Medical Gazette*. 1906; 25: 17-18.
- Barreiros ML, David JP, David JM, Xavier LLM, Sá de MS, Costa JFO, Almeida MZ, Queiroz de LP, Sant'ana AEG. Ryanodane diterpenes from two *Erythroxylum* species. *Phytochemistry*. 2007; 68(13): 1735-1739.
- Base de dados CNIP (Checklist das Plantas do Nordeste) [acesso em: 09 de abril 2009]. Disponível em: <http://umbuzeiro.cnip.org.br/db/inalex.html>.
- Base de Dados Tropical, BDT (Lista da flora ameaçada de extinção no Brasil-Flora do Cerrado do Estado de São Paulo) [acesso em: 27 maio 2009]. Disponível em: <http://www.bdt.fat.org.br/index>.
- Becker N, Zgomba M, Ludwig M, Petric D, Rettich F. Factors influencing the activity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* treatments. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 1992; 8(3): 285-289.

Becker N. Bacterial control of vector-mosquitoes and black flies. In: Charles JF, Delécluse A, LeRoux CN. Entomopathogenic bacteria: from Laboratory to Field Application. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. 2000; 383-398.

Bell, EA and Charlwood BV. Secondary Plant Products. Encyclopedia of Plant Physiology Springer Verlag, Berlin, 1980; v.8.

Bisset JA. Uso correcto de insecticidas: control de la resistencia. Revista Cubana de Medicina Tropical. 2002; 54(3): 202-219.

Borlaug NE. Feeding a world of 10 billion people: the miracle ahead. In: R. Bailey. Global warming and other eco-myths. Competitive Enterprise Institute, Roseville, EUA. 2002; 29-60.

Braga IA e Valle D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. Epidemiologia e Serviços de Saúde. 2007; 16(4): 279-293.

Braz-Filho R. Química de produtos naturais: importância, interdisciplinaridade, dificuldades e perspectivas. A peregrinação de um Pacatubano. Química Nova. 1994;17: 405-445.

Brogdon WG e Mcallister JC. Insecticide resistance and vector control. Emerging Infectious Diseases. 1998; 4(4): 605-613.

Carvalho PER. Espécies Arbóreas Brasileiras. In: Embrapa Informação Tecnológica: Brasília. Editora Colombo. 2003; v.1: 318.

Casida JE e Quistad GB. Golden age of insecticide research: past, present, or future? Annual Review of Entomology. 1998; 43(1): 1-16.

Castro MG, Nogueira RMR, Schatzmayr HG, Miagostovich MP, Oliveira de RL. Dengue virus detection by using reverse transcriptionpolymerase chain reaction in saliva and progeny of experimentally infected *Aedes albopictus* from Brazil. Memórias do Insituto Oswaldo Cruz. 2004; 99(8): 809-814.

Cava MP, Watanabe Y, Bessho K, Mitchell MJ, Rocha da AI. *Ocotea* alkaloids: the characterization and structures of four new aporphine bases. Tetrahedron Letters. 1968; 20(9): 2437-2442.

Chambers JE e Carr RL. Biochemical mechanisms contributing to species differences. In: insecticidal toxicity. Toxicology. 1995; 105(2-3): 291-304.

Chen CY, Liu TZ, Chen CH, Wu CC, Cheng JT, Yiin SJ, Shih MK, Wu MJ, Chern C L. Isoobtusilactone A-induced apoptosis in human hepatoma Hep G2 cells is mediated via increased NADPH oxidase-derived reactive oxygen species (ROS) production and the mitochondria-associated apoptotic mechanisms. Food and Chemical Toxicology. 2007; 45(7): 1268-1276.

Chen KS, Wu YC, Teng CM. Ko FN, Wu TS. Bioactive Alkaloids from *Illigera luzonensis*. Journal of Natural Products. 1997; 60(6): 645-647.

Cheng HI, Lin WY, Duh CY, Lee KH, Tsai IL, Chen IS. New cytotoxic butanolides from *Litsea acutivena*. Journal of Natural Products. 2001; 64(12): 1502-1505.

Cheng SS, Chang HT, Chang ST, Tsai KH, Chen WJ. Bioactivity of selected plant essential oils against the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* larvae. *Bioresource Technology*. 2003; 89(1): 99-102.

Cheng SS, Huang C, Chen WJ, Kuo YH, Chang ST. Larvicidal activity of tectoquinone isolated from red heartwood-type *Cryptomeria japonica* against two mosquito species. *Bioresource Technology*. 2008; 99(9): 3617-3622.

Christophers SR. *Aedes aegypti* (L.) The yellow fever mosquito. Its life history, bionomics and structure. *Science*. 1960; 6-35.

Cohen E. Chitin synthesis and inhibition: a revisit. *Pest Management Science*. 2001; 57(10): 946-950.

Consoli R e Lourenço-de-Oliveira R. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Editora Fiocruz, Rio de Janeiro. 1994; 225.

Corbett JR, Wright K e Baille AC. The Biochemical Mode of Action of Pesticides. 2nd ed., Academic Press: New York. 1984; 382.

Correia MP. Dicionário das Plantas Úteis do Brasil. Rio de Janeiro. Imprensa Nacional. 1926; v.1: 48 e 86.

Croteau R, Kutchan T M & Lewis NG. Natural products (secondary metabolites). In: Buchanan, Biochemistry & Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Biologists. 2000; 1250-1318.

David JP, Strode C, Vontas J, Nikou D, Vaughan A, Pignatelli PM, Louis C, Hemingway J, Ranson H. The *Anopheles gambiae* detoxification chip: a highly specific microarray to study metabolic-based insecticide resistance in malaria vectors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005; 102(11): 4080-4084.

Delécluse A, Pérez VJ e Berry C. Vector-active toxins: structure and diversity. In: Charles JF, Delécluse A, LeRoux CN. Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application. Hardcover: Kluwer Academic Publishers. 2000; 101-126.

Dewick PM. Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach. England-1rd ed. John Wiley & Sons Ltd. 1997; 5-6.

Dietze R. Doenças infecciosas e parasitárias. Dengue. In: Veronesi. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan. 1991; 183-188.

Donalísio MR e Glasser CM. Vigilância entomológica e controle de vetores do dengue. *Revista Brasileira de Epidemiologia*. 2002; 5(3): 259-272.

Eisler R. Diflubenzuron Hazendis to Fish, Wildlife, and Invertebrates: A. Synoptic Review. *Biological Report-Contaminant Hazard. Review-Report 25*. 1992; 4(1): 2-48.

Eiten G. Delimitação do conceito de Cerrado. *Arquivos do Jardim Botânico*. Rio de Janeiro. 1977; 125-134.

Figueiredo LTM e Fonseca BAL. Tratado de Infectologia. Rio de Janeiro. Dengue. In: Veronesi. Editora Atheneu. 2002; 204-217.

Finney D. Probit Analysis: a statistical treatment of the sigmoid response curve. University Press, Cambridge. 1974; 50-55.

Floore TG. Mosquito larval control practice: past and present. Journal of the American Mosquito Control Association. 2006; 22(3): 527-533.

Forattini OP. Culicidologia Médica. Identificação, Biologia, Epidemiologia. Editora da Universidade de São Paulo. São Paulo. 2002; v.2: 860.

Forattini OP. Identificação de *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse) no Brasil. Revista de Saúde Pública. 1986; 20(3): 244-245.

Fournet F, Sannier C e Monteny N. Effects of the insect growth regulators OMS 2017 and diflubenzuron on the reproductive potential of *Aedes aegypti*. Journal of the American Mosquito Control Association. 1993; 9(4): 426-430.

Fournier DE e Mutero A. Levels of total acetylcholinesterase in *Drosophila melanogaster*. In: Relation to Insecticide Resistance. Pesticide Biochemistry and Physiology. 2001; 70(2): 100-107.

Gadelha DP e Toda AT. Biologia e comportamento do *Aedes aegypti*. Revista Brasileira de Malariologia e doenças tropicais. 1985; 37: 29-36.

Garcez FR, Garcez WS, Martins M, Matos MF, Guterres ZR, Mantovani MS, Misu CK, Nakashita ST. Cytotoxic and genotoxic butanolides and lignans from *Aiouea trinervis*. Planta Medica. 2005; 71(10): 923-927.

Garcez WS, Yoshida M e Gottlieb OR. Benzylisoquinoline alkaloids and flavonols from *Ocotea velloziana*. Phytochemistry. 1995; 39(4): 815-816.

Garcez WS. Constituintes químicos de *Ocotea velloziana* (Meissn.) Mez, Lauraceae [Tese]. São Paulo: Instituto de Química, USP. 1991.

Geris R, Silva da IG, Silva da HHG, Barison A, Rodrigues Filho E, Ferreira AG. Diterpenoids from *Copaifera reticulata* Ducke with larvicidal activity against *Aedes aegypti* (L.) (Diptera, Culicidae). Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. 2008a; 50(1): 25-28.

Geris R. Rodrigues FE, Silva da Silva GHG, Silva da G. Larvicidal effects of fungal meroterpenoids in the control of *Aedes aegypti* L., the main vector of dengue and yellow fever. Chemistry & Biodiversity. 2008b; 5(2): 341-345.

Graf JF. The role of insect growth regulators in arthropod control. Parasitology Today. 1993; 9(12): 471-474.

Gregson A e Edelman R. Dengue virus infection. The Pediatric Infectious Disease Journal. 2003; 22(2): 179-181.

Grosscurt AC, Haar MT, Jongsma B, Stoker A. Ph 70-23: A new acaricide and insecticide interfering with chitin deposition. *Pesticide Science*. 1988; 22(1): 51-59.

Gubler DJ. Current research on dengue. *Current Topics in Vector Research*. Springer-Verlag. 1987; 37-59.

Gubler DJ. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21 st century. *Trends in Microbiology*. 2002; 10(2): 100-103.

Guzmán MG e Kourí G. Dengue: an update. *The Lancet of Infectious Diseases*. 2002; 2(1): 33-42.

Guzmán MG. Avances para la obtención de una vacuna contra el dengue. *Acta Científica Venezolana*. 1988; 49 Supl.1: 38-45.

Halstead SB. Etiologies of the experimental dengues of Siler and Simmons. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1974; 23(5): 974-982.

Harris E, Videa E, Perez L, Sandoval E, Tellez Y, Perez ML, Cuadra R. A clinical, epidemiologic, and virologic features of dengue in the 1998 epidemic in Nicaragua. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2001; 63(1-2): 5-11.

Hartberg WK e Craig-Jr GB. Reproductive isolation in *Stegomyia* mosquitos. II Hybrid breakdown between *Aedes aegypti* and *A.mascarensis*. *Evolution*. 1970; 24: 692-703.

Hemingway J. e Ranson H. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annual Review Entomology*. 2000; 45: 371-391.

Ho SH, Wang J, Sim KY, Ee GCL, Imiyabir Z, Yap KF, Shaari K, Goh S. Meliternatin: a feeding deterrent and larvicidal polyoxygenated flavone from *Melicope subunifoliolata*. *Phytochemistry*. 2003; 62(7): 1121-1124.

Hoet S, Stévigny C, Block S, Colson, P, Baldeyrou B, Lansiaux A. Alkaloids from *Cassytha filiformis* and related aporphines: Antitrypanosomal activity, cytotoxicity, and interaction with DNA and topoisomerases. *Planta Medica*. 2004; 70(5):407-413.

Huang RL, Chen CC, Huang YL, Ou JC, Hu C, Chen CF, Chang C. Anti-tumor effects of d-dicentrine from the root of *Lindera megaphylla*. *Planta Medica*. 1998; 64(3): 212-215.

Ibañez-Bernal S, Briseno B, Mutebi JP, Argot E, Rodriguez G, Martinez CC, Paz R. De la Fuente-San Roman P, Tapia-Conyer R, Flisser A. First record in America of *Aedes albopictus* naturally infected with dengue virus during the 1995 outbreak at Reynosa, Mexico. *Medical and Veterinary Entomology*. 1997; 11(4): 305-309.

Indra B, Matsunaga K, Hoshini O, Suzuki M, Ogasawara H, Ohizumi Y. Structure-activity relationship studies with (±)-nantenine derivatives for α 1-adrenoceptor antagonist activity. *European Journal of Pharmacology*. 2002; 437(3): 173-178.

Ioset JR, Marston A, Gupta MP, Hostettmann K. Antifungal and larvicidal cordiaquinones from the roots of *Cordia curassavica*. *Phytochemistry*. 2000b; 53(5): 613-617.

Ioset JR, Marston A, Gupta MP, Hostettmann K. Antifungal and larvicidal compounds from the root bark of *Cordia alliodora*. *Journal of Natural Products*. 2000a; 63(3): 424-426.

Ioset JR, Marston A, Gupta MP, Hostettmann K. Five new prenylated stilbenes from the root bark of *Lonchocarpus chiricanus*. *Journal of Natural Products*. 2001; 64(6): 710-715.

Ioset JR, Marston A, Gupta MP, Hostettmann, K. Antifungal and larvicidal meroterpenoid naphthoquinones and a naphthoxirene from the roots of *Cordia linnaei*. *Phytochemistry*. 1998; 47(5): 729-734.

Jamal AG, Hansen S e Julu POO. Low level exposures to organophosphorus esters may cause neurotoxicity. *Toxicology*. 2002; 181-182: 23-33.

Jang YS, Jeon JH e Lee, H S. Mosquito larvicidal activity of active constituent derived from *Chamaecyparis obtusa* leaves against 3 mosquito species. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 2005; 21(4): 400-403.

Jokanovic M. Biotransformation of organophosphorus compounds. *Toxicology*. 2001; 166(3): 139-160.

Jondiko IJO. A mosquito larvicide in *Spilanthes mauritiana*. *Phytochemistry*. 1986; 25(10): 2289-2290.

Karczmar A. Invited review anticholinesterases: dramatic aspects of their use and misuse. *Neurochemistry International*. 1998; 32(5,1): 401-411.

Karunaratne SHPP e Hemingway J. Malation resistance and prevalence of the malathion carboxylesterase mechanism in populations of mosquito vectors of disease in Sri Lanka. *Bulletin of the World Health Organization*. 2001; 79: 1060-1064.

Katade SR, Pawar PV, Tungikar VB, Tambe AS, Kalal KM, Wakharkar RD, Deshpande NR. Larvicidal activity of bis (2-ethylhexyl) benzene-1, 2-dicarboxylate from *Sterculia guttata* seeds against two mosquito species. *Chemistry & Biodiversity*. 2006; 3(1): 49-53.

Kiprop AK, Kiprono PC, Rajab MS, Kosgei MK. Limonoids as larvicidal components against mosquito larvae (*Aedes aegypti* Linn.). *Journal of Biosciences*. 2007; 62(11-12): 826-828.

Kiprop AK, Rajab MS e Wanjala FME. Isolation and characterization of larvicidal components against mosquito larvae (*Aedes aegypti* Linn.) from *Calodendrum capense* Thunb. *Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia*. 2005; 19(1): 145-148.

Kostyukovsky M e Trostanetsky A. The effect of a new chitin synthesis inhibitor, novaluron, on various developmental stages of *Tribolium castaneum* (Herbst). *Journal of Stored Products Research*. 2006; 42(2): 136-148.

Kubitzki K e Renner S. Lauraceae: *Aniba* and *Aiouea*. *Flora Neotropica Monograph*. The New York Botanical Garden Press. 1982; 31: 85-124.

Kuno G. Factors influencing the transmission of dengue viruses. In: Gubler DJ, Kuno G (ed.) *Dengue and dengue hemorrhagic fever*. Cab International, London. 1997; 478.

Kuno G. Review of the factors modulating dengue transmission. *Epidemiologic reviews*. 1995;17(2): 321-335.

Kuo PL, Chen CY e Hsu YL. Isoobtusilactone A Induces Cell Cycle Arrest and Apoptosis through Reactive Oxygen Species/Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1 Signaling Pathway in Human Breast Cancer Cells. *Cancer Research*. 2007; 67(15): 7406-7420.

Lefevre AMC, Lefevre F, Scandar SAS, Yasumaro S, Sampaio, SMP. Representações dos agentes de combate ao *Aedes aegypti* sobre a estratégia de retirada do inseticida nas ações de controle do vetor. *Revista Brasileira de Epidemiologia*. 2003; 6(4): 359-372.

Lindbäck H, Lindbäck J, Tegnell A, Janzon R, Vene S, Ekdahl K. Dengue fever in travelers to the tropics, 1998 and 1999. *Emerging Infections Diseases*. 2003; 9(4): 438-442.

Liu TZ, Cheng JT, Yiin SJ, Chen CY, Chen CH, Wu MJ, Chern CL. Isoobtusilactone A induces both caspase-dependent and -independent apoptosis in Hep G2 cells. *Food and Chemical Toxicology*. 2008; 46(1): 321-327.

Lorenzi H. Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. São Paulo. Editora Plantarum. 2002; 143-144.

Lourenço-de-Oliveira R, Vazeille M, de Filippis AMB, Failloux AB. Large genetic differentiation and low variation in vector competence for dengue and yellow fever viruses of *Aedes albopictus* from Brazil, the United States, and the Cayman Islands. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2003; 69(1): 105-114.

Lourenço-de-Oliveira R. Principais Insetos vetores e Mecanismos de Transmissão das Doenças Infecciosas e Parasitárias. In: Coura JR. (Org.). *Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan. 2005; 2096.

Lozovei AL. Culicídeos (mosquitos). In: Marcondes CB, *Entomologia Médica e Veterinária*. Editora Atheneu, São Paulo. 2001.

Luna JED, Martins MF, Anjos dos AF, Kuwabara EF, Navarro-Silva MA. Susceptibility of *Aedes aegypti* to temephos and cypermethrin insecticides, Brazil. *Revista de Saúde Pública* 2004; 38(6): 842-843.

Macoris MLG, Angrighetti MTM, Glasser CM, Garbeloti VC, Cirino VCB. Alteração da resposta de suscetibilidade de *Aedes aegypti* a inseticidas organofosforados em municípios do Estado de São Paulo, Brasil. *Revista de Saúde Pública*. 1999; 33(5): 521-522.

Madriñán S. *Rhodostemonodaphne* (Lauraceae), *Flora Neotropica*, Monograph 92. New York, New York Botanical Garden, 2004; 102.

Mann J, Davidson RS, Hobs JB, Banthorpe DV, Harborne JB. *Natural Products: their Chemistry and Biological Significance*. New York-USA. Logman Scientific & Technical. 1994; 6-7.

Marcondes CB, *Entomologia Médica e Veterinária*, Editora Atheneu, São Paulo. 2001: 432.

Marques CA. Importância econômica da família Lauraceae Lindl. *Revista Floresta e Ambiente*. 2001; 8(1): 195-206.

Marston A, Hostettmann K e Msonthi JD. Isolation of antifungal and larvicidal constituents of *Diplolophium buchanani* by centrifugal partition chromatography. *Journal of Natural Products*. 1995; 58(1): 128-130.

Martins M. Estudo químico da raiz, caule subterrâneo e folhas de *Aiouea trinervis* [Dissertação]. Campo Grande: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul; 2004.

Matuo YK, Lopes JNC e Casanova IC. Praguicidas Organoclorados no leite humano. Estudo em um grupo de trabalhadoras rurais do município de Jaboticabal, Estado de São Paulo, Brasil. *Revista Brasileira de Saúde Ocupacional*. 1990; 18(69): 27-32.

McLaughlin JL . Crown gall tumours on potato disc and brine shrimp lethality: two simple bioassays for higher plant screening and fractionation in methods in plant biochemistry. London: Ed. K. Hostettmann. 1991; 1-32.

Mellon RB e Georgiou GP. Rotational use of insecticides in mosquito control programs. *Proceedings and papers of the fifty-second annual Conference of the California and Vector Control Association*. 1984; 52: 65-67.

Michael AS, Thompson CG e Abramovitz M. *Artemia salina* as a test organism for bioassay. *Science*. 1956; 123(3194): 464.

Miller JG e Ballinger ME. *Aedes albopictus* mosquitoes introduced into Brazil: vector competence for yellow fever and dengue viruses. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1988; 82(3): 476-477.

Miller TA . Mechanisms of resistance to pyrethroid insecticides. *Parasitology Today*. 1988; 4(7): 13-15.

Monath TP. Pathology of the Flaviviruses. In: Schlesinger S. & Schlesinger M. The Togaviridae and Flaviviridae. New York, Plenum. 1986; 375-424.

Mongelli E. Coussio J. Ciccio G. Investigation of the larvicidal activity of *Pothomorphe peltata* and isolation of the active constituent. *Phytotherapy Research*. 2002; 16(S1): 71-72 .

Moraes PLR. Sinopse das Lauraceas nos Estados de Goiás e Tocantins, Brasil. *Biota Neotropica*. 2005; 5(2): 253-270.

Morteza SK, Amin G, Shidfar MR, Hadizadeh H, Shafiee, A. Antifungal activity of the methanolic extract and alkaloids of *Glaucium oxylobum*. *Fitoterapia*. 2003; 74(5):493-496.

Mwangi RW, Rembold H. Growth-inhibiting and larvicidal effects of *Melia volkensii* extracts on *Aedes aegypti* larvae. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 1988; 46(2): 103-108.

Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, Fonseca da GAB, Kent J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*. 2000; 403: 853-858.

Nath BS e Kumar RPS. Toxic impact of organophosphorus insecticides on acetylcholinesterase activity in the silkworm, *Bombyx mori* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 1999; 42(2): 157-162.

Nelson MJ. *Aedes aegypti*: biología y ecología. Washington, DC, Organización Panamericana de la Salud. 1986.

Neves M, Morais R, Gafner S, Stoeckli EH, Hostettmann K. New sesquiterpene lactones from the portuguese liverwort *Targionia lorbeeriana*. *Phytochemistry*. 1999; 50(6): 967-972.

Obeta JA. Effect of inactivation by sunlight on the larvicidal activities of mosquitocidal *Bacillus thuringiensis* H-14 isolates from nigerian soils. *Journal of Communicable Diseases*. 1996; 28(2): 94-100.

Oliveira de PES, Conserva LM, Brito AC, Lemos RPL. Coumarin derivatives from *Esenbeckia grandiflora* and its larvicidal activity against *Aedes aegypti*. *Pharmaceutical Biology*. 2005; 43(1): 53-57.

Olson D, Dinerstein E, Canevari P, Davidson I, Castro G, Morisset V, Abell R, e Toledo E. Freshwater biodiversity of Latin America and the Caribbean: a conservation assessment. Biodiversity Support Program, World Wildlife Fund, Washington, D.C. 1998; 17-20.

Omena de MC, Bento ES, Paula de JE, Sant'ana AEG. Larvicidal diterpenes from *Pterodon polygalaeflorus*. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*. 2006; 6(2): 216-222.

Oppenoorth FJ. Biochemistry of insecticide resistance. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 1984; 22(2): 187-193.

Organização Panamericana da Saúde. Implementação do controle seletivo de vetores da Malária na Região Amazônica. Brasília: OPAS. 1997.

Organización Mundial de la Salud. Serie de Informes Técnicos, Resistencia de los vectores y reservorios de enfermedades a los plaguicidas (10º Informe del Comité de Expertos de la OMS en Biología de los Vectores y Lucha Antivectorial): OMS. 1986.

Organización Mundial de la Salud. Serie de Informes Técnicos. Resistencia de vectores de enfermedades a los plaguicidas (15º Informe del Comité de Expertos de la OMS en Biología de los Vectores y Lucha Antivectorial): OMS, nº 818. 1992.

Organización Panamericana de la Salud. Control selectivo de vectores de malaria: guía para el nivel local de los sistemas de salud. Washington, DC: OPS. 1999.

Organización Panamericana de la Salud. Dengue y dengue hemorrágico en las Américas: guías para su prevención y control. Washington, DC: OPS. 1995.

Organización Panamericana de la Salud. Selective Control of Malaria Vectors - a Guide for the Municipal Level. Brasília: Funasa. 1999.

Padilha S, Wilson VZ & Bushnell PJ. Toxicology. Studies on the correlation between blood cholinesterase inhibition and 'target tissue' inhibition in pesticide-treated rats. *Toxicology*. 1994; 92(1-3): 11-25.

Pan American Health Organization – PAHO. Number of Reported Cases of Dengue & Dengue Hemorrhagic Fever (DHF), Region of the Americas (by country and subregion).

Washington; 2004. Disponível em: <http://www.paho.org/english>. Acesso em: 29 de outubro 2008.

Park IK, Lee SG, Shin SC, Park JD, Ahn YJ. Larvicidal activity of isobutylamides identified in *Piper nigrum* fruits against three mosquito species. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2002; 50(7): 1866-1870.

Park IK, Shin SC, Kim CS, Lee HJ, Choi WS, Ahn YJ. Larvicidal activity of lignans identified in *Phryma leptostachya* var. asiatica roots against three mosquito species. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2005; 53(4): 969-972.

Paul A, Harrington LC e Scott JG. Evaluation of novel insecticides for control of dengue vector *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Journal of Medical Entomology. 2006; 43(1): 55-60.

Polanczyk RA, Garcia MO e Alves SB. Potencial de *Bacillus thuringiensis israelensis* Berliner no controle de *Aedes aegypti*. Revista de Saúde Pública. 2003; 37(6): 813-816.

Pott A & Adámoli J. Unidades de vegetação do Pantanal dos Paiaguás. In: II Simpósio sobre Recursos Naturais e Sócio-econômicos do Pantanal: Manejo e Conservação. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Pantanal), Corumbá, Brasil. 1999; 183-202.

Pugachev KV, Guirakhoo F, Trent DW, Monath TP. Traditional and novel approaches to flavivirus vaccines. International Journal for Parasitology. 2003; 33(5): 567-582.

Qureshi SA, Mohiuddin SFB, Badar Y. Laboratory studies on some plant extracts as mosquito larvicides. Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research. 1986; 29(5): 361-365.

Rahuman AA, Gopalakrishnan G, Venkatesan P, Geetha, K.; Bagavan, A. Mosquito larvicidal activity of isolated compounds from the rhizome of *Zingiber officinale*. Phytotherapy Research. 2008a; 22(8): 1035-1039.

Rahuman AA, Venkatesan P e Gopalakrishnan G. Mosquito larvicidal activity of oleic and linoleic acids isolated from *Citrullus colocynthis* (Linn.) Schrad. Parasitology Research. 2008c; 103(6): 1383-1390.

Rahuman AA, Venkatesan P, Geetha K, Gopalakrishnan G, Bagavan A, Kamara JC. Mosquito larvicidal activity of gluanol acetate, a tetracyclic triterpenes derived from *Ficus racemosa* Linn. Parasitology Research. 2008b; 103(2): 333-339.

Rajkumar S e Jebanesan A. Bioactivity of flavonoid compounds from *Poncirus trifoliata* L. (Family: Rutaceae) against the dengue vector, *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). Parasitology Research. 2008; 104(1): 19-25.

Rathburn Jr CB. Insecticide formulations – types and uses: a review. Journal of American Mosquito Control Association. 1985; 1(1): 80-84.

Ratnayake R, Karunaratne V, Ratnayake BM, Kumar V, Macleod JK, Simmonds P. Two new lactones with mosquito larvicidal activity from three *Hortonia* species. Journal of Natural Products. 2001; 64(3): 376-378.

Regis L, Silva-Filha MH, Nielsen-LeRoux C, Charles JF. Bacteriological larvicides of dipteran disease vectors. *Trends in Parasitology*. 2001; 17(8): 377-80.

Ribeiro JF, Sano SM e Silva JA. Chave preliminar de identificação dos tipos fisionômicos da vegetação do Cerrado. In: *Anais do 32º Congresso Nacional de Botânica*. Sociedade Botânica do Brasil; 1981, Teresina, Brasil, Piauí. SBB 1981; 124-133.

Ribeiro RA, Carmo LG, Vladimirova J, Jurkiewicz NH, Jurkiewicz A. Nantenine blocks muscle contraction and Ca^{2+} transient induced by noradrenaline and K^{+} in rat vas deferens. *European Journal of Pharmacology*. 2003; 470: 37-43.

Rodriguez EC e Finlay CJ. *Obras completas*. La Habana, Cuba: Academia de Ciências de Cuba. 1971; 628.

Rohwer JG. Prodrum einer Monographie der Gattung *Ocotea* Aubl. (Lauraceae), sensu lato. *Mitteilungen aus dem Institut für Allgemeine Botanik Hamburg*. 1986; 20(1): 3-278.

Rose RI. Pesticides and public health: integrated methods of mosquito management. *Emerging Infectious Diseases*. 2001; 7(1): 17-23.

Rosen L. Mechanism of vertical transmission of the dengue virus in mosquitoes. *Comptes rendus de l'Académie des sciences Série III*. 1987; 304(13): 347-350.

Rozendaal JA. Vector control methods for use by individuals and communities. Geneva: World Health Organization. 1997a; 398.

Rozendaal JA. Vector control methods for use by individuals and communities. Geneva: World Health Organization. 1997b; 6-7.

Santiago GM, Viana FA, Pessoa ODL, Santos RP, Pouliquen YBM, Arriaga AMC, Andrade Neto, M, Braz-Filho R. Evaluation of the larvicidal activity of triterpenoid saponins isolated from *Pentaclethra macroloba* (Willd.) Kuntze (Fabaceae) and *Cordia piauhiensis* Fresen (Boraginaceae) against *Aedes aegypti*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2005; 15(3): 187-190.

Sckenkel EP, Gosmann G & Petrovick PR. Produtos de origem vegetal e desenvolvimento de medicamentos. In: *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre/Florianópolis: Editora Universidade/UFRGS. Editora da UFSC. 2000; 301-332.

Secretaria de Vigilância em Saúde – SVS. Departamento de Análise de Situação de Saúde. Dados e indicadores selecionados. Brasília: Ministério da Saúde. 2003.

Serufo SC, Oca HM, Tavares VA, Souza AM, Rosa RV, Jamal MC, Lemos JR, Oliveira MA, Nogueira RMR, Shafieed A. Antifungal activity of the methanolic extract and alkaloids of *Glaucium oxylobum*. *Fitoterapia*. 2003; 74(5): 493–496.

Sharma M, Rangaswami S e Sharma P. Crystalline chemical components of the roots of *Rumex nepalensis* Wall. *Indian Journal of Chemistry, Section B: Organic Chemistry Including Medicinal Chemistry*. 1978; 16B(4): 289-91.

Siddiqui S, Faizi S e Siddiqui BS. Studies on the chemical constituents of *Azadirachta indica* A. Juss (Meliaceae). Part I: Isolation and structure of a new tetranortriterpenoid – nimolicinol. *Heterocycles*. 1984; 22(2): 295-298.

Siddiqui BS, Afshan F, Ghiasuddin FS, Naqvi SNH, Tariq RM. Two insecticidal tetranortriterpenoids from *Azadirachta indica*. *Phytochemistry*. 2000; 53(3): 371-376.

Siddiqui BS, Gulzar T, Mahmood A, Begum S, Khan B, Afshan F. New insecticidal amides from petroleum ether extract of dried *Piper nigrum* L. whole fruits. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. 2004; 52(11): 1349-1352.

Silva HHG, Silva IG e Lira KS. Metodologia de criação, manutenção de adultos e estocagem de ovos de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) em laboratório. *Revista de Patologia Tropical*. 1998; 27(1): 53-63.

Simas NK, Lima EC, Conceição SR, Kuster RM, Martins OF, Alfredo L, Celso LS. Natural products for dengue transmission control larvicidal activity of *Myroxylon balsamum* (Red oil) and of terpenoids and phenylpropanoids. *Química Nova*. 2004; 27(1): 46-49.

Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello de JCP, Mentz LA, Petrovick PR. (org.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre/Florianópolis: Editora Universidade/UFRGS. Editora da UFSC. 2000; 323-354.

Soaeres SS, Carvalho RW, Galhardo-Mella RC, Galardo AKR. Effectivity comparison 2 insecticides abate and altosid in the control of *Aedes aegypti*: Linnaeus 1762. *Parasitologia al dia*. 1996; 20(1/2): 53-58.

Soderlund DM e Knipple DC. The molecular biology of knockdown resistance to pyrethroid insecticides. *Insect biochemistry and molecular biology*. 2003; 33(6): 563-577.

Solis PN, Olmedo D, Nakamura N, Calderon AI, Hattori M, Gupta MP. A new larvicidal lignan from *Piper fimbriatum*. *Pharmaceutical Biology*. 2005; 43(4):378-381.

Soloway SB. Naturally occurring insecticides. *Environmental Health Perspectives*. 1976; 14: 109–117.

Storm JE, Rozman KK e Doull J. Occupational exposure limits for 30 organophosphate pesticides based on inhibition of red blood cell acetylcholinesterase. *Toxicology*. 2000; 150(1-3): 1-29.

Sukumar K, Perich MJ e Boobar LR. Botanical derivatives in mosquito control: a review. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 1991;7(2): 210–237.

Teixeira MG e Barreto ML. Porque devemos, de novo, erradicar *Aedes aegypti*. *Ciência e Saúde Coletiva*. 1996; 1: 122-135.

Teixeira MG, Barreto LM e Guerra Z. Epidemiologia e medidas de prevenção da dengue. *Informe Epidemiológico do SUS*. 1999; 8: 5-33.

Teixeira MG, Costa MCN, Barreto ML, Bareto FR. Epidemiologia do dengue em Salvador Bahia, 1995-1999. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2001; 34(3): 269-274.

Tiew P, Ioset JR, Kokpol U, Chavasiri W, Hostettmann K. Antifungal, antioxidant and larvicidal activities of compounds isolated from the heartwood of *Mansonia gagei*. *Phytotherapy Research*. 2003; 17(2): 190-193.

Tsai IL, Hung CH, Duh CY, Chen IS. Cytotoxic butanolides and secobutanolides from the stem wood of formosan *Lindera communis*. *Planta Medica*. 2002; 68(2): 142-145.

Tunaz H e Uygun N. Insect growth regulators for insect pest control. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*. 2004; 28: 377-387.

Vecchietti V, Casagrande C, Ferrari G, Severini RG. Alkaloids of *Ocotea brachybotra*. II *Farmaco; edizione scientifica*. 1977; 32(11): 767-779.

Vecchietti V, Casagrande C, Ferrari G, Severini RG. New aporphine alkaloids of *Ocotea minarum*. II *Farmaco; edizione scientifica*. 1979; 34(10): 829-840.

Werff Van Der H e Richter HG. Toward an improved classification of Lauraceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. 1996; 83(3): 409-418.

Wink M. Physiology of secondary product formations in plants. In: Charlwood, B.V.; Rhods, M.J.C. (ed.). *Secondary products from plant tissue culture*. Oxford: Clarendon Press. 1990; p. 23.

Woo SH, Reynolds MC, Sun NJ, Cassady JM, Snapku RM. Inhibition of Topoisomerase II by Liriodenine. *Biochemical Pharmacology*. 1997; 54(4): 467-473.

Woo SH, Sun NJ, Cassady JM, Snapka RM. Topoisomerase II inhibition by aporphine alkaloids. *Biochemical Pharmacology*. 1999; 57(10): 1141-1145.

World Health Organization – WHO. *Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment and control*. Geneva: WHO. 1986.

World Health Organization – WHO. *Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides*: WHO-VBC 81.807. 1981; 1-6.

World Health Organization - WHO. *Report of the ninth WHOPES working group meeting*. Library Cataloguing-in-Publication Data, Geneva, Swetzerland. 2006; 96.

Yang YC, Lee SG, Lee HK, Kim MK, Lee SH, Lee HS. A piperidine amide extracted from *Piper longum* L. fruit shows activity against *Aedes aegypti* mosquito larvae. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002; 50(13): 3765-3767.

Yang YC, Lim MY e Lee HS. Emodin isolated from *Cassia obtusifolia* (Leguminosae) seed shows larvicidal activity against three mosquito species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003; 51(26): 7629-7631.

Yenesew A, Derese S, Midiwo JO, Heydenreich M, Peter MG. Effect of rotenoids from the seeds of *Millettia dura* on larvae of *Aedes aegypti*. *Pest Management Science*. 2003; 59(10): 1159-1161.

Yenesew A, Kiplagat JT, Derese S, Midiwo JO, Kabaru JM, Heydenreich M, Peter MG. Two unusual rotenoid derivatives, 7a-O-methyl-12a-hydroxydeguelol and spiro-13-homo-13-oxaelliptone, from the seeds of *Derris trifoliata*. *Phytochemistry*. 2006; 67(10): 988-991.

Yu SJ e Nugyen SN. Detection and biochemical characterization of insecticide resistance in the diamondback moth. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 1992; 44(1): 74-81.

Yu-Tien L, Jiun MS, Dar JD, I-Huan W, Chin CC, Cheng CC. Protection from ultraviolet irradiation by melanin of mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* var. israelensis. *Journal of Invertebrate Pathology*. 1993; 62(2): 131-136.

Zhou BN, Johnson RK, Mattern MR, Wang X, Hecht SM, Beck HT, Ortiz A, Kingston D GI. Isolation and Biochemical Characterization of a New Topoisomerase I Inhibitor from *Ocotea leucoxydon*. *Journal of Natural Products*. 2000; 63(2): 217-221.