

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE *Attalea excelsa* MART.
ex SPRENG. (URUCURI) E *Pterodon emarginatus* Vog. (SUCUPIRA BRANCA)
EM *Aedes aegypti*

DULCINÉIA FURTADO TEIXEIRA

Orientadores: Prof^ª Dr^a Suzana Guimarães Leitão

Prof. Dr. Benjamin Gilbert

Prof. Dr. Alfredo M. de Oliveira Filho

*Tese apresentada como um dos requisitos para a
obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas,
junto à Faculdade de Farmácia da Universidade
Federal do Rio de Janeiro.*

Rio de Janeiro

Agosto 2003

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
FACULDADE DE FARMÁCIA
DEPARTAMENTO DE PRODUTOS NATURAIS E ALIMENTOS

ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE *Attalea
excelsa* MART. ex SPRENG.(URUCURI) E *Pterodon emarginatus*
Vog. (sucupira branca) EM *Aedes aegypti*

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Ricardo Machado Kuster
Núcleo de Pesquisa de Produtos Naturais/UFRJ

Prof. Dr. Sérgio Carvalhaes
Instituto de Química/UFRJ

Prof. Dr. Hélio de Mattos Alves
Faculdade de Farmácia/UFRJ

Prof. Dr. Joaquim Fernando Mendes da Silva (Suplente)
Instituto de Química/UFRJ

FICHA CATALOGRÁFICA

TEIXEIRA, DULCINÉIA FURTADO

ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE *Attalea excelsa* MART. ex SPRENG.(URUCURI) E *Pterodon emarginatus* Vog. (SUCUPIRA BRANCA) EM *Aedes aegypti*

Rio de Janeiro, FF-UFRJ, Agosto, 2003, 124 p.

Tese: Mestre em Ciências Farmacêuticas/Faculdade de Farmácia

I - Universidade Federal do Rio de Janeiro

II - Título

Palavras-Chaves

- | | |
|---------------------------|--------------------------------|
| 1. Arecaceae | 4. <i>Pterodon emarginatus</i> |
| 2. <i>Attalea excelsa</i> | 5. Repelentes |
| 3. Leguminosae-Fabaceae | 6. <i>Aedes aegypti</i> |

Este trabalho foi realizado sob a orientação da Profa. Dra. Suzana Guimarães Leitão do DPNA, Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro; Dr. Benjamin Gilbert, Far-Manguinhos, Fundação Oswaldo Cruz e Prof. Dr. Alfredo Martins de Oliveira Filho, LB, Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

*Dedico esta tese a minha mãe Hilza,
símbolo de força e determinação.*

*Ao meu padastro Atanásio, um pai
sempre presente, a meu irmão Luiz e
Patrícia, meu carinho.*

Ao meu filho Pedro Luiz

luz da minha vida

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Benjamin Gilbert, meu eterno agradecimento por fazer nascer em mim o espírito científico e principalmente pelos ensinamentos diários;

A Suzana, pela oportunidade, confiança, paciência e orientação durante o período desta tese e pela amizade, que seja eterna;

Ao Prof Alfredo Martins de Oliveira Filho, pela orientação nos ensaios biológicos e por me fazer apaixonar pelo mundo da entomologia;

A Elza, Marli, Elizabete, Cosme, Joaquim pelo apoio técnico, amizade e sempre alto astral;

Celso, pelo sangue literalmente dado durante todo este trabalho;

Ao José Luiz, Eliane Velasco, Eliane Carvalho, Luciana Chedier e Selma, pelo apoio, amizade e incentivo durante todos esses anos;

Marcus Jun, Marcelo, Leonardo, Igor, Vagner pelo apoio no laboratório e pelo carinho;

Mônica Freiman um anjo sempre pronto a ajudar e Jislaine poetiza, cientista e grande amiga

Iara, Lucilene, amizade preciosa e grande ajuda nos momentos difíceis;

Alessandra Valverde, Anderson grandes amigos para toda hora;

Maria Behrens, Ana e Lalá Barreto pela amizade e força no dia a dia;

A Fernanda, Simone Larue e Simone Valverde, pelo apoio em todos os momentos;

Ao Moisés, André e todo pessoal da Colônia Juliano Moreira pela força constante;

Dra Miramy Macedo (UFMT) pela coleta e identificação da sucupira branca;

Aos Professores Dr. Joaquim (IQ) e Dr. Hélio (FF) e pela revisão dos resultados desta tese;

A Dra Maria Angela Meireles, por abrir as portas do LASEFI, para a realização do trabalho com o extrator supercrítico e Camila Gambini, um apoio no laboratório e uma amizade crescente, obrigada pelas noites no LASEFI;

A Vera Cascon pela coleta do urucuri e pela amizade sempre presente;

À equipe da Central Analítica pelos espectros realizados e pela amizade dispensada;

A Antônio Carlos Siani pelo apoio e puxões de orelha;

Ao Rogério por tornar minha vida especial;

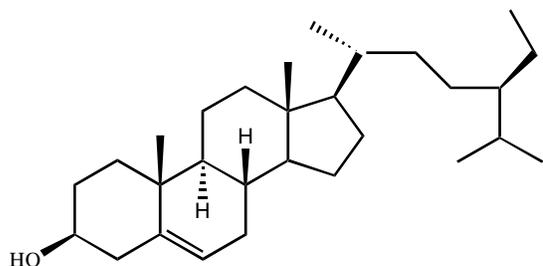
Ao Laboratório de Tecnologia em Fármacos, Far-Manguinhos pelo apoio financeiro;

A todos aqueles que direta ou indiretamente se envolveram na realização deste trabalho meu muito obrigada.

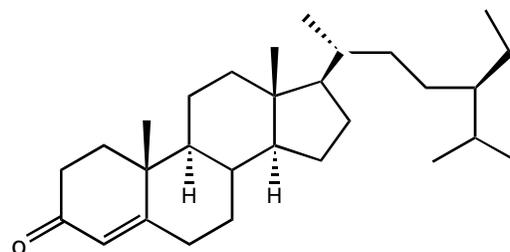
A Deus por estar sempre me guiando.

Lista das Principais Sustâncias Identificadas em:

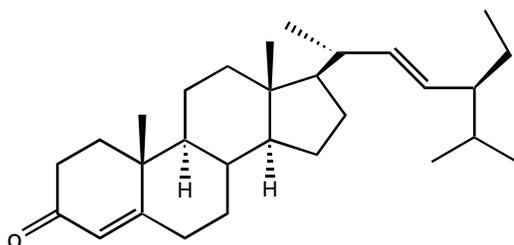
Extrato Hexânico das Brácteas de *Attalea excelsa* (EHBA) e nas frações FD (fração diclorometano), FD/AE (fração diclorometano/acetato de etila)



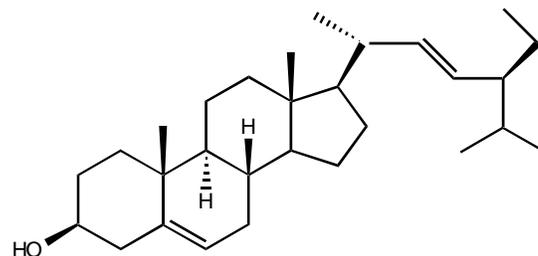
I. Estigmasta-4,22-dien-3-ona



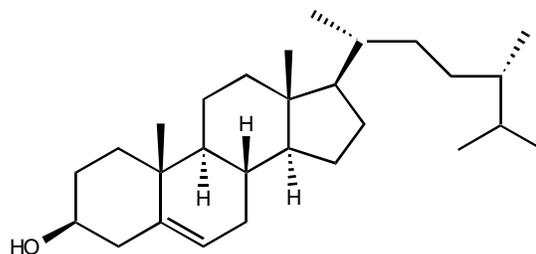
II. Estigmast-4-en-3-ona



**III. 3β-hidroxi-estigmast-5-eno
(β-sitosterol)**

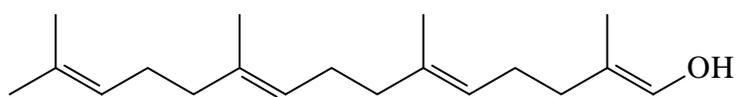


**IV. 3β-hidroxi-estigmast-5,22-dieno
(estigmasterol)**

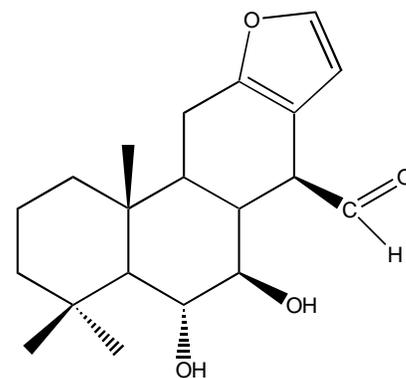


V. campesterol

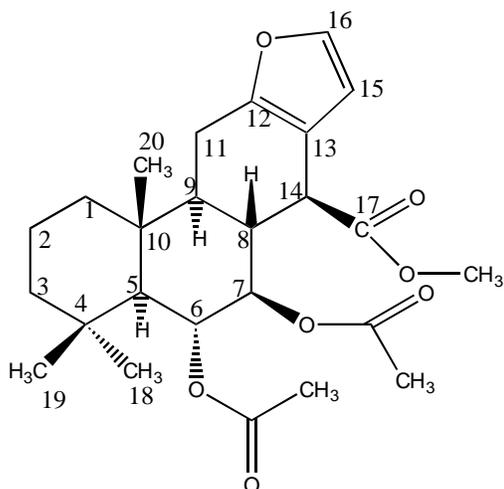
Extrato Hexânico dos Frutos de *Pterodon emarginatus* (OSMT-1)



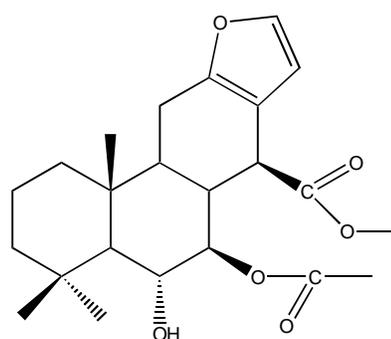
VII. Geraniolgeraniol



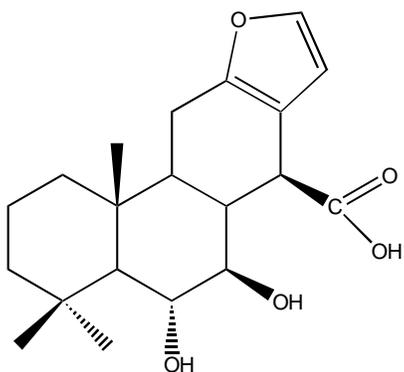
VIII. 6 α ,7 β -dihroxivouacapan-17 β -al



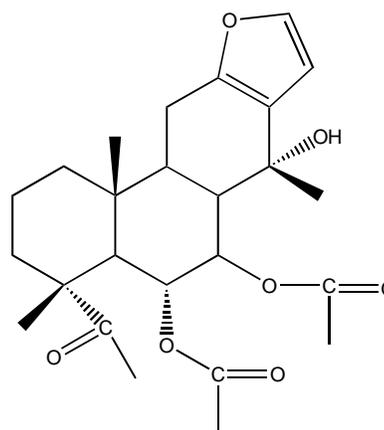
IX. 6 α ,7 β -diacetoxivouacapan-17 β -oato de metila



X. 6 α -hidroxi-7 β -acetoxivouacapan-17 β -oato de metila



XI. Ácido 6 α ,7 β -dihroxivouacapan-17 β -óico



XII. 6 α ,7 β -diacetoxi-17 β -hidroxivinhaticoato de metila

SUMÁRIO

	Página
LISTA DAS PRINCIPAIS SUBSTÂNCIAS IDENTIFICADAS	i
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	v
ÍNDICE DE ESQUEMAS	viii
ÍNDICE DE QUADROS	ix
ÍNDICE DE CROMATOGRAMAS	x
ÍNDICE DE ESPECTROS	xiii
ÍNDICE DE TABELAS	xvi
ÍNDICE DE GRÁFICOS	xvii
RESUMO	xix
ABSTRACT	xxi
I. INTRODUÇÃO	1
II. JUSTIFICATIVA	40
III. OBJETIVOS	42
IV. PARTE EXPERIMENTAL	43
V. RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
VI. CONCLUSÕES	113
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	115

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

δ - Deslocamento Químico (ppm)

CCF – Cromatografia em Camada fina

CDCl_3 - Clorofórmio deuterado

CGAR/EM - Cromatografia com Fase Gasosa de Alta Resolução acoplada ao Espectrômetro de Massas

CG – Cromatografia com Fase Gasosa

COSY ^1H - ^1H - Espectro de Correlação Hidrogênio-Hidrogênio

d - dubleto

d.d - dubleto duplo

DEET – N,N-dietil-m-toluamida

DEPT – “Distortionless Enhancement by Polarization Transfer”

EHBA – Extrato hexânico brácteas *Attalea excelsa*

EM – Espectro de Massa

FD – Fração diclorometano

FD/FAE - Fração diclorometano/ Acetato de etila

Hz – Hertz

I.V. – Infravermelho

KBr – Brometo de Potássio

m – multiplete

M^+ - Íon Molecular

m/z – Abundância relativa (relação massa/carga)

MHz - megahertz

MeOH - Metanol

nm - nanômetros

P.F. – Ponto de Fusão

PM – Peso Molecular

p.p.m. - Partes por milhão

RMN^{13}C - Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13

RMN^1H - Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

s - singleto

TMS – Tetrametilsilano

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 01: Semelhança estrutural entre a nicotina e a acetilcolina.	04
Figura 02: Rotenóides de <i>Lonchocarpus urucu</i> Killip et Smith	06
Figura 03: Quassinóides de <i>Quassia amara</i> L.	07
Figura 04: Tetranortriterpenóides de <i>Carapa guianensis</i> Aubl.	09
Figura 05: Exemplos de piretrinas	11
Figura 06: Exemplos de piperinas.	12
Figura 07: Exemplos de precocenos	13
Figura 08: Exemplos de juvenóides.	14
Figura 09: Principais mosquitos de Importância Sanitária no Brasil	17
Figura 10: Ciclo de Transmissão do vírus do Dengue	18
Figura 11: <i>Cocos nucifera</i> L.	21
Figura 12: <i>Serenoa repens</i> (Bartram) Small.	22
Figura 13: <i>Mauritia flexuosa</i> L.	23

Figura 14: <i>Euterpe oleracea</i> Mart	24
Figura 15: <i>Elaeis guineensis</i> N. J. Jacquin	26
Figura 16: <i>Attalea speciosa</i> Mart. ex Spreng	30
Figura 17: <i>Attalea excelsa</i> Mart. ex Spreng	31
Figura 18: <i>Attalea excelsa</i> Mart. ex Spreng, brácteas, frutos e amêndoas	32
Figura 19: <i>Attalea funifera</i> Mart. ex Spreng	33
Figura 20. Diterpenos isolados do gênero <i>Pterodon</i>	37
Figura 21: <i>Pterodon emarginatus</i> Vog	39
Figura 22: Aparelho de extração por fluido supercrítico, Laboratório de Engenharia de Alimentos (LASEFI), UNICAMP/Campinas.	49
Figura 23: Ensaio biológico utilizando-se as larvas F ₁ , realizado de acordo com as recomendações da OMS.	58
Figura 24: Kit da OMS para ensaios biológicos de resistência de mosquitos adultos a inseticidas, através do uso de papéis impregnados.	61
Figura 25: Gaiolas para teste de repelência em superfície impregnada em antebraço humano, em uma área tratada de 50 cm ² , contendo 25 fêmeas de <i>A. aegypti</i> , não alimentadas com sangue.	61

Figura 26: Perfil em cromatografia de camada fina do extrato hexânico dos frutos de *Pterodon emarginatus*, colhidos no estado do Mato grosso em 2001(lote 01) e 2002 (lote 02). 70

Figura 27: Perfil em cromatografia de camada fina das frações obtidas na extração supercrítica de frutos de *Pterodon emarginatus*, utilizando CO₂ como solvente extrator 71

Figura 28a: cromatografia em camada fina das frações obtidas na coluna de sílica gel do EHBA eluídas na mistura de hexano/acetato de etila na proporção de 7:3, usando como revelador químico o ácido fosfomolibdico 83

Figura 28b: cromatografia em camada fina das frações obtidas na coluna de sílica gel do EHBA eluídas na mistura de hexano/acetato de etila na proporção de 7:3, usando como revelador químico vanilina/H₂SO₄ 84

ÍNDICE DE ESQUEMAS

	Página
Esquema 1: Fluxograma da coluna cromatográfica em sílica gel, do extrato hexânico de brácteas de <i>Attalea exelsa</i>	53
Esquema 2 Fluxograma da coluna cromatográfica em sílica gel, do extrato hexânico de frutos de <i>Pterodon emarginatus</i>	55
Esquema 3: Etapas da partição do extrato etanólico de frutos de <i>Pterodon emarginatus</i> (EESMT-1)	57
Esquema 4: Proposta de rotas de fragmentações características de ésteres metílicos lineares	96

ÍNDICE DE QUADROS

	Página
Quadro 1: Extração com fluido supercrítico das brácteas de <i>Attalea excelsa</i> utilizando CO ₂ como solvente extrator e variações nas condições de pressão, temperatura e tamanho de partícula	50
Quadro 2: deslocamentos químicos (ppm) atribuídos aos átomos de carbono da substância 6 α ,7 β -diacetoxivouacapan-17 β -oato de metila	87
Quadro 3: Ésteres metílicos de cadeia linear caracterizados por CGAR/EM, no extrato hexânico de brácteas de <i>Attalea excelsa</i> (EHBA).	95

ÍNDICE DE CROMATOGRAMAS

	Página
Cromatograma 1: Perfil por cromatografia com fase gasosa do diterpeno 6 α ,7 β -diacetoxivouacapan-17 β -oato de metila	86
Cromatograma 2a: Perfil por cromatografia com fase gasosa do extrato hexânico de bráctea de <i>Attalea excelsa</i> (EHBA) na coluna capilar HP-WAX (polietilenoglicol-polar)	93
Cromatograma 2b: Perfil por cromatografia com fase gasosa do extrato hexânico de bráctea de <i>Attalea excelsa</i> (EHBA), HP-1 (100% dimetilpolisiloxano-apolar)	94
Cromatograma 2c: Perfil por cromatografia com fase gasosa do extrato hexânico de frutos de <i>Pterodon emarginatus</i> (OSMT-1) na coluna capilar HP-WAX (polietilenoglicol-polar)	94
Cromatograma 2d: Perfil por cromatografia com fase gasosa do extrato hexânico de frutos de <i>Pterodon emarginatus</i> (OSMT-1) na coluna capilar HP-1 (100% dimetilpolisiloxano-apolar)	95
Cromatograma 3a: Perfil por cromatografia com fase gasosa do extrato hexânico de bráctea de <i>Attalea excelsa</i> (EHBA) em HP-5	97
Cromatograma 3b: Perfil por cromatografia com fase gasosa do extrato hexânico de bráctea de <i>Attalea excelsa</i> (EHBA), detalhe da região dos ésteres de ácidos graxos em HP-5	97

Cromatograma 3c: Perfil por cromatografia com fase gasosa do extrato hexânico de bráctea de *Attalea excelsa* (EHBA), detalhe da região dos esteróides em HP-5

98

Cromatograma 4a: Perfil por cromatografia com fase gasosa da FD obtida da coluna em sílica gel do extrato hexânico de brácteas de *Attalea excelsa* (EHBA) em HP-5

104

Cromatograma 4b: Perfil por cromatografia com fase gasosa da FD obtida da coluna em sílica gel do extrato hexânico de brácteas de *Attalea excelsa* (EHBA), detalhe da região da isocumarina

104

Cromatograma 4c: Perfil por cromatografia com fase gasosa da FD/AE obtida da coluna em sílica gel do extrato hexânico de brácteas de *Attalea excelsa* (EHBA) em HP-5

105

Cromatograma 5a: Perfil por cromatografia com fase gasosa da fração hexano (FH), obtida da coluna em sílica gel do extrato hexânico de bráctea de *Attalea excelsa* (EHBA) em HP-5

106

Cromatograma 5b: Perfil por cromatografia com fase gasosa da fração hexano/diclorometano (FH/D), obtida da coluna em sílica gel do extrato hexânico de bráctea de *Attalea excelsa* (EHBA) em HP-5

106

Cromatograma 5c: Perfil por cromatografia com fase gasosa da fração acetato de etila (FAE), obtida da coluna em sílica gel do extrato hexânico de bráctea de *Attalea excelsa* (EHBA) em HP-5

107

Cromatograma 5d: Perfil por cromatografia com fase gasosa da fração acetato de etila/metanol (FAE/M), obtida da coluna em sílica gel do extrato hexânico de bráctea de *Attalea excelsa* (EHBA) em HP-5 107

Cromatograma 6: Perfil por cromatografia com fase gasosa do Extrato Etanólico de Brácteas de *Attalea excelsa* (EEBA) em HP-5 108

Cromatograma 7: Perfil por cromatografia com fase gasosa do extrato hexânico de frutos de *P. emarginatus* (OSMT-1) 109

Cromatograma 8: Perfil por cromatografia com fase gasosa do extrato hexânico de frutos de *P. emarginatus* (OSMT-1), detalhe da região dos diterpenos furânicos

ÍNDICE DE ESPECTROS

	Página
Espectro 1: Espectro de massas do 6 α ,7 β -diacetoxivouacapan-17 β -oato de metila	86
Espectro 2: RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) de 6 α ,7 β -diacetoxivouacapan-17 β -oato de metila	89
Espectro 3: RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) de 6 α ,7 β -diacetoxivouacapan-17 β -oato de metila	90
Espectro 4: RMN ^{13}C (DEPT) de 6 α ,7 β -diacetoxivouacapan-17 β -oato de metila	91
Espectro 5: Espectro de infravermelho (KBr) de 6 α ,7 β -diacetoxivouacapan-17 β -oato de metila	92
Espectro 6: Espectro de massas do palmitato de metila presente no extrato hexânico de brácteas de <i>A. excelsa</i> (EHBA)	98
Espectro 7: Espectro de massas do palmitato de etila presente no extrato hexânico de brácteas de <i>A. excelsa</i> (EHBA)	99
Espectro 8: Espectro de massas do linoneato de metila presente no extrato hexânico de brácteas de <i>A. excelsa</i> (EHBA)	99
Espectro 9: Espectro de massas do oleato de metila presente no extrato hexânico de brácteas de <i>A. excelsa</i> (EHBA)	100

Espectro 10: Espectro de massas do palmitoleato de metila presente no extrato hexânico de brácteas de <i>A. excelsa</i> (EHBA)	100
Espectro 11: Espectro de massas do estearato de etila presente no extrato hexânico de brácteas de <i>A. excelsa</i> (EHBA)	101
Espectro 12: Espectro de massas do campesterol presente no extrato hexânico de brácteas de <i>A. excelsa</i> (EHBA)	101
Espectro 13: Espectro de massas do ergost-4-en-3-ona presente no extrato hexânico de brácteas de <i>A. excelsa</i> (EHBA)	102
Espectro 14: Espectro de massas do β sitosterol presente no extrato hexânico de brácteas de <i>A. excelsa</i> (EHBA)	102
Espectro 15: Espectro de massas do estigmast-4-en-3-ona presente no extrato hexânico de brácteas de <i>A. excelsa</i> (EHBA)	103
Espectro 16: Espectro de massas da isocumarina presente na FD obtida da coluna em sílica gel do extrato hexânico de bráctea de <i>A. excelsa</i> (EHBA)	105
Espectro 17: Espectro de massas do diterpeno geranilgeraniol, extrato hexânico de frutos de <i>P. emarginatus</i> (OSMT-1)	109
Espectro 18: Espectro de massas do diterpeno 6 α -hidroxi-7 β -acetoxivouacapan-17 β -oato de metila, com $T_r = 50,06$ presente no do extrato hexânico de frutos de <i>P. emarginatus</i> (OSMT-1)	110

Espectro 19: Espectro de massas do diterpeno $6\alpha,7\beta$ -diacetoxivouacapan- 14β -al, com $T_r = 50,65$ presente no extrato hexânico de frutos *P. emarginatus* (OSMT-1)

111

Espectro 20: Espectro de massas do diterpeno (C), com $T_r = 52,55$ presente no extrato hexânico de frutos de *P. emarginatus* (OSMT-1)

111

Espectro 21: Espectro de massas do diterpeno $6\alpha,7\beta$ -diacetoxi- 17β -hidroxivinhatóato de metila (D), com $T_r = 52,78$ presente no extrato hexânico de frutos de *P. emarginatus* (OSMT-1)

112

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
Tabela 01: Fracionamento em coluna de sílica gel do extrato de brácteas de <i>Attalea excelsa</i> (EHBA), utilizando gradiente de solventes.	53
Tabela 2a: Rendimento das extrações realizadas com brácteas secas de <i>Attalea excelsa</i> utilizando vários métodos extrativos.	67
Tabela 2b: Rendimento das extrações realizadas com brácteas secas de <i>Attalea excelsa</i> com fluido supercrítico, utilizando-se CO ₂ como solvente extrator.	67
Tabela 3: Rendimento das extrações realizadas com frutos triturados de <i>Pterodon emarginatus</i> , utilizando-se vários métodos extrativos.	69
Tabela 4 a: Percentagens de mortalidade de larvas de terceiro estágio de <i>Aedes aegypti</i> e <i>Culex quinquefasciatus</i> , após 24 h de exposição a diferentes concentrações de vários dos extratos de brácteas de <i>Attalea excelsa</i> .	72
Tabela 4 b: Percentagens de mortalidade de larvas de terceiro estágio de <i>Aedes aegypti</i> e <i>Culex quinquefasciatus</i> após 24 h de exposição a diferentes concentrações do ácido palmítico.	73
Tabela 4 c: Percentagens de mortalidade de larvas de terceiro estágio de <i>Aedes aegypti</i> e <i>Culex quinquefasciatus</i> , após 24 h de exposição a diferentes concentrações de vários dos extratos de frutos de <i>Pterodon emarginatus</i>	74

ÍNDICE DE GRÁFICOS**Página**

Gráfico 1: Percentagem de inibição da alimentação de fêmeas de *Aedes aegypti* expostas à pele humana tratada com extrato hexânico das brácteas secas de *Attalea excelsa* (EHBA) 76

Gráfico 2: Percentagem de inibição da alimentação de fêmeas de *Aedes aegypti* expostas à pele humana tratada com extrato etanólico das brácteas secas de *Attalea excelsa* (EEBA) 77

Gráfico 3: Percentagem de inibição da alimentação de fêmeas de *Aedes aegypti* expostas à pele humana tratada com extrato etanólico desengordurado das brácteas secas de *Attalea excelsa* (EEBA-D) 77

Gráfico 4: Percentagem de inibição da alimentação de fêmeas de *Aedes aegypti* expostas à pele humana tratada com frações da coluna cromatográfica do extrato hexânico das brácteas secas de *Attalea excelsa* 78

Gráfico 5: Percentagem de inibição da alimentação de fêmeas de *Aedes aegypti* expostas à pele humana tratada com ácido palmítico das brácteas secas de *Attalea excelsa* 78

Gráfico 6: Percentagem de inibição da alimentação de fêmeas de *Aedes aegypti* expostas à pele humana tratada com extrato hexânico dos frutos secos e triturados de *Pterodon emarginatus* (OSMT-1). 80

Gráfico 7: Percentagem de inibição da alimentação de fêmeas de *Aedes aegypti* expostas à pele humana tratada com extrato etanólico dos frutos secos e triturados de *Pterodon emarginatus* (EESMT-1). 80

Gráfico 8: Percentagem de inibição da alimentação de fêmeas de *Aedes aegypti* expostas à pele humana tratada com a fração 31-37 obtida na coluna cromatográfica do extrato hexânico dos frutos secos e triturados de *Pterodon emarginatus* 81

Gráfico 9: Percentagem de inibição da alimentação de fêmeas de *Aedes aegypti* expostas à pele humana tratada com o $6\alpha,7\beta$ -diacetoxivouacapan-17 β -oato de metila. Diterpeno isolado por placa preparativa da mistura de diterpenos de *Pterodon emarginatus* 81

Gráfico 10: Percentagem de inibição da alimentação de fêmeas de *Aedes aegypti* expostas à pele humana tratada com frações obtidas por partição com gradiente de solventes, do extrato etanólico de frutos de *P. emarginatus* (EESMT-1), na dose de 1,0 mg/cm² 82

RESUMO

A busca de possíveis fontes e modelos de novos agentes no controle de insetos transmissores de doenças direcionou este trabalho a duas espécies de plantas brasileiras que possuem ação repelente. A primeira, *Attalea excelsa* é uma palmeira de nome popular urucuri, palmeira típica da região norte do país e a segunda *Pterodon emarginatus*, conhecida vulgarmente como sucupira branca, uma espécie abundante nos cerrados brasileiros.

O estudo químico de brácteas de *Attalea excelsa* mostrou que o extrato hexânico, ativo como repelente de *Aedes aegypti*, consiste principalmente de substâncias lipofílicas, sendo a presença maior de ácidos graxos saturados e insaturados, seguida pela presença de esteróides como estigmasterol, β -sitosterol, campesterol e estigmastenona, dentre outros, substâncias estas não possuidoras de atividade repelente de insetos.

Das frações obtidas em coluna cromatográfica do extrato hexânico das brácteas de urucuri, somente as frações em diclorometano (FD) e em diclorometano/acetato de etila (FD/FAE) inibiram a alimentação de 100 % das fêmeas de *Aedes aegypti* por 8 horas. Nestas duas frações além dos ácidos graxos e esteróides foi caracterizada uma isocumarina, esta possivelmente relacionada com a grande atividade repelente que estas frações demonstraram.

A espécie *Pterodon emarginatus* demonstrou ter também grande atividade repelente. O extrato hexânico de seus frutos também inibiu a alimentação dos mosquitos por um período de 8 horas na menor dose testada.

Deste extrato hexânico (OSMT-1), utilizando CGAR/EM, foram caracterizados ácidos graxos em pequena quantidade, sesquiterpenos (α -cariofileno, β -cariofileno, mirceno, α -pineno, farneseno) e diterpenos tricíclicos furânicos que preponderaram. Foi isolado por cromatografia em coluna aberta um destes diterpenos furânicos, o $6\alpha,7\beta$ -diacetoxivouacapan- 17β -oato de metila. A estrutura química dele foi proposta com base em comparações feitas com os espectros de IV, RMN ^1H , RMN ^{13}C e CG/EM com dados descritos na literatura. No entanto

quando foi testado como repelente em duas doses (0,5 e 1,0 mg/cm²) e não apresentou inibição da alimentação das fêmeas de *Aedes aegypti*.

Das duas plantas trabalhadas a sucupira apresentou um maior potencial para futuras formulações de produtos repelentes em larga escala, pois além de um excelente rendimento, o próprio extrato bruto apresentou uma atividade repelente frente aos mosquitos testados, numa dose comparável ao repelente sintético DEET. Além disso, o óleo resultante da extração de seus frutos, possui um aroma floral agradável, devido à presença de geranilgeraniol, que muito acrescentaria nas loções e cremes formulados. Estas características compensam a dificuldade de colheita e trituração dos frutos, e indicam um promissor repelente natural que poderá concorrer com os sintéticos do mercado.

SUMMARY

The search for new leads in the control of insects, which transmit diseases, stimulated the study of Brazilian natural products with activity in this field. Two abundant plants with insect repellent properties are *Attalea excelsa*, a palm tree with the common name urucuri, found in the northern part of the country and *Pterodon emarginatus*, popularly known as sucupira branca, which occurs in the “cerrado” or savannah of central Brazil.

In general chemical analysis of the bracts of *Attalea excelsa* showed that the hexane extract which was active as a repellent for *Aedes aegypti*, contains large quantities of lipophilic substances, in the main saturated and unsaturated fatty acids. In second place come steroids like stigmasterol, β -sitosterol, campesterol and stigmasterone as well as others.

From the fractions obtained by column chromatography of these hexane extracts of urucuri bracts, only the fractions eluted with dichloromethane (FD) and with dichloromethane-ethyl acetate (FD/FAE) totally inhibited feeding of *Aedes aegypti* female adults during 8 hours. In these two fractions were found fatty acids, steroids and one substance of a different chemical class – an isocoumarin, which in contrast to the others, only appeared in these two fractions (FD and FD/FAE). For this reason it is believed to be responsible for the strong repellent action of these fractions.

The species *Pterodon emarginatus* was also strongly repellent, the hexane extract inhibiting feeding of the mosquitoes for 8 hours at the lowest dose tested, just as in the case of urucuri.

In the hexane extract of sucupira branca fruits (OSMT-1), analysis by gas chromatography coupled to mass spectrometry, characterised small quantities of fatty acids, sesquiterpenes (α -caryophyllene, β -caryophyllene, myrcene, α -pinene) and larger amounts of tricyclic diterpenoid furans, which make up the major part of the extract OSMT-1. From the same extract, solvent gradient chromatography followed by preparative thin layer chromatography yielded the diterpenoid methyl 6 α ,7 β -diacetoxycouacapan-17 β -oate. The structure of this compound was

proposed on the basis of comparison with IR, NMR ^1H , NMR ^{13}C and GC/MS data in the literature. This diterpenoid however showed no antifeedant activity when tested with female *Aedes aegyptii* mosquitoes.

Of the two plants tested *sucupira* shows the higher potential as a raw material for large scale repellent production, because, not only is the yield excellent, but the repellent activity is also high for the mosquito species examined when compared with DEET. Apart from this, the crude oil obtained by extraction of the fruits has a pleasant floral aroma, due to the presence of geranylgeraniol, an attractive property in lotions and creams. These characteristics outweigh the difficulty of collecting and grinding the fruits, and in our view this oil is a valid competitor on the market presently occupied by synthetic substances.

I.INTRODUÇÃO

O controle de mosquitos e outras espécies de insetos de importância em saúde pública tem sido realizado nas últimas décadas principalmente com inseticidas químicos sintéticos. Neste mesmo período, outros métodos auxiliares foram usados, tais como campanhas que visam o controle de criadouros, controle biológico com o uso de peixes e microorganismos e uso de proteção individual através de repelentes derivados principalmente da N,N-dimetil-m-toluamida (DEET), presente em quase todas as formulações comerciais (Autan, OFF). Os pesticidas, à primeira vista, pareciam ser a solução, mas a experiência mostrou que insetos sob o tratamento intensivo dos inseticidas passaram a ser tolerantes, se tornando necessário o aumento das doses e com maior frequência de aplicação, desencadeando aumento da resistência (OLIVEIRA FILHO, 1999).

Muitas espécies de mosquitos são vetores de importantes doenças endêmicas, tais como malária, dengue, febre amarela, filariose bancroftiana e arboviroses, e apresentam hoje resistência a várias classes de inseticidas químicos. Desta forma, o uso frequente de inseticidas tem resultado na quase extinção de parasitas, embora em alguns casos os predadores desses vetores também sofreram, e com a resistência, tem aumentado a população dos transmissores. As espécies *Culex quinquefasciatus*, *Aedes aegypti* e *A. darlingi* desenvolveram resistência múltipla a diversos inseticidas, (OLIVEIRA FILHO, 2002). Mais de 113 espécies de Anofelinos e Culicíneos apresentaram algum tipo de resistência a inseticidas sintéticos, tornando urgente o desenvolvimento de meios alternativos para o controle destes vetores (FONTAINE, 1980).

Em vista das dificuldades operacionais e econômicas geradas por esta crescente resistência dos mosquitos, os métodos alternativos ganharam novo impulso e passaram a merecer maior atenção (WHO, 1977). Dentre estes, vem se destacando o desenvolvimento de bioinseticidas bacterianos a base de *Bacillus thuringiensis* e *B.sphaericus* e a busca de novos princípios ativos, com atividade inseticida sobre larvas e/ou adultos, atraentes ou repelentes ou ainda capazes de interferir no crescimento do inseto. Vegetais, ou produtos deles derivados, têm sido pesquisados por várias décadas com o objetivo de contribuir de forma eficaz para este controle (SUKUMAR, 1991).

As pesquisas com produtos naturais usualmente seguem duas vertentes, a primeira busca a aplicação direta de plantas inteiras, suas partes, extratos ou frações, cujos componentes químicos são em grande parte desconhecidos; e a segunda procura o isolamento de substâncias ativas que serão futuras fontes e modelos de novos agentes no controle de insetos.

Algumas plantas acumulam substâncias químicas bioativas em várias de suas partes específicas, dependendo da sua localização, podendo ser nas folhas, frutos, flores, sementes e raízes. Estas substâncias podem atuar em todos os estágios evolutivos do mosquito ou apresentar uma atividade mais limitada, enquanto outras podem interferir no crescimento, na reprodução ou ainda provocar respostas de atração ou repelência.

No início do século várias plantas foram estudadas quanto ao seu potencial como controladores de mosquitos, um exemplo são as sementes mucilaginosas de várias espécies de Cruciferae que são capazes de prender as larvas dos mosquitos pelas peças bucais e matá-las (REEVES, 1969) ou a presença de uma espécie do gênero *Chara*, uma alga que inibe o crescimento de larvas de *Aedes fluviatilis* (CONSOLI, 1988).

As primeiras substâncias inseticidas usadas pelo homem foram originárias de plantas. Dioscorides (40-90 dC), por exemplo, mencionou a utilidade do ópio e acônito, entre outras (MCINDOO, 1945), tendo sido usados não só na terapêutica, mas também como inseticidas. Outras plantas inseticidas e repelentes mencionadas nos escritos clássicos incluem absinto, louro, cedro, alho, figo, carvalho, asafétida, cassia, romã (SMITH, 1975). Entretanto, o uso de extratos vegetais em ampla escala comercial como inseticida começou aproximadamente em 1850, com a introdução da nicotina (*Nicotiana tabacum*), do derris ou rotenona (*Lonchocarpus* sp) e do piretro (*Chrysanthemum cinerariaefolium*). Hoje, aproximadamente 2000 espécies de plantas são conhecidas por possuir alguma atividade relativa ao controle de insetos (CROSBY, 1966; AHMED, 1984).

I.1. Produtos Naturais Ativos sobre Insetos:

Várias substâncias de origem natural são eficazes contra insetos, por maneiras distintas:

- Inseticidas: podem afetar os axônios (clorados e piretróides) e sinapses (organofosforados e carbamatos), ou a respiração (rotenóides),
- Substâncias que afetam o balanço hormonal: análogos e antagonistas do hormônio juvenil,
- Substâncias que afetam o comportamento: atrativos/repelentes.

Dentre os inúmeros produtos naturais que possuem uma ou outra das propriedades citadas cima, muitos são compostos heterocíclicos. As classes mais comuns são:

Alcalóides

Alcalóides são geralmente definidos como compostos orgânicos de ocorrência natural que possuem um átomo de nitrogênio incorporado em um anel heterocíclico.

Além da atividade inseticida, os alcalóides encontrados em plantas, previnem ou reduzem a predação de herbívoros.

Como inseticida e acaricida; a nicotina é provavelmente o alcalóide mais conhecido e mais usado, ela está presente em algumas espécies de *Nicotiana* (Solanaceae). A nicotina é bastante tóxica, com DL₅₀ oral em ratos de 30mg/kg, mas é rapidamente eliminada do corpo do animal e na presença de luz se decompõe.

A atividade da nicotina como inseticida está relacionada com sua semelhança na configuração e distribuição de cargas com a acetilcolina, o que a torna extremamente tóxica a muitas espécies de insetos (DALES, 1996), (Figura 01).

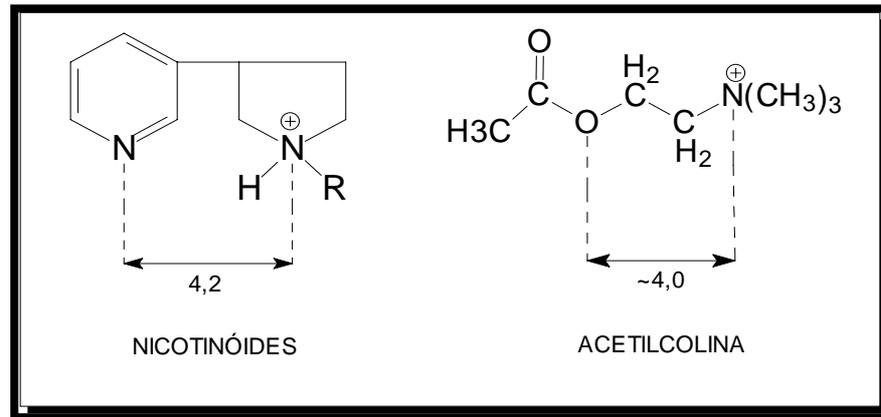


Figura 1: Semelhança estrutural entre a nicotina e a acetilcolina. Os valores são dados em Å.

As propriedades inseticidas da nicotina estão relacionadas essencialmente com:

- o anel piridínico
- nitrogênio no anel pirrolidínico
- distância de 4,2Å entre os dois átomos de nitrogênio e
- a não substituição da posição α do anel piridínico.

Enquanto as bases livres penetram facilmente no tecido dos insetos, o íon nicotínico, com carga positiva no nitrogênio pirrolidínico, tem permeação limitada. Alcançando o fluido corporal, um equilíbrio é estabelecido entre os dois. Como somente bases livres passam através da barreira sináptica, o íon nicotínico é metabolizado e excretado. Após a penetração através da barreira do nervo um novo equilíbrio é estabelecido entre o íon e a base livre, regenerando o íon nicotínico, que interage com o receptor da acetilcolina pela semelhança da distância entre os heteroátomos atuando como inseticida.

Rotenóides

Uma das principais características dos princípios existentes nas raízes de *Lonchocarpus urucu* (Leguminosae – Fabaceae), conhecida popularmente como timbó, é a sua ação específica sobre animais de sangue frio. Essas substâncias são bem conhecidas e a principal delas é a rotenona. Ela sempre aparece

acompanhada por outros princípios ativos, os rotenóides, dentre os quais destaca-se toxicarol, deguelina, tefrosina, sumatrol, elliptona e malacol, (Figura 02). O toxicarol tem atividade inseticida duas vezes menor do que a rotenona, a deguelina três vezes e a tefrosina, sete vezes. A rotenona é um inseticida que tem boa solubilidade em clorofórmio, éter etílico e tetracloreto de carbono. Existem testes qualitativos e quantitativos para determinar o teor de rotenona nas raízes. Os testes qualitativos têm emprego prático em viagens exploratórias, porque permitem caracterizar as plantas portadoras de rotenona e fornecem indicações da presença desta substância. Um dos testes qualitativos mais empregados é o de Durham, que consiste em aplicar uma gota de ácido nítrico comercial na superfície do corte transversal da raiz cujo tratamento lhe dá uma coloração amarelada. Se o material contiver rotenona, com a adição de outra gota de hidróxido de amônio, aparece coloração verde-azulada, que será tanto mais intensa quanto maior for o teor de rotenona (LIMA, 1947). As cascas das raízes do timbó podem conter de 3 a 20% de rotenona e, ainda, outros rotenóides com atividade inseticida (MATHIAS, 1994).

As raízes do timbó amassadas e agitadas na água produzem um suco leitoso com cheiro muito forte e peculiar. Sob ação desse suco, mesmo muito diluído, os peixes perdem o equilíbrio, sobem aturdidos à superfície e se deixam apanhar facilmente. A palavra timbó é de origem tupi –*ti* suco, sumo e *mb* cobra, significando sumo de cobra (CORBETT, 1940).

Antes da segunda guerra mundial, o pó das raízes do timbó constituía num dos produtos de exportação da Amazônia. Era utilizada pelos importadores para a extração de rotenona, com a qual preparavam diversos produtos de largo emprego no combate às pragas e, também, no combate aos ectoparasitas de animais domésticos, como relata, com excelentes resultados, o experimento realizado com o extrato aquoso de timbó em búfalos para controle de piolhos da espécie *Haematobius tuberculatus* (COSTA, 1986).

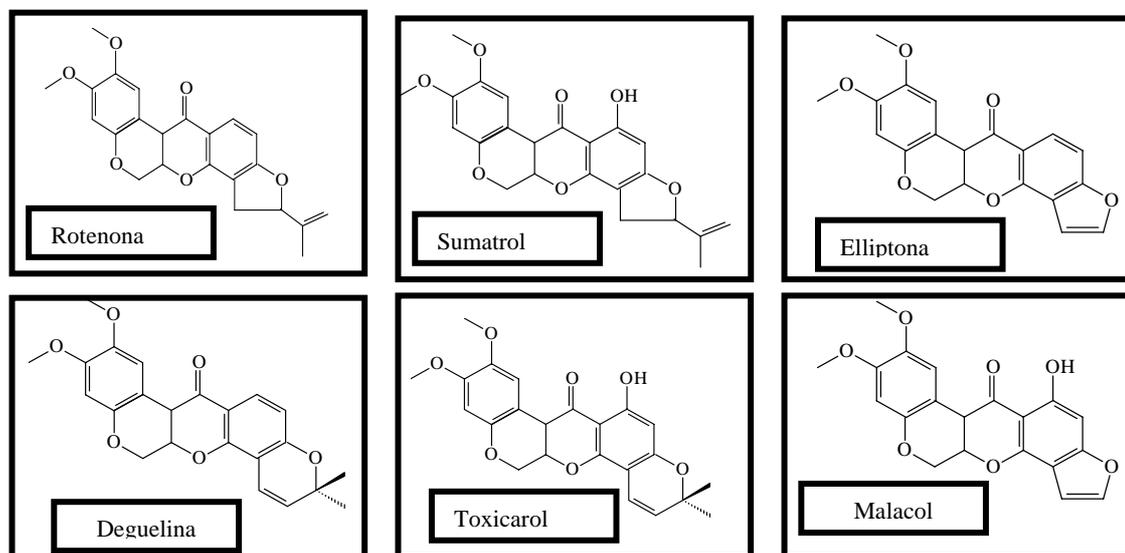


Figura 2: Rotenóides de *Lonchocarpus urucu* killip et Smith

Quassinóides

A madeira de *Quassia amara* era normalmente cortada em pequenos pedaços para exportação. Em 1939, um milhão de libras (cerca de 450 t) de pedaços de quassia foram importados pelos EUA para controle de pragas como os pulgões (*Aphidae*) (MCINDOO, 1945).

Em 1834, foi isolado um princípio amargo não nitrogenado, que recebeu o nome de quassina. Esta, após tratamento com excesso de éter, forneceu, cristais amarelos, cujo ponto de fusão é de 149°-151°C. Sua estrutura só foi estabelecida em 1960, (Figura 3), (VALENTA, 1960).

Pesquisas realizadas com a madeira de quassia, resultaram em uma mistura de dois isômeros de fórmula $C_{22}H_{30}O_6$ com comportamento diferente do atribuído a quassina. Um desses isômeros cujo ponto de fusão é de 226°C, foi denominada de neoquassina (CLARK, 1937).

Quassia amara é uma planta arbustiva que ocorre em lugares úmidos proveniente da América tropical, habita as Guianas, Suriname, Panamá e norte do Brasil (Amazonas, Amapá, Pará e Maranhão) estendendo até Guatemala na América Central. É muito utilizada na sua região de origem para o combate à malária, os índios e caboclos fazem o uso do chá (decoção) da madeira para

controlar os acessos de febre. Nos anos 90, o grupo de Grandolini isolou vários alcalóides indólicos da madeira de *Quassia amara*, que mostraram importantes atividades antibiótica, amebicida, citotóxica e antimalarial. Destes, o alcalóide mais importante é o 2-metoxicantiona (NJAR, 1993).

As pequenas doses de quassina são dotadas de uma elevada ação sobre a musculatura lisa, aumenta o apetite, a diurese e regulariza a evacuação. Em doses moderadas excita as secreções salivares, hepáticas e renais. Doses elevadas podem causar convulsões e cefaléia (REUTTER, 1923).

Externamente, o decocto e a solução alcoólica de quassina (0,50%) são utilizados em aplicações locais, como repelentes, apresentando também ação larvívica contra larva de terceiro instar de *C. quinquefasciatus* (EVANS, 1991).

Em um trabalho realizado, com crianças em escola de nível primário, infestadas por piolhos, utilizando soluções alcoólicas de *Quassia amara*, observou-se uma redução considerável nas reinfestações supondo-se que a quassina possa ter ação profilática e terapêutica na pediculose humana (NINCI, 1991).

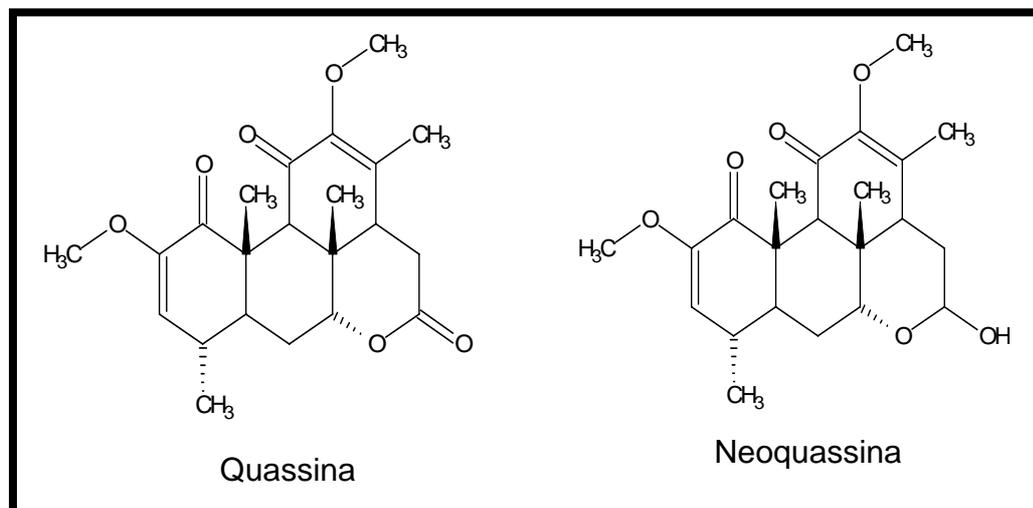


Figura 3: Quassinóides de *Quassia amara* L.

Triterpenos Degradados

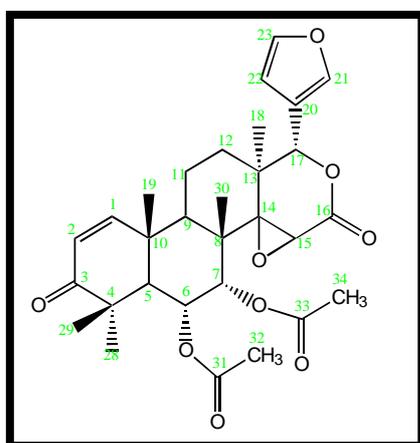
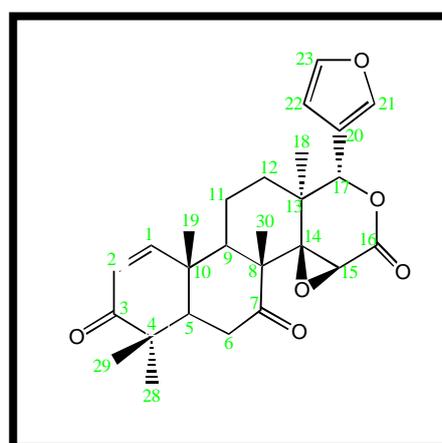
Azadiractina

O triterpenóide azadiractina foi isolado de sementes de *Azadirachta indica* (Meliaceae), e possui atividade fago-inibidora, ocasionando mortalidade e bloqueando a metamorfose de insetos. Essa molécula apresenta 8 anéis condensados (destes 5 heterocíclicos) e 2 grupos carbometoxi e duas hidroxilas esterificadas e é uma molécula de baixa estabilidade em condições ácidas ou alcalinas. A concentração de azadiractina varia nos diferentes estágios de desenvolvimento nas sementes e frutos do “neem”, acompanhando o crescimento do fruto. Isso é importante no controle ecológico, servindo à planta para sua própria defesa contra insetos e outros organismos, principalmente na fase inicial de crescimento das sementes (PURI, 1999).

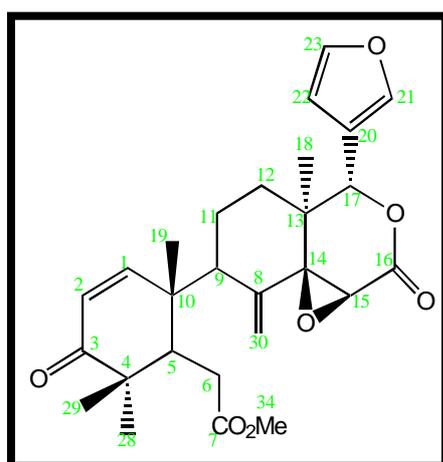
Essas árvores, originárias do Continente Asiático, foram introduzidas no Brasil e sua distribuição está concentrada nas regiões Sudeste e Centro-Oeste. As folhas de “neem” são usadas para picadas de mosquito aliviando a coceira e dor graças à sua atividade antihistamínica. O óleo extraído das sementes de “neem” possui sabor amargo devido ao grande número de ácidos triterpênicos oxigenados, sendo o princípio ativo majoritário a azadiractina. Entre outros temos tetranortriterpenóides, pentanortriterpenóides e hexanortriterpenóides. É utilizado em animais para controle de carrapatos, pulgas e piolhos no lugar dos inseticidas tradicionais apresentando a mesma eficiência e baixa toxicidade (PURI, 1999).

Tetranortriterpenóides

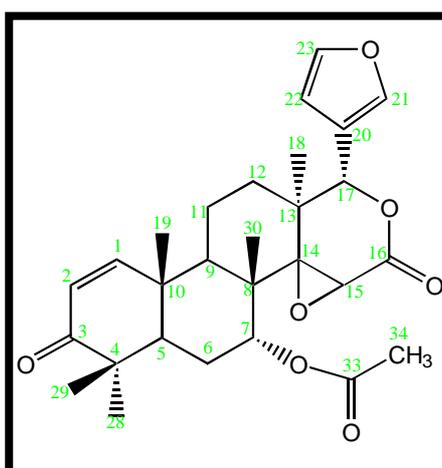
São exemplificados pelos triterpenos degradados isolados da espécie *Carapa guianensis*. (Meliaceae), conhecida como andiroba, (Figura 04). Esta planta não tem a reputação de ser inseticida, mas o óleo das sementes e o bagaço de expressão deste óleo são tidos como repelentes de mosquitos e de outros insetos e ácaros hematófagos, sendo largamente usados pelos índios e pela população em geral para repelir estas pragas. O costume de queimar o bagaço de andiroba para repelir mosquitos conduziu ao uso dos componentes, óleo e bagaço, em velas como maneira mais prática de dispersar o “repelente” pelo ambiente. (PEREIRA, 1998).

6 α -acetoxigedunina

7-desacetoxi-7-oxogedunina



Andirobina



Gedunina

Figura 4: Tetranortriterpenóides de *Carapa guianensis* Aubl.

Piretróides

As flores do piretro, *Chrysanthemum cinerariaefolium* (Asteraceae), contêm seis substâncias ativas identificadas como piretrinas I e II, cinerinas I e II, e jasmolinas I e II, (Figura 05). O piretro tem sido usado extensivamente como protetor para produtos armazenados em lugares de clima temperado e tropical por ser efetivo contra uma ampla variedade de insetos, incluindo mariposas e suas larvas (OLIVEIRA FILHO, 1999). O seu uso apenas declinou com a introdução dos organoclorados na década de 1940 e depois dos organofosforados sintéticos, particularmente devido ao seu custo e alta instabilidade quando exposto à luz. Mesmo assim, o piretro natural permaneceu como único inseticida permitido pelo FDA nas embalagens de alimentos, como, por exemplo, em sacos de açúcar.

Piretro é o nome comum dado às flores secas de *Chrysanthemum cinerariaefolium*. Os componentes que possuem atividades inseticidas são conhecidos como piretrinas, geralmente são ésteres derivados do ácido crisantêmico. Análogos sintéticos são conhecidos como piretróides. A piretrina é um dos inseticidas mais antigos, tendo sido usada na Pérsia para o controle de piolhos desde 400 aC. Atualmente costuma ser utilizada comercialmente na forma de spray para o controle de pragas de insetos, especialmente em safras de frutas e verduras.

Os piretróides também são utilizados nas principais áreas de saúde pública. As aplicações incluem o controle de muitos vetores de doenças, como os mosquitos da malária, moscas tse-tse e moscas pretas, além do uso em setores urbanos para o controle de pragas como baratas, pulgas e percevejos. No campo veterinário são usados no controle de parasitas externos do gado, como carrapatos (OLIVEIRA FILHO, 1999).

Em insetos, a piretrina tem uma rápida ação paralisante. Dosagens inferiores à letal geralmente causam a queda do inseto; contudo, o efeito costuma ser temporário e a recuperação é completa. Insetos tratados com dosagens letais de piretrina exibem sintomas típicos de envenenamento nos nervos. Inicialmente ocorre excitação seguida por convulsões, paralisia e finalmente a morte. Esta recuperação total indica que o mecanismo de ação é reversível, além de refletir a habilidade do inseto em metabolizar de maneira eficaz pequenas quantidades de

piretrinas. O maior centro de excitação é o nervo da membrana que reage ao estímulo pelo aumento na condução de íons sódio e potássio, o que provoca a excitação. Sob circunstâncias normais, o nervo retorna ao potencial inicial pela restauração do gradiente de concentração de sódio e potássio pela membrana através de processos físico-químicos.

A alta atividade inseticida dos piretróides depende da forma e assimetria da molécula, além de sua lipofilicidade. Entre os piretróides existentes há muitas diferenças em relação a sua atividade, sendo a quiralidade da molécula muito importante. Propriedades como densidade eletrônica e polarizabilidade são de importância secundária.

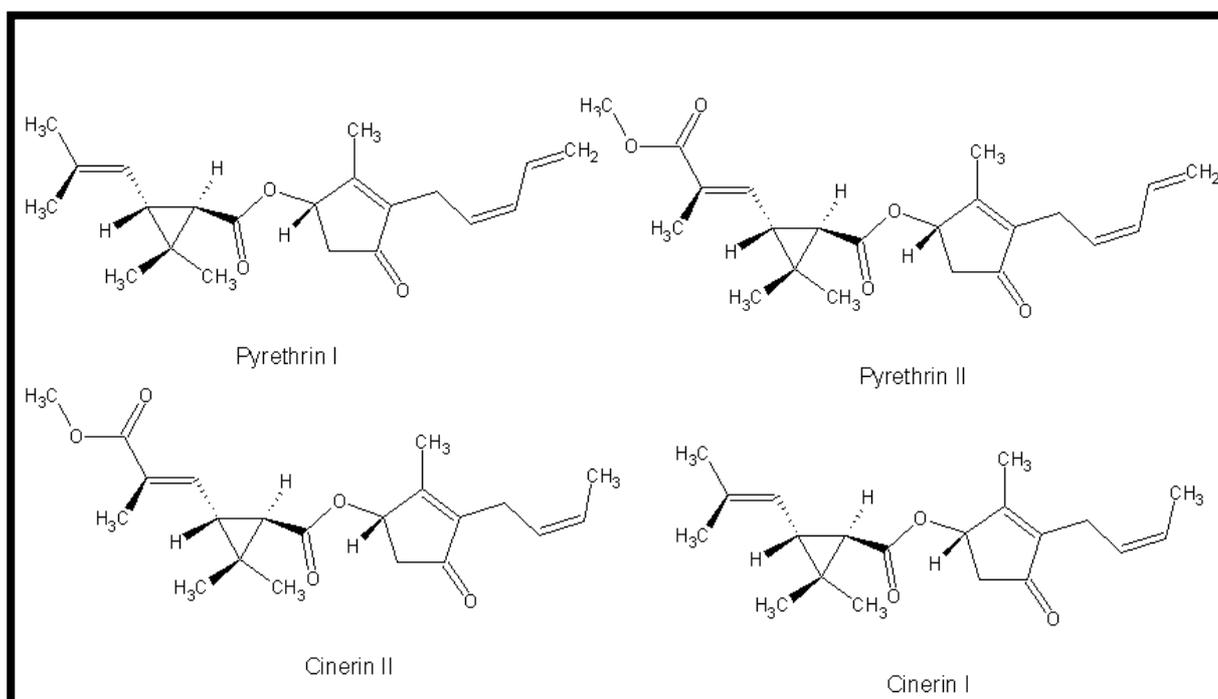


Figura 5: Exemplos de piretrinas

As piretrinas são sensíveis ao calor e à luz, sendo facilmente oxidadas. Com o aumento da pureza há um crescimento da instabilidade destas substâncias devido à remoção, durante a purificação de alguns constituintes que atuam como preservativos ou como co-solventes. Apesar de tóxica a insetos, a piretrina apresenta toxicidade oral e dermatológica muito baixa em mamíferos, sendo uma exceção aos produtos naturais com atividades biológicas (PESTICIDE MANUFACTURING AND TOXIC MATERIALS CONTROL ENCYCLOPEDIA, 1980).

Piperamidas

São derivados isobutilamídicos insaturados isolados de plantas das famílias Asteraceae (Compositae) e Rutaceae. São compostos caracterizados como pungentes, que promovem entorpecimento e salivação quando degustados.

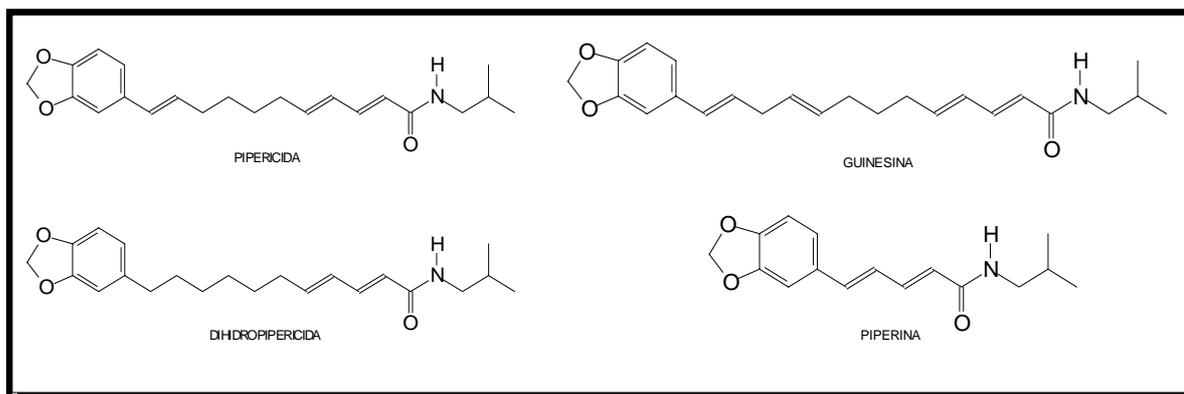


Figura 6: Exemplos de piperinas.

Pipericida, dihidropipericida e guinesina são isobutilamidas isoladas a partir do fruto da pimenta-do-reino (*Piper nigrum*), e assim como a piperina são compostos ativos como inseticidas, (Figura 06) (SIMAS, 2003).

As piperinas atuam como os piretróides, afetando o sistema nervoso derrubando rapidamente e matando o inseto. Esta semelhança é muito importante, pois apesar das piperinas agirem como os piretróides, insetos resistentes a estes não o são em relação às amidas (DE PAULA, 2000)

Cromenos

Os cromenos (benzopiranos) e os benzofuranos de diversas estruturas são extraídos de plantas, como os precocenos de algumas espécies de *Ageratum* e os acetilcromenos de girassol do deserto do gênero *Encelia*.

Os precocenos, (Figura 07), apesar de não serem utilizados como inseticidas podem ser muito úteis no controle de pragas. Esses cromenos possuem habilidade de induzir a metamorfose precoce em muitos insetos destruindo a glândula que secreta os hormônios juvenis, de forma que o inseto passe para a fase adulta sem se reproduzir.

Os acetilcromenos são capazes de reduzir o apetite de lagartas e outras larvas que atacam o algodão, até o ponto em que estas morrem de fome. Um grande número de cromenos naturais e sintetizados com atividade inseticida, tem sido estudados e nenhum dos testados apresentou efeitos de hormônio antijuvenil, característico dos precocenos.

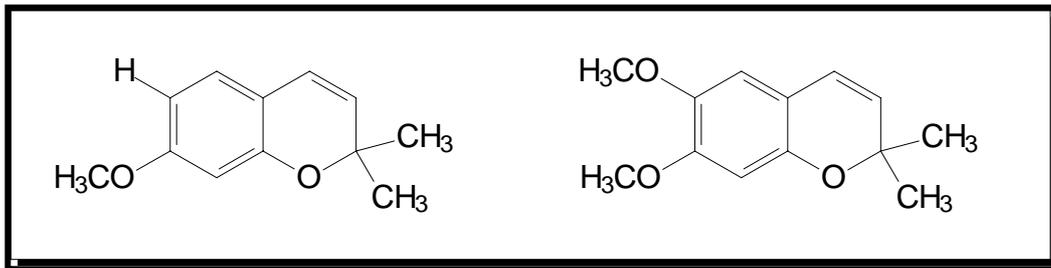


Figura 7: Exemplos de precocenos

Juvenóides

As diversas mudanças que ocorrem durante o desenvolvimento dos insetos são controladas por hormônios secretados pelo sistema neuroendócrino. As células neurosecretoras do protocérebro liberam um hormônio, freqüentemente denominado como hormônio do cérebro, que transmite neuromensagens às glândulas endócrinas e a outros tecidos, (OLIVEIRA FILHO, 1984).

Alguns desses hormônios são conhecidos como hormônios juvenis (JH), (Figura 08). Existem muitas substâncias sintéticas e naturais que imitam a ação desses hormônios e são conhecidas como análogos do hormônio juvenil. Os análogos do Hormônio Juvenil (JH), ou juvenóides, atuam de forma a suprimir a diferenciação adulta e manter os insetos na fase imatura, impedindo desta forma que eles se reproduzam. Os juvenóides podem interromper o processo de desenvolvimento do inseto, estendendo a vida deste, mas na forma juvenilizada, (OLIVEIRA FILHO, 1994).

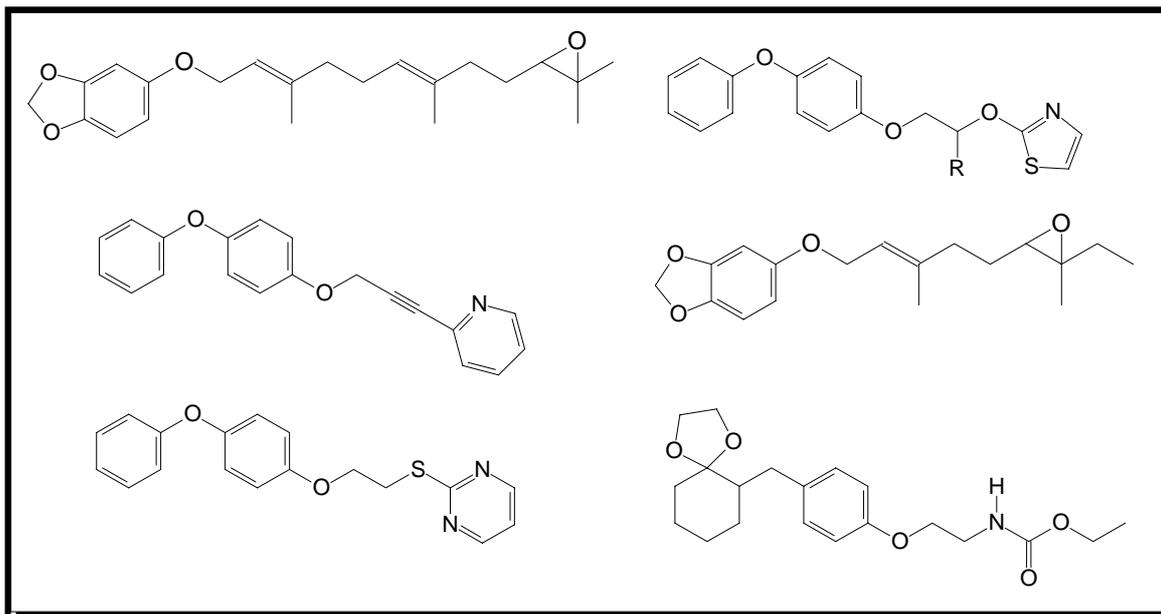


Figura 8: Exemplos de juvenóides.

A relação entre a estrutura e a atividade obtida com um grupo de insetos freqüentemente não é aplicável para outro grupo e generalizações são muito difíceis de serem feitas. Entretanto, pequenas diferenças na atividade entre espécies de mesmo gênero costumam ser observada. Geralmente os sítios de ligação nos hormônios juvenis reconhecem características estereoquímicas com alta especificidade. Um dos possíveis isômeros ópticos ou geométricos é geralmente responsável por toda a atividade morfogenética.

O tamanho total e a forma da molécula, sua lipofilicidade, a ramificação ao longo do esqueleto carbônico em posições críticas, o caráter e o local das ligações olefínicas e dos centros aromáticos, as dimensões e tipos de grupos funcionais terminais e as hidrofobicidades respectivas exercem grande influência na atividade biológica. A rigidez da molécula influencia nas possíveis conformações que o juvenóide pode adotar e pode ter um efeito principal na atividade e especificidade, (GODFREY, 1995).

Durante as primeiras cinco décadas (1940 – 1990) do uso de compostos orgânicos sintéticos na agricultura e no controle de insetos vetores de doenças, os compostos químicos baseados em produtos de origem natural forneceram uma contribuição significativa na melhora dos rendimentos e na qualidade, resultado

da disseminação desta prática. Esta contribuição é atribuída principalmente ao desenvolvimento dos piretróides, originados da piretrina, e de seus impactos no controle de pragas. Outros exemplos de produtos naturais empregados como protótipos para o desenvolvimento de inseticidas incluem fisostigmina, rianias, nereistoxina e os hormônios juvenis. (WARE, 1994).

I.2. Mosquitos de importância sanitária:

Originário da África, o *A. aegypti* (família: Culicidae, subfamília: Culicinae, tribo: Aedini, gênero: *Aedes* Meigen, 1818, espécie: *A. aegypti* Linnaeus, 1762) pode ser encontrado no domicílio humano (ambos os sexos em proporções semelhantes), onde obtêm seus alimentos, copulam e desovam. Tanto os machos como as fêmeas se alimentam durante o dia. Nos mosquitos adultos, as fêmeas são hematófagas, enquanto os machos se alimentam de sucos vegetais. Seus criadouros são recipientes artificiais representados principalmente por pneus, caixas d'água, latas, vidros, pratos de vasos e xaxins ou mesmo lagos artificiais, piscinas e aquários abandonados, com a condição de que a água armazenada seja limpa e pobre em matéria orgânica em decomposição. Também pode ser encontrado em recipientes naturais como bromélias, bambús e outros como a carapanaúba, árvore do gênero *Aspidosperma* que armazena a água em uma depressão no tronco (*carapanã*-mosquito e *uba*-árvore).

A densidade populacional é diretamente influenciada pelas chuvas, embora possa ser mantida uma população considerável durante as estações menos chuvosas, a custa dos criadouros semipermanentes ou independentes das chuvas. No Brasil, o *A. aegypti* é o único vetor conhecido de febre amarela urbana e é também o único transmissor da dengue, em nossos dias (CONSOLI, 1994).

A febre amarela, embora causada por um mesmo tipo de arbovírus (um Flavivirus), pode se manifestar de duas formas: Febre Amarela Silvestre e Febre Amarela Urbana. Devido a sua elevada endofilia, antropofilia e susceptibilidade ao vírus da febre amarela, o *A. aegypti* é um excelente vetor para a forma urbana da doença. É considerado o vetor clássico dessa arbovirose. A febre amarela urbana foi considerada extinta do país desde 1942, quando ocorreram seus últimos casos, em Sena Madureira, no Acre. Sua última epidemia na América, produzida a custa do *A. aegypti*, aconteceu em 1929. Por outro lado, pouco após sua

reintrodução no Brasil, o *A. aegypti* iniciou uma progressiva e alarmante propagação da dengue.

A dengue também é causada por um Flavivirus (4 soro-tipos: D1, D2, D3 e D4). Epidemias ou surtos de dengue foram desencadeados e mantidos a custa do *A aegypti* em Roraima (D1 e D4); no Rio de Janeiro e Alagoas (D1 e D2), Ceará, Minas Gerais, Bahia, Pernambuco, São Paulo e Mato Grosso do Sul (D1) e Tocantins (D2). A epidemiologia da dengue no Brasil, pelo aspecto entomológico, em tudo se assemelha à da febre amarela urbana, e sua atual distribuição coincide com a do *A aegypti*, seu único vetor natural comprovado. Tanto na febre amarela urbana como na dengue pode acontecer transmissão vertical do vírus, de maneira que uma parcela das fêmeas filhas de um espécime infectado, já nasce infectada, (Figura 10).

O *C. quinquefasciatus* (família: Culicidae, subfamília: Culicinae, tribo: Culicini, gênero: Culex Linnaeus, 1752, espécie: *C. quinquefasciatus* Say, 1823) é encontrado nas Américas, sempre em lugares habitados, nas cidades e vilas rurais. Seus criadouros preferenciais são os depósitos artificiais no solo ou em recipientes com água rica em matéria orgânica em decomposição e detritos, de aspecto sujo e mal cheiroso. Ocorrem em latas, bebedouros de animais, nas águas estagnadas e poluídas no solo, como valas de águas servidas principalmente em residências, fossas, ralos, poços, cisternas, impressões de pneus e patas de animais.

Além de dividir com o *A. aegypti* o mesmo ambiente e atuar em horários diferentes deste, ambos apresentam algumas diferenças biológicas, como, por exemplo, suas larvas se encontrarem em águas com matéria orgânica em decomposição, enquanto as do *A. aegypti*, em águas limpas. Os ovos de *C. quinquefasciatus* são depositados diretamente sobre as águas dos criadouros em forma de jangadas, e se tornam inférteis fora dela; os de *A aegypti* (resistentes a dessecação) são depositados individualmente. O *C. quinquefasciatus* é o principal vetor da filariose bancroftiana no Brasil. Sua predileção pelo homem (único hospedeiro da *Wuchereria bancrofti*) e a sua preferência por sugar durante a noite (período de aumento da microfilaremia periférica) facilitam muito o contato das microfilárias com este culicíneo, tornando-o mais eficaz que os outros mosquitos susceptíveis. Hoje em dia a filariose vem se tornando um sério problema em Recife, Jaboatão e Olinda, no Estado de Pernambuco e em Maceió, Alagoas. No

Brasil o *C. quinquefasciatus* é considerado o vetor secundário do vírus Oropouche (CONSOLI, 1994).



Culex quinquefasciatus

Fonte: www.west-nile-virus-prevention.com/species.html



Anopheles darlingi

Fonte: fme1.ifas.ufl.edu/gallery.htm



Aedes albopictus

Fonte: www.med.sc.edu:85/mhunt/dengue-aedes.jpg



Aedes aegypti

Fonte: www.embasa.ba.gov.br/dengue.htm

Figura 9: Principais mosquitos de Importância Sanitária no Brasil

O melhoramento das condições sanitárias do ambiente, através da eliminação dos locais de criação é um dos melhores métodos de controle de vetores, assim como alternativas naturais como repelentes e inseticidas que não agridam a saúde e nem o meio ambiente. A Figura 9 mostra algumas das espécies de mosquitos citadas acima.

A importância sanitária dos mosquitos *A. aegypti*, transmissor da dengue e febre amarela, e *C. quinquefasciatus*, transmissor da filariose, além de *A. darlingi*, transmissor principal da malária, gerou a motivação para a busca de novas alternativas ao controle de vetores.

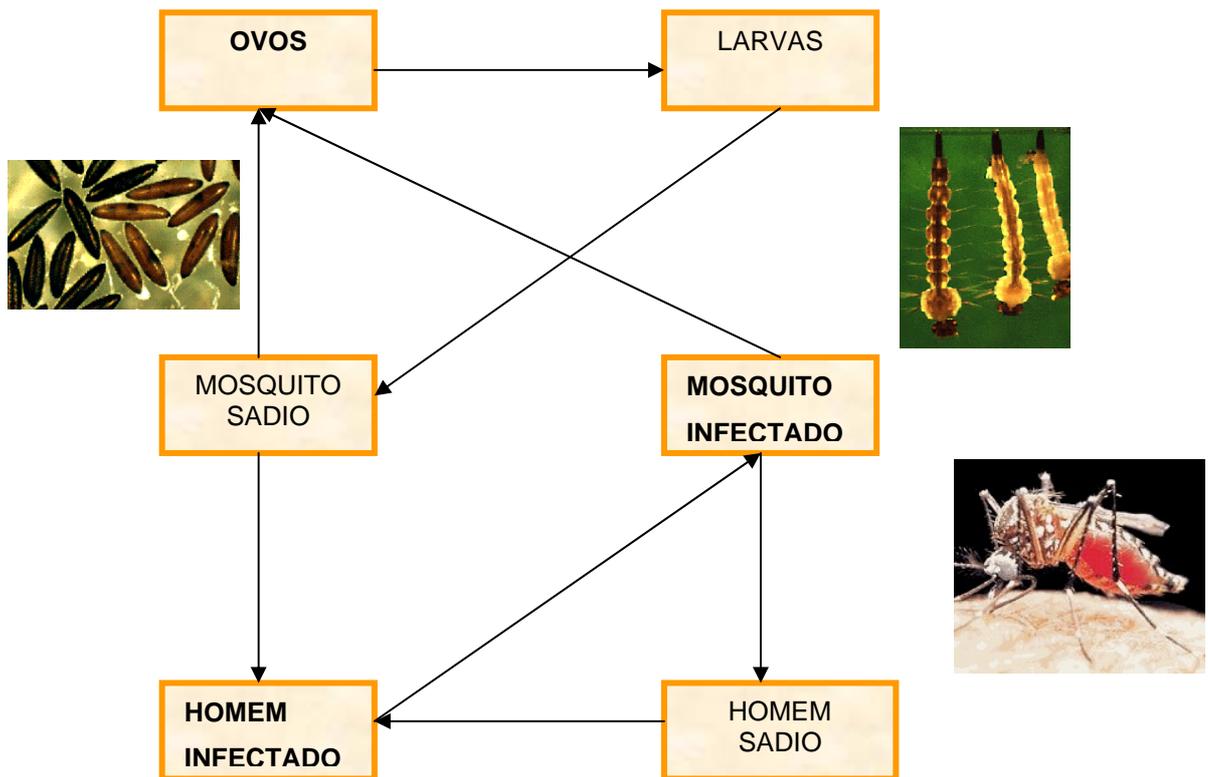


Figura 10: Ciclo de Transmissão do vírus do dengue (DE LEÃO, 1997).

I.3. Famílias Palmae e Leguminosae: Importância Econômica e Fonte de Produtos Naturais Ativos Sobre Insetos.

I.3.1. Família Palmae

As palmeiras são plantas monocotiledôneas da família Palmae, abrangendo cerca de 2500 a 3500 espécies em 200 a 236 gêneros. O número exato de espécies é muito contraditório, dependendo dos autores, mas compreendem um grupo diverso e significativo que varia da quarta a quinta posição em escala de tamanho para Monocotiledôneas. Recentemente foi determinado que seriam aproximadamente 200 gêneros e se forem incluídas as híbridas naturais, variedades botânicas e subespécies, ultrapassariam a 300 (HENDERSON, 1995).

Classificação taxonômica:

Divisão: Angiospermae,

Classe Liliopsida (Monocotiledônea), subclasse Arecidae,

Superordem: Areciforae, ordem Arecales,

Família Palmae Juss. (1789),

Nome alternativo: Arecaceae Schultz-Schultzenst

Outros menos usados: Borassaceae Schultz Sch. (1832), Cocosaceae Schultz Sch. (1832), Coryphaceae Schultz Sch. (1832), Sabalaceae Schultz Sch. (1832), Sagaceae Schultz Sch. (1832), Phoenicaceae Burnett. (1835), Phytellephaceae Mart. ex Perleb. (1838), Calamaceae Kunth ex Perleb (1838), Nypaceae Brongn. ex Le Maout & Decne. (1868), Manicariaceae F. Cook (1913), Acristaceae F. Cook (1913), Ceroxylaceae F. Cook (1913), Genomaceae F. Cook (1913), Iriarteaceae F. Cook (1913), Lepidocaryaceae F. Cook (1913), Malortieaceae F. Cook (1913), Pseudophoenicaceae F. Cook (1913) e Synechantaceae F. Cook (1913).

A variação do número de espécies surgiu dos desacordos entre botânicos no delineamento das fronteiras de gêneros e espécies. A classificação de Engler (1964) descreve 236 gêneros da família, divididos em 9 subfamílias e 28 tribos e a de Dransfield e Uhl (1968) mostra 198 gêneros, 6 subfamílias, 14 tribos e 35 subtribos

A palavra palma é de origem remota. Os povos itálicos aplicavam-na à tamareira (*Phoenix dactylifera*) da África Mediterrânea e do Oriente Médio. Os gregos chamavam-na de fóinix, palavra de origem fenícia. Essa palavra, por influência árabe e aramaica, foi aplicada à antiga cidade de Palmira, com o significado de “cidade onde havia palmas”. Esta família juntamente com as árvores, arbustos, gramados e plantas rasteiras, constitui elementos componentes de parques e jardins em climas mais quentes. São as plantas mais características da flora tropical, com capacidade de transmitir ao meio em que são cultivadas algo do aspecto exótico e do fascínio das regiões tropicais. As palmeiras atingem a sua melhor proliferação nos trópicos e estão amplamente distribuídas nas zonas temperadas menos frias de todo o mundo, principalmente onde é alto o índice pluviométrico (LORENZI, 1996).

São consideradas as aristocratas do reino vegetal pelo porte altaneiro e elegante que as distingue facilmente de outras plantas características estas que

as levou a integrar em a ordem Principes da Sistemática Vegetal, alusiva à posição nobre que ocupam no reino vegetal (DRANSFIELD, 1986).

As palmeiras estão entre as plantas mais antigas do globo, plantas terrestres ancestrais, com fósseis datando do período cretáceo. Grãos de pólen de “mangrove Palm”, *Nypa fruticans*, foram encontrados em Londres em sedimentos do período Eoceno, de cerca de 50 milhões de anos atrás. Também presente nos mesmos sedimentos o pólen de “Rattan Palm”, *Calamus daemonorops*; o fruto da espécie de *Oncosperma* e de uma espécie de Sabal; e sementes parecidas com “Fishtail Palm”, *Caryota* (STEWART, 1994). Nem sempre foram tropicais, pois no Oligoceno e Mioceno, as palmeiras que hoje estão limitadas as regiões da Ásia tropical ocorriam na Europa Ocidental e, atualmente, várias espécies ainda são encontradas fora das regiões sub-tropicais. A maior ocorrência de gêneros e espécies verifica-se nas regiões tropicais da Ásia, Indonésia, Ilhas do Pacífico e Américas. O continente africano é pobre em palmeiras, e é notável o fato de Madagascar, ao lado deste continente, mas que não fazia parte dele em tempos remotos, contar com um grande número de espécies (www.fao.org/forestry/FOR/FORM/FOGENRES/GENRESBU/web26-en/palms.stm).

No Brasil, a chamada Zona dos cocais abrange extensas regiões do norte e nordeste, caracterizando-se pelos babaçuais, carnaubais e buritisais e, em direção ao oeste, os carandasais. As demais regiões do país apresentam-se salpicadas de diferentes espécies: na Amazônia pelos buritis, tucumãs, injás, marajás, jarinas, açaiás; jervás, juçaras, butiás; no centro-leste pelos licuris, buris; em certos trechos da Serra do Mar pelos indaiás, icás, patis e à beira-mar pelos guriris, tucuns. Estranhamente, registram-se no interior de São Paulo, duas formações isoladas e densas de uma espécie de *Attalea* a que chamam de babaçu (BARBOSA RODRIGUES, 1903).

Trata-se de uma família com grande importância econômica (óleos comestíveis de polpa e nozes, coco, cera de carnaúba, etc.) e medicinal (*Serenoa repens*). Muitas das quase 3500 espécies conhecidas como palmeiras são importantes economicamente como alimento, produzindo não somente óleos e gorduras mas também sagu, palmito, vinhos e para diversos fins como fibras, roupas, madeira, combustíveis e material p/ construção, (FERREIRA, 1978; PRANCE, 1995).

Dentre as palmeiras mais importantes estão:

***Cocos nucifera* L. coqueiro**

Originária da Malásia, mas amplamente distribuída nas regiões costeiras tropicais. Os frutos fornecem uma deliciosa água muito nutritiva e bastante apreciada. A polpa é comestível quando o fruto está maduro ou verde. Fornece ainda a gordura de coco e o leite de coco, que são utilizados na culinária. Do fluido do pendúnculo da flor faz-se o vinho de palmeira e vinagre; cestas e esteiras são feitas das folhas; o tronco fornece madeira (Figura 11).



www.surf-mexico.com/states/Guerrero/nature/coconut.htm

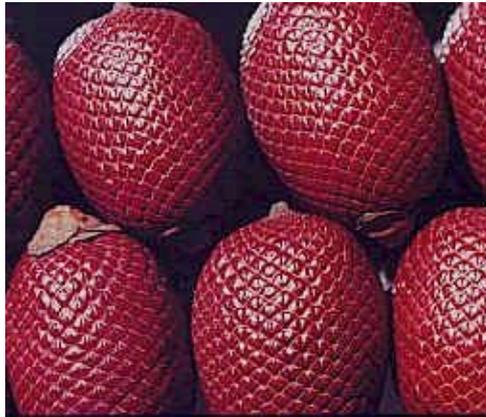
Figura 11: *Cocos nucifera* L.

***Serenoa repens* (Bartram) Small. - “Saw Palmetto”.**

www.roddyscheer.com/saw_palmetto.html

Figura 12: *Serenoa repens* (Bartram) Small

Originário do sudeste dos Estados Unidos e Índias Ocidentais possui o tronco resistente à água, é usado para empilhamento de materiais molhados, as árvores crescem para sombreamento, cestas e esteira são feitas das folhas, e escovas duras dos galhos, sendo uma espécie de grande importância medicinal, pois é utilizada no tratamento da hiperplasia prostática benigna (HPB), (PLOSKEK, 1996) uma doença que está acometendo grande parte da população mundial masculina após os 50 anos.

***Mauritia flexuosa* L. - Buriti, Miriti, Carandá-guassú.**

www.meioambientehp.hpg.ig.com.br/



www.fundaj.gov.br/docs/iesam/mhn

Figura 13: *Mauritia flexuosa* L.

Possui tronco solitário, ereto, 3 a 25 m de altura, seus frutos são cobertos por escamas, ocorre no Amazonas, Bahia, Ceará, Goiás, Maranhão, Minas Gerais, Pará e Tocantins. Espécie típica de solos alagados ou de lugares úmidos conhecidos como “veredas” no Brasil central.

O pecíolo das folhas é utilizado para artesanato, da polpa extrai-se vinho e faz-se doce.

***Euterpe oleracea* Mart.- Açaí, Uaçáí.**

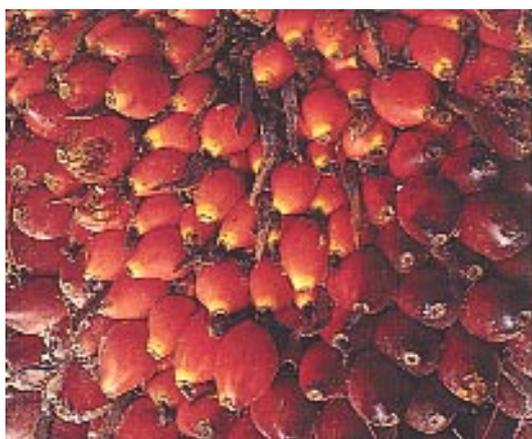
Fonte: www.amazon.com.br/camta/acaiRio.htm

Figura 14: *Euterpe oleracea* Mart

O açaizeiro é uma palmeira característica das várzeas e margens dos rios amazônicos e das ilhas próximas à foz. De estipe (tronco) delgada, pode atingir até 30 metros de altura. Suas folhas, de coloração verde-escura, chegam a 2 metros de comprimento. As flores desabrocham de setembro a dezembro, época da "seca" (de fevereiro a maio ocorre o período de maior precipitação em Marajó, quando dois terços da ilha ficam submersos), embora possa aparecer o ano todo. Cada palmeira produz de três a quatro cachos. Cada um deles, de 3 a 6 quilos de frutas (www.fieam.org.br/invest/acai.htm)

Da planta, aproveita-se tudo, principalmente palmito e frutas, das quais se extrai o vinho, ou suco. Verdadeira instituição cultural no Pará, o vinho - o caldo

de cor roxa intensa obtido com a maceração da polpa da fruta - está presente nos costumes e nas manifestações musicais e artísticas da população. In natura ou misturado com farinha d'água, farinha de tapioca ou açúcar, é consumido todos os dias pela população como complemento de sua alimentação diária, após as refeições, ou como acompanhamento de peixes, arroz, feijão, charque e demais pratos da culinária regional. O Pará responde por 95% da produção nacional, calculada em 130 mil toneladas, segundo a Secretaria da Agricultura do Estado. No Rio de Janeiro, o mercado atinge 500 toneladas por mês, principalmente no verão. Em São Paulo, os números são mais modestos (150 toneladas/mês), mas a tendência é de crescimento. Segundo técnicos, o açaí de melhor consistência, cor e sabor vem da região delimitada pelo estuário dos rios Amazonas, Tocantins e Pará, onde fica a Ilha de Marajó e, a sudeste dela, a cidade de Muaná, vocábulo herdado de uma tribo homônima que significa, em tupi, "semelhante à cobra", (www.agro-fauna.com.br/culturas.php?cultura=82).

***Elaeis guineensis* N. J. Jacquin – Dendzeiro.**

Fonte: www.cpgp.ufpa.br/gibi/bm.htm

[www.phuketmagazine.com/html/ Industries/Oil%20Palm.htm](http://www.phuketmagazine.com/html/Industries/Oil%20Palm.htm)

[www.foodmuseum.com/ oilpalm.html](http://www.foodmuseum.com/oilpalm.html)

Figura 15: *Elaeis guineensis* N. J. Jacquin

Na África constitui uma importante fonte de renda para as populações locais. Além do uso na alimentação, o óleo de dendê pode ser empregado na fabricação de velas, sabões duros, lubrificantes, glicerinas farmacêuticas e outros.

Extrai-se o óleo da polpa do fruto, amarelo-avermelhado, de sabor doce e consistência pastosa. O óleo da amêndoa é branco ou ligeiramente amarelado, quase sem cheiro e sabor (um pouco amargo). Palmeira de até 20m de altura,

estipe simples, anelado, ereto, quase negro, com as cicatrizes das folhas antigas bem visíveis, conservando a base dos pecíolos das folhas que são pinadas, de até 5m de comprimento (LORENZI, 1996).

Originária do centro da África, a palmeira do dendê, chamada “dem-dem” em Angola, foi introduzida e adaptada em todas as regiões tropicais do globo. No Brasil, as primeiras sementes do dendezeiro foram trazidas para a América, há mais de três séculos, pelos antigos escravos africanos. Na mesma época, foram trazidas, também, outras importantes iguarias e especiarias, como as bananas, os quiabos, a erva-doce, o gergelim e algumas pimentas. O azeite-de-dendê, matéria-prima essencial dessa culinária, é produto extraído da polpa do fruto do dendezeiro. Seus frutos, cocos não muito grandes, nascem negros e, quando maduros, alcançam uma coloração que varia do amarelo forte ao vermelhosado, passando por matizes de cor alaranjada e ferrugem. O dendezeiro é a oleaginosa tropical de maior rendimento existente, chegando a produzir dez vezes mais óleo/hectare do que a soja, quatro vezes mais do que o amendoim e duas vezes mais do que o coco-da-baía. De seus frutos obtêm-se duas qualidades diferentes de óleos, com usos também diversos. O azeite-de-dendê (palm oil em inglês) tem sabor doce, cheiro forte e consistência densa. Além de sua larga aplicação culinária, esse óleo tem usos na indústria química e metalúrgica, quando refinado, desodorizado e branqueado, é também matéria-prima para a industrialização de maioneses e margarinas. O nobre óleo de palmiste (palm kernel oil), por sua vez, é produto extraído da amêndoa do fruto do dendezeiro, tendo aplicações na indústria cosmética e na produção de chocolate, onde pode substituir a manteiga de cacau, alcançando altos preços no mercado internacional. No Brasil, atualmente, as maiores plantações de dendê estão concentradas no Pará, no Amazonas, no Amapá e na Bahia. Como ingrediente da culinária baiana, o azeite-de-dendê foi empregado com sabedoria ancestral, de origem sagrada, nascida nos Candomblés da África negra. Até os dias atuais, este elemento tem sido parte fundamental na elaboração dos principais pratos da cozinha baiana, (www.mpopc.com.br/5_nutricao.htm).

Do ponto de vista químico, os estudos foram feitos com espécies brasileiras de palmeiras concentrando-se mais na área de glicerídeos dos óleos

de polpa. Alcalóides podem estar presentes, geralmente pirimidínicos; os flavonóides polihidroxilados são frequentes, como kaempferol, quercetina, tricina, luteolina; saponinas e sapogeninas; triglicerídeos de ácidos graxos saturados e insaturados, principalmente dos ácidos palmítico, láurico, esteárico, linoleico e oleico (HEIM DE BALSAC, 1931; WILLIAMS, 1973; HARBORNE, 1981; GLASSMAN, 1983; LUBRANO, 1994; LUBRANO, 1997).

As palmeiras no seu local de ocorrência podem ser componentes dominantes da vegetação. Apesar da ampla distribuição da família e da frequência das palmeiras nos trópicos, poucos gêneros possuem muitas espécies e/ou são espalhados. De fato, muitos gêneros de palmeiras contêm cinco ou menos espécies e gêneros monotípicos são comuns. A maior parte dos gêneros está proliferada em áreas relativamente restritas.

I.3.1.1. Gênero *Attalea*

Originário da América do Sul, o gênero *Attalea* é constituído de cerca de 40 espécies, grandes, robustas, solitárias e que não apresentam espinhos, podendo chegar até 30 m de altura. É uma planta monóica, com inflorescência interfoliar que é toda envolvida por uma longa espata acanoada, lenhosa e persistente (BARBOSA RODRIGUES, 1903).

I.3.1.2. Descrição Botânica do Gênero

Attalea Kunth, in Humb., Bonpl. e Kunth, Nov. Gen. et Sp.Pl. 1: 309. 1816.

Sinonímia: *Scheelea* H. Karsten, Linnaea 28: 264. 1857.

Palmeiras monóicas, inermes, caulescentes ou acaulescentes, de pequeno a grande porte, estipe solitário, raramente cespitoso, curto e subterrâneo ou aéreo e ereto, robusto a massivo, liso ou parcialmente obscurecido por bainhas foliares persistentes. Folhas pinadas, reduplicadas; bainha aberta, sem formação de pseudocaule; pecíolo curto ou alongado, raramente ausente; raque alongada; pinas lineares ou linear-lanceoladas, aristadas, às vezes com aurícula na base, regular ou irregularmente arranjas na raque, dispostas em um ou vários planos. Inflorescência interfoliar, ramificada ou espigada; inflorescências

predominantemente estaminadas, predominantemente pistiladas com flores estaminadas estéreis ou raramente inflorescências com flores estaminadas e pistiladas, todos os tipos podendo ocorrer simultaneamente em uma mesma planta; pedúnculo originando um profilo e uma bráctea peduncular lenhosa sulcada externamente; raque originando numerosas ráquias simples, raramente inflorescência pistilada espigada com ráquias curtas desenvolvendo-se em apenas um lado da raque. Flores nas inflorescências estaminadas desenvolvendo-se singularmente ou em pares em toda a ráquila, sendo geralmente ausentes na face adaxial; nas inflorescências bissexuais as flores pistiladas são isoladas ou formam escassas tríades na base das ráquias, apicalmente apenas flores estaminadas singulares ou em pares; nas inflorescências pistiladas as flores frequentemente estão ausentes da face adaxial e ocorrem isoladas na base das ráquias ou estão inseridas diretamente na raque, sem vestígio aparente de flores estaminadas; flores estaminadas com 3 sépalas livres; 3 pétalas mais longas que as sépalas, livres, de secção achatada ou circular; 6-7 estames com filamentos retos; pistilódio diminuto; flores pistiladas com 3 sépalas livres e imbricadas; 3 pétalas mais longas que as sépalas, livres e imbricadas; anel estaminodial presente; gineceu sincarpo, 3 ou mais lóculos, 3 ou mais óvulos. Frutos globosos, ovóides, oblongo-elipsóides ou oblongo-ovóides; resíduo estigmático apical; epicarpo liso fibroso e firme; mesocarpo delgado a espesso, carnoso e fibroso; endocarpo espesso e lenhoso, com fibras internas distintamente arranjadas. Uma ou mais sementes; endosperma homogêneo; embrião basal, (www.nybg.org/bsci/acre/attalea.html).

Attalea é membro da subtribo Attaleinae, que inclui *Maximiliana*, *Orbignya* e *Scheelea* (Uhl and Dransfield, 1987). A taxonomia desse grupo ainda é confusa e existem disputas quanto a validade destes gêneros e o número de espécies a ser reconhecidas em cada um deles (Wessels Boer, 1965, 1988; Uhl and Dransfield, 1987; Henderson, 1995; Henderson et al., 1995).

Attalea speciosa Mart. ex Spreng. - Babaçu, Aguaçu, Bauaçu.



Fonte: Lorenzi, 1996

Figura 16: *Attalea speciosa* Mart. ex Spreng

Babaçu é uma planta famosa pelo seu alto grau de aproveitamento. Todas as suas partes apresentam algum tipo de utilidade. Apesar de ser tão versátil e aproveitável, a maioria de suas partes não é aproveitada comercialmente, mas sim de uma forma doméstica, principalmente nas regiões Norte e Nordeste do Brasil. Quanto ao seu aproveitamento industrial, a parte mais utilizada é a amêndoa, que representa cerca de 6% do peso do coco.

Muito utilizado na indústria alimentícia, não só no Brasil, mas no exterior, o óleo da amêndoa de babaçu é um produto de exportação.

As possibilidades são muitas e a criatividade dos pesquisadores acaba sempre descobrindo novas formas de utilização para cada uma das partes de babaçu. Para se ter uma idéia de algumas outras utilizações, por exemplo, a sua parte fibrosa pode ser utilizada como adubo, como também o caule, quando este acaba ficando "podre". Como utilizações mais domésticas e, normalmente, restritas às áreas produtoras temos a produção do chamado "vinho de babaçu",

que é uma bebida feita com a seiva fermentada. Além disso, produz-se um leite de coco, feito com as amêndoas torradas.

Babaçu é uma grande referência na economia das regiões Norte e Nordeste. Existem centenas de milhares de pessoas envolvidas de maneira direta ou indireta na produção de babaçu, o que faz com que essa planta tenha um produto de valor inestimável e incomensurável: a importância social e o valor da sobrevivência de um povo.

***Attalea excelsa* Mart. ex Spreng. - Urucuri, Acuri, Bacuri.**



Fonte: Lorenzi, 1996

Figura 17: *Attalea excelsa* Mart. ex Spreng

O urucuri possui tronco simples e curto, podendo chegar a 8 m de altura, geralmente cobertos por restos de pecíolo. Suas longas folhas são pinadas, muito ereta, medindo de 2 a 4 metros, produz frutos grandes que podem chegar a até 10 cm. *Attalea excelsa* é natural das várzeas altas desde o Acre e o Rio Purus do oeste amazônico até o baixo Amazonas no Pará e Amapá (de onde veio o material). A ocorrência estendendo até o Planalto Central, desde Acre até São Paulo. No Pantanal matogrossense forma os famosos acurizais.

Apresenta várias sinônimas: *Attalea phalerata* Mart. ex Spreng; *A parviflora* Barb. Rodr., *A princeps* Mart, *Scheelea amylaceae* Barb. Rodr., *S. anissitiana*

Barb. Rodr, *S. corumbaensis* (Barb. Rodr.) Barb. Rodr., *S. lauromuelleriana* Barb. Rodr., *S. leandroana* Barb. Rodr., *S. martiniana* Burret, *S. microspadix* Burret, *S. parviflora* (Barb. Rodr.) Barb. Rodr., *S. phalerata* (Mart. ex.Spreng) Burret, *S. princeps* (Mart.) H. Karst., *S. quadrisperma* Barb. Rodr., *S. quadrisulcata* Barb. Rodr. (LORENZI, 1996).

As brácteas secas do urucuri são importantes ferramentas usadas pelas comunidades ribeirinhas amazônicas para afugentar mosquitos. Estas são acesas e presas na altura da cintura, sempre quando se vai entrar na floresta ou dentro das casas (MORS, 1966). Este comportamento nos direcionou para o trabalho fitoquímico com as brácteas. Para a verificação da atividade repelente decidimos utilizar o *Aedes aegypti*, pertencente à mesma família dos anofelinos, espécie comum destas regiões.

Suas folhas são usadas para cobertura, em alguns estados amazônicos seu endocarpo é fonte de carvão para o preparo da borracha. O mesocarpo comestível é aproveitado pela fauna silvestre (LORENZI, 1996).



www.esalq.usp.br/trilhas/palm/palm22.htm

Figura 18: *Attalea excelsa* Mart. ex Spreng, brácteas, frutos e amêndoas

***Attalea funifera* Mart. ex Spreng - Piaçava, Piassaba-da-bahia.**



Fonte: www.ceplac.gov.br/piacava.htm

Figura 19: *Attalea funifera* Mart. ex Spreng

De modo geral, as piaçavas podem ser divididas em duas espécies: a *Attalea funifera* Mart. e *Attalea acaulis* Mart., a primeira ocorre naturalmente no litoral baiano, conhecida como Leopoldina, piassaba wallace ou piaçava-do-Pará, característica da região do Alto Rio Negro, no Amazonas, e norte do Pará. A segunda encontrada desde os terrenos arenosos, de clima seco, do litoral norte do estado, até perto da fronteira com Sergipe, embora alguns autores achem que se trata da mesma *Attalea funifera*, em condições de deficiência de água e nutrientes (www.ceplac.gov.br/diversificacao.htm).

No Brasil, a exploração de piaçaveiras é uma atividade extrativista, tanto na Amazônia quanto na Bahia, estado que responde por cerca de 90% da produção nacional de fibra, usada para fabricar vassouras, escovas dentre outros.

Tradicionalmente, os produtores deixam as fibras e borra secando na mata, não adubam nem usam nenhum fertilizante ou outro produto químico. É uma

planta que se adapta bem a solos pobres e não é exigente em nutrientes ou pH. Só faz questão de clima quente e úmido, sem estação seca definida, e umidade relativa do ar ao redor dos 80%.

No ano passado, o Brasil (a Bahia) produziu 622 mil arrobas de piaçava, ou 9.329 toneladas, boa parte das quais exportada para Portugal, Alemanha, Holanda e Estados Unidos, que a utilizam no fabrico de escovas para máquinas de varrer rua e vassouras de uso doméstico. Tanto na Europa quanto nos Estados Unidos, a piaçava é preferida no lugar do náilon que, em atrito com o solo, esquenta demais e retorce sobre si mesmo, perdendo a flexibilidade, ao contrário da piaçava, que se mantém elástica e firme.

Cada palmeira da espécie *Attalea funifera* atinge de 12 a 15 metros de altura, começa a produzir a partir dos 7 anos e rende de 8 a 10 quilos de fibras anualmente, durante uma década de vida útil, estas aproveitada como cobertura de quiosques, choupanas, barracas, instalações rurais e casas de veraneio. A piaçaveira tem outras utilidades: além das fibras fazem-se as já mencionadas para vassouras de uso doméstico ou industrial (vassouras mecânicas), fazem-se escovas, cordas para amarrar navios, cordões, cestos, alçapões de pesca, balaios, invólucros para garrafões e moringas etc., funcionando também como excelente isolante térmico. As folhas são usadas para fazer chapéus de palha e bolsas. A amêndoa, aproveitada pela população costeira da Bahia como alimento na canjica, por exemplo, também se presta à produção de óleo, embora seu rendimento seja menor que o de outros produtos de origem vegetal. Também pode ser uma excelente opção para a produção de carvão vegetal. Durante a Segunda Guerra Mundial, os frutos da palmeira catolé (*Attalea compta*), bastante semelhantes aos da piaçava, foram utilizados como carvão pela Marinha Mercante. O bagaço que sobra do beneficiamento é destinado à indústria de papelão, e da casca do coco faz-se "farinha de satim", utilizada no preparo de cuscuz e mingaus, (www.seagri.ba.gov.br).

I.3.2. Família Leguminosae-Papilionoideae

Alternativamente *Fabaceae* Lindl, *Papilionaceae* Giseke

Família de ampla distribuição geográfica representada por 650 gêneros aproximadamente e mais de 18 000 espécies subordinadas a três subfamílias diferentes entre si, separadas por alguns botânicos em três famílias independentes pertencentes à ordem Leguminales, cada subfamília compreendendo tribos que subordinam certo número de gêneros (BARROSO, 1978).

As espécies das subfamílias Caesalpinioideae e Mimosoideae são principalmente tropicais e as da Faboideae encontram-se mais frequentemente nas regiões temperadas. Essa subfamília abrange espécies com características consideradas mais avançadas dentro das Leguminosae. (BARROSO, 1991).

I.3.2.1. Gênero *Pterodon*

O gênero *Pterodon* compreende cinco espécies nativas brasileiras: *P. abruptus* Benth, *P. apparicioni* Pedersoli, *P. emarginatus* Vog., *P. pubescens* Benth e *P. polygalaeflorus* Benth. A investigação química das cinco espécies foi motivada pela descoberta da ação cercaricida do óleo do fruto de *P. pubescens* Benth (MAHAJAN, 1973), bem como das quatro outras espécies (FASCIO, 1976), além de atividade antimicrobiana *in vitro* obtida do óleo de *P. pubescens* Benth (NETO, 1973).

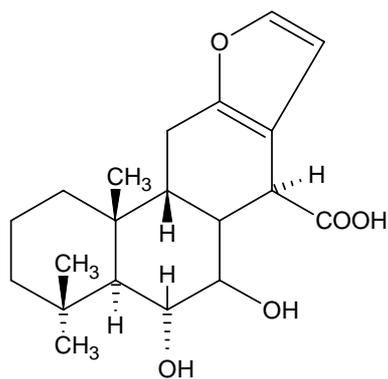
Na década de 60, o 14,15-epoxigeranilgeraniol foi isolado do óleo dos frutos de *P. pubescens* e mostrou ser eficiente como agente quimioprolático na esquistossomose (MORS, 1967). Em 1970, novos diterpenóides foram obtidos de *P. emarginatus* (MAHAJAN, 1970). No mesmo ano, dois novos terpenos foram isolados do óleo do fruto de *P. pubescens* (FASCIO, 1970).

De acordo com o estudo químico de leguminosas brasileiras foram isoladas isoflavonas de *P. pubescens* (BRÁZ FILHO, 1971) e *P. apparicioni* (GALIRA, 1974) e diterpenóides da espécie *P. emarginatus* (MAHAJAN, 1972).

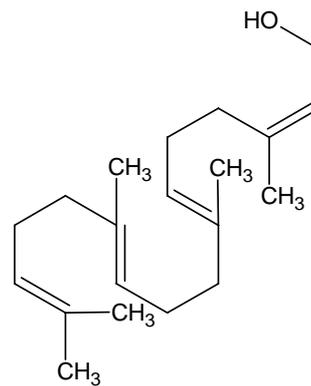
Os diterpenos encontrados nas espécies *P. pubescens* foram eficientes na profilaxia da esquistossomose (DOS SANTOS FILHO, 1972). Quatorze diterpenos furânicos foram descritos e isolados do óleo do fruto do gênero

Pterodon, entre outras substâncias, das quais quatro pertencem a espécies de *P. polygalaeflorus* Benth (FASCIO, 1976), (Figura 12).

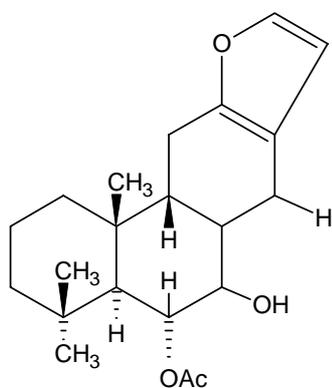
Do extrato hexânico de sementes de *P. polygalaeflorus* Benth, foi obtido óleo essencial por arraste de vapor, no qual os seguintes constituintes foram identificados: α -copaeno, β -cariofileno, α -humuleno, γ - e δ -cadieno (CAMPOS, 1994). Da fração insaponificável do extrato etanólico de sementes, foi isolado e identificado o ácido $6\alpha,7\beta$ -diidroxivouacapan-17-óico. Dando prosseguimento ao estudo fitoquímico das referidas espécies, foi isolado o diterpeno vouacapânico: 6α -hidroxi- 7β -acetoxivouacapan-14(17)-eno (CAMPOS, 1994).



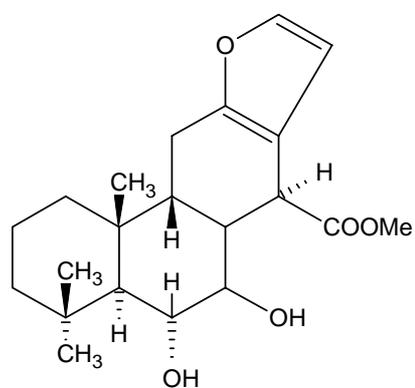
Ácido 6 α ,7 β -dihidroxiouaca-pan-17 β -óico



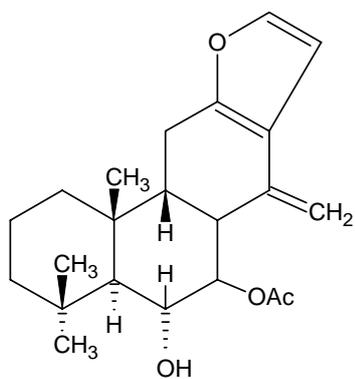
Geranilgeraniol



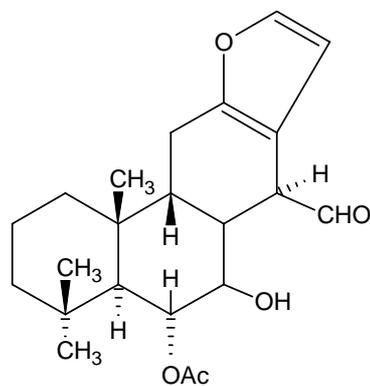
6 α -acetoxiouacapan-7 β -ol



6 α ,7 β -dihidroxiouacapan-17 β -oato de metila

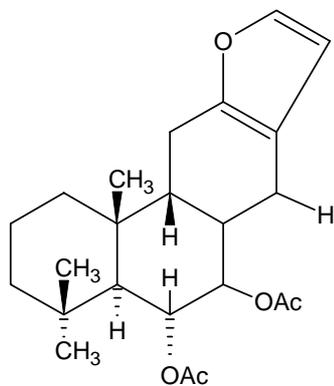


6 α -hidroxi-7 β -acetoxiouacapan-14(17)-eno

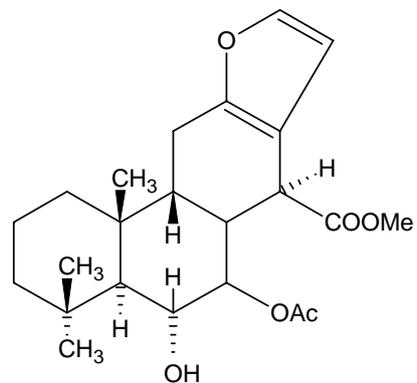


6 α -acetoxiouacapan-14 β -al

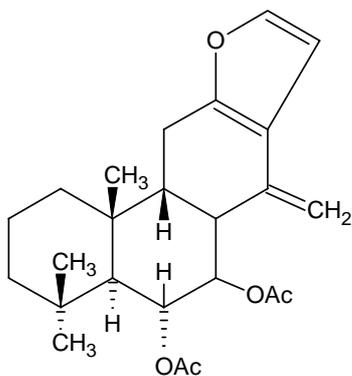
Figura 20: Diterpenos isolados do gênero *Pterodon*



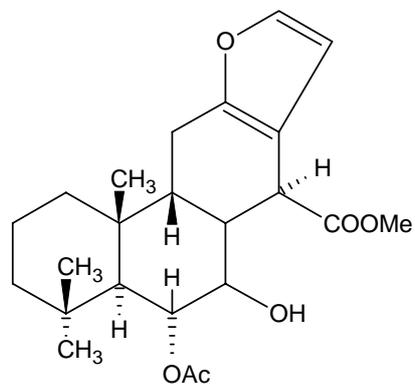
6 α ,7 β -diacetoxivouacapano



6 α -hidroxi-7 β -acetoxivouacapan-17 β -oato de metila



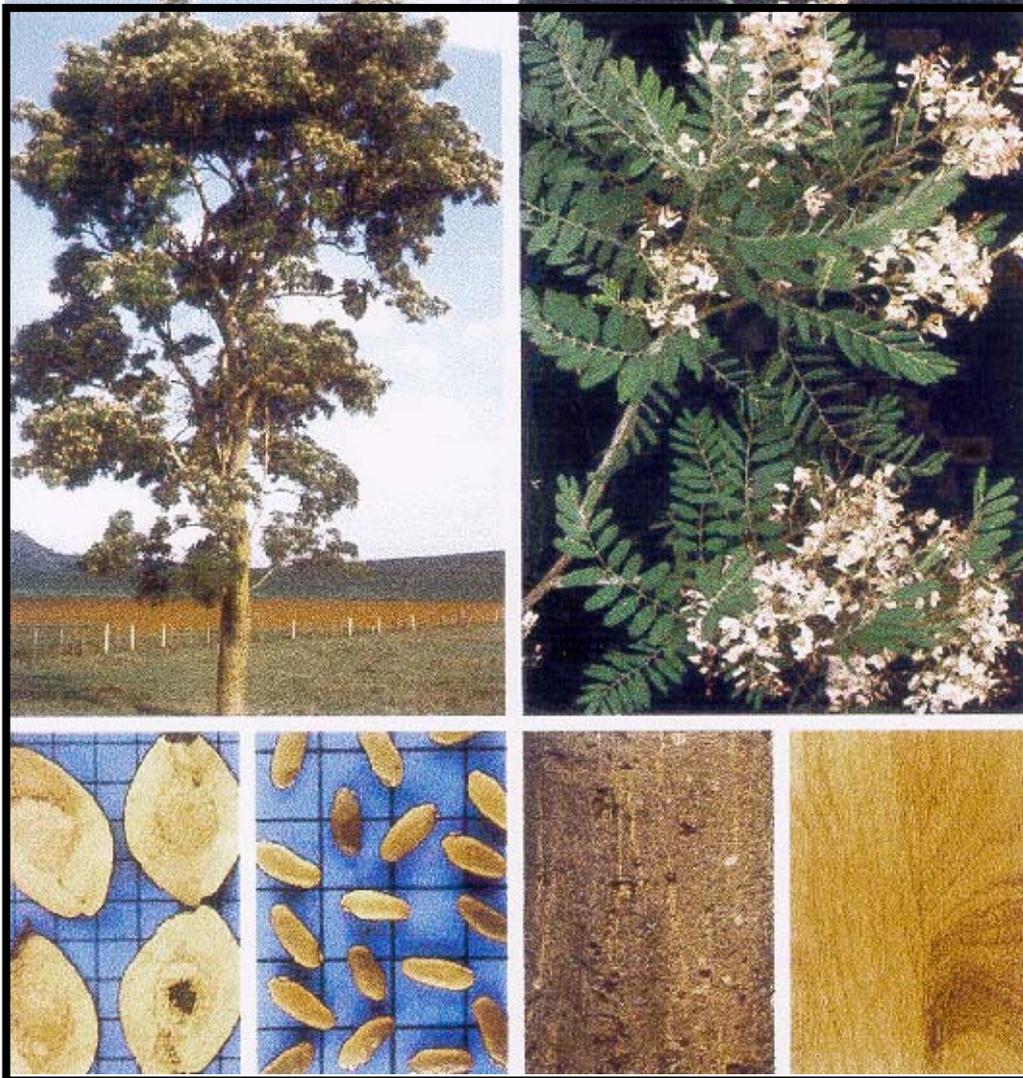
6 α , 7 β -diacetoxivouacap-14(17)-eno



6 α -acetoxi-7 β -hidroxivouacapan-17 β -oato de metila

FIGURA 20. Diterpenos isolados do gênero *Pterodon*. (continuação)

Pterodon emarginatus Vog. - Sucupira-branca ou Faveira.



Fonte: Lorenzi, 1996

Figura 21: *Pterodon emarginatus* Vog

Conhecida como essência nativa dos cerrados brasileiros e encontrada em abundância, nas regiões Sudeste (São Paulo, Minas Gerais e Espírito Santo) e Centro-oeste e Pré-Amazônia (Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás e Tocantins).

A árvore dessa espécie possui 5-10 metros de altura e 50-70 centímetros de diâmetro inflorescência em panícula, corola com pétalas violáceas. O fruto é uma drupa, achatado, monospermico, de coloração acinzentada, medindo seis centímetros e com aspecto alado. Estudos realizados com germinação permitem

levantar à hipótese de que as sementes de sucupira-branca possuem dormência causada em parte pela impermeabilidade dos tegumentos ao oxigênio e à água, em parte pela existência evidente de inibidores químicos da germinação (REIS, 1976). A propagação por semente apresenta sérios obstáculos aos métodos normalmente utilizados pelo fato de a semente ser coberta com envoltório lenhoso do fruto e ainda ser essa camada pontuada de glândulas oleosas que impedem a penetração d'água. Em condições naturais, a semente necessita de mais ou menos quatro anos para produzir plântulas (COELHO, 2001).

Tal espécie é usada pela medicina popular como antiinflamatório para o tratamento de reumatismo, dor-de-garganta, problemas de coluna, como depurativo e fortificante, tal como foi relatado no estudo etnobotânico realizado em trinta cidades do norte de Minas Gerais (LEITE DE ALMEIDA, 1975). A madeira é utilizada para construção naval e civil, pilares de pontes, postes, dormentes, assoalho de vagões e de carrocerias, carvão e lenha. Pode ser usada na arborização de ruas e praças, característica de terrenos secos e arenosos do cerrado.

Vários estudos têm sido feitos e trabalhos publicados, facilitando o estudo da espécie.

II. JUSTIFICATIVA

O presente trabalho faz parte de um projeto institucional da Fiocruz que tem como prioridade a busca de novas moléculas naturais repelentes de insetos e/ou inseticidas, que possam ser utilizadas em grande escala no controle dos principais mosquitos vetores de doenças, em formulações competitivas com os produtos sintéticos. Dessa forma foram escolhidas duas plantas, *Attalea excelsa*, conhecida vulgarmente como urucuri, espécie típica da região norte e *Pterodon emarginatus*, conhecido como sucupira branca, comum na região de cerrado do país. A primeira foi sugerida em estudo etnobotânico realizado na região de coleta e confirmada por informação bibliográfica (MORS, 1966) que descrevem o mesmo uso como repelente de insetos, principalmente mosquitos sugadores de sangue. A segunda espécie foi muito estudada nas décadas de 60 e 70 com a verificação

da atividade cercaricida do seu extrato hexânico e, mais recentemente, vários trabalhos têm sido feitos para a confirmação da atividade antiinflamatória (CARVALHO, 1998; PINTO COELHO, 2001) comprobatória do seu uso popular para tratamento de várias doenças, como por exemplo, inflamação de garganta, reumatismo, artrite.

O que nos chamou a atenção para a sucupira branca foi um trabalho realizado em Ribeirão Preto com *Haematobia irritans* (mosca-do-chifre), um díptero que causa grandes prejuízos à pecuária. Em vários experimentos foi mostrado que os animais (gado) tratados com o óleo de sucupira branca ficavam até seis meses sem reinfestação (SARTI, 1993), revelando que o óleo da sucupira branca inibia a alimentação destas moscas. Uma amostra de 500 g de frutos desta planta foi doada pelo Dr. Silvio Sarti com a sugestão de se testar seu óleo como repelente de mosquitos. Partindo dessa amostra, foram realizados vários testes de repelência em mosquitos do gênero *Aedes*. Os resultados preliminares foram muito promissores, o que nos motivou a coletar os frutos desta planta e desenvolver, como parte deste trabalho de tese, uma investigação mais detalhada acerca dessa atividade.

III. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste projeto é contribuir para o estudo químico e biológico de *Attalea excelsa* Mart. & Spreng e *Pterodon emarginatus* Vog., direcionando o estudo para a verificação da atividade repelente, adulticida e larvicida em mosquitos hematófagos.

III.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar a fitoquímica das brácteas do urucuri (*Attalea excelsa*) e dos frutos da sucupira branca (*Pterodon emarginatus*).
- Testar atividade repelente, larvicida e adulticida de extratos de diferentes polaridades de ambas as plantas frente à espécie *Aedes aegypti*.
- Identificar a fração ativa ou as substâncias ativas desses extratos.
- Elucidar a relação entre os constituintes químicos majoritários isolados e a possível atividade repelente, larvicida e adulticida desta espécie.
- Estabelecer a melhor técnica de extração para as duas espécies visando a produção futura em larga escala, como matéria prima para produtos repelentes naturais.

IV. MATERIAIS E MÉTODOS

IV.1. Métodos Gerais

As cromatografias em camada fina (CCF) foram realizadas em cromatoplasmas de gel de sílica Merck Darmstadt GF₂₅₄ e as substâncias foram detectadas por irradiação com lâmpada ultravioleta a 254 e 365nm e/ou com reveladores químicos.

Vanilina / H₂SO₄ (VAS): Solução 1: misturam-se 5 ml de ácido sulfúrico em 100 ml de Etanol. Solução 2: dissolve-se 1 g de vanilina em 100 ml de etanol. A placa é borrifada com a solução 1, depois com a solução 2 e aquece-se a mesma durante 5 minutos a uma temperatura de aproximadamente 100°C. Terpenóides, compostos aromáticos e compostos fenólicos coram-se, dependendo da substância, de rosa ou roxo, esteróides de amarelo, diterpenos apresentam mancha rosa e triterpenos de roxo.

p-Anisaldeído: 0,5 ml de anisaldeído é misturado com 10 ml de ácido acético glacial, seguido de 85 ml de metanol mais 5 ml de ácido sulfúrico. Borrifa-se a placa com essa solução e aquece-se à 100°C por 5–10 minutos. Fenóis, terpenos, açúcares e esteróides apresentam manchas de cor roxa, azul, cinza ou verde, dependendo da substância presente.

Ácido Fosfomolibdico: 10% de ácido fosfomolibdico em etanol. Borrifar a placa e aquecer a 120°C por 5-10 minutos. Esteróides aparecem como manchas azul-escura.

- As cromatografias em camada preparativa foram realizadas em placas de vidro 20 x 20 cm com uma camada de sílica GF₂₅₄ Merck (espessura 1mm). A detecção foi feita por irradiação com lâmpada ultravioleta a 254 e 365 nm ou com reveladores químicos (vanilina/H₂SO₄ e ácido fosfomolibdico).

- As cromatografias em coluna foram realizadas em sílica gel 60 (0,06-0,20 mm) Merck, com sistema de gradiente de solventes. A proporção de sílica utilizada foi aproximadamente 30 vezes o peso do produto bruto a ser purificado (30:1).

- Os pontos de fusão foram obtidos em Aparelho Modelo MQAPF-301 da Microquímica Ind. e Com. Ltda.
- Os critérios de pureza adotados foram: a observação do ponto de fusão e a obtenção de uma mancha única em cromatografia de camada fina, utilizando-se diferentes sistemas de eluentes.
- Os solventes utilizados na obtenção dos extratos, para as diferentes técnicas cromatográficas e para a recristalização das substâncias foram destilados, constando: acetato de etila, diclorometano, metanol, etanol. Outros solventes utilizados foram de grau P.A. O hexano utilizado foi grau pesticida e as misturas de solventes foram feitas volume a volume (v / v).
- Os espectros de absorção na região do infravermelho foram obtidos em espectrômetro Nicolet 205 FT-IR, utilizando pastilhas comprimidas de brometo de potássio anidro (KBr). Os valores para as absorções foram medidas em unidades de número de onda (cm^{-1}).
- Os espectros de RMN ^1H foram registrados em espectrômetro Varian-Gemini-200 (200 MHz), com solventes deuterados, utilizando o tetrametilsilano (TMS) como referência interna. Os deslocamentos químicos foram medidos em unidade adimensional, representando partes por milhão (ppm) da frequência aplicada e as constantes de acoplamento (J) foram medidas em Hertz (Hz).
- Os espectros de RMN ^{13}C foram registrados em aparelho Varian-Gemini-200 (50 MHz) com solventes deuterados, usando TMS como padrão interno. A multiplicidade dos sinais foi obtida de acordo com as técnicas de taxa de prótons ligados APT e DEPT.

IV.2. Cromatografia com Fase Gasosa de Alta Resolução Acoplada a Espectrometria de Massas

- A análise por cromatografia com fase gasosa de alta resolução, acoplada a espectrometria de massas (CG-EM), foi realizada em cromatógrafo a gás modelo 6890N equipado com um detector seletivo de massas, modelo 5973, e um injetor automático modelo 5683, todos da Agilent Technologies. Foram utilizadas 3 colunas cromatográficas diferentes, HP-1 (100% dimetilpolisiloxano-apolar), HP-5 (5% fenil metilpolisiloxano-apolar) e HP-WAX (polietileno glicol-polar) para testar a seletividade dos sinais cromatográficos.

Os dados foram adquiridos via HP CHEMISTATION Acquisition Software e um ultrassom modelo Odontobras 2840D utilizado para dissolução das amostras. As condições cromatográficas estão listadas a seguir:

Gás de arraste: Hélio;

Detector: espectrômetro de massas;

Temperatura do detector: 280° C;

Temperatura do injetor: 270° C;

Vazão: 1,0 mL/min.;

Split: 1:20;

Volume de injeção: 1,0 µL;

Temperatura forno: inicial 70 °C;

Programação forno: 4 °C/min. até 290° C

IV.3. Coleta e Preparo do Material Vegetal

IV.3.1. *Attalea excelsa*

Folhas, flores, frutos e brácteas de *Attalea excelsa*, foram coletados em janeiro de 2000, próximo à cidade de Mazagão Velho, Amapá.

As brácteas foram secas em estufa com circulação de ar, por 15 dias com temperatura de 40°C. Após este tempo foram trituradas em moinho de facas e armazenadas em sacos de plástico, dentro de barricas lacradas.

Uma amostra de *A. excelsa* (folhas, frutos) foi identificada pela Dra Maria Elizabeth Van der Berg do Instituto Emílio Goeldi e depositada na Carpoteca do Jardim Botânico do Rio de Janeiro sob nº 6219.

As folhas e flores de *A. excelsa* foram avaliadas macro e microscopicamente em lupa e microscópio estereoscópicos com "zoom" e sistema acoplado de microfotografia.

A metodologia empregada para o estudo anatômico consistiu na elaboração de cortes transversais do terço médio inferior das pinas ainda frescas e do terço médio inferior do eixo da inflorescência, seguido de coloração semi-permanente, segundo Dop e Gautié (DOP, 1942), com verde-iodo e vermelho do Congo como corantes, seguido de montagem em gelatina glicerinada.

IV.3.2. *Pterodon emarginatus*

A sucupira-branca começou a frutificar em meados de agosto de 2001. Seus frutos foram colhidos em dois lotes: um em setembro/2001 e outro em agosto de 2002, nas proximidades de Cuiabá, Mato Grosso e identificado pela Dra Miramy Macedo, botânica do Herbário Central da Universidade Federal do Mato Grosso (UFMT) e uma exsicata foi depositada sob o número 20.899 no Herbário Central da UFMT. A duplicata recebeu o número FFAR - 0215 no Herbário Farmácias Verdes, Far-Manguinhos, Fiocruz.

Os frutos foram secos à sombra e moídos em moinho de facas e armazenados no congelador, mas somente próximo ao momento da extração.

IV.4. Preparo dos Extratos

IV.4.1. *Attalea excelsa*

Extração por Maceração

- A Quente

As brácteas trituradas de *A. excelsa* (1000g) foram extraídas com hexano a quente, em balão de fundo redondo acoplado a um condensador tipo serpentina por 12 horas. Depois de evaporado o solvente, foi obtido o extrato hexânico das brácteas de *A. excelsa* (EHBA-MQ) sob a forma de resíduo pastoso.

- A Frio

Uma outra amostra de brácteas (100 g) foi extraída a frio com hexano, em erlenmeyer sob agitação por 15 dias. Evaporou-se o solvente e obteve-se um resíduo pastoso (EHBA-MF)

- Com Ultrasom

100 g de brácteas secas foram colocadas em erlenmeyers com hexano e extraídas por ultrasom, nos intervalos de 30, 60, 120 e 180 minutos (EHBA-U30); (EHBA-U60); (EHBA-U120);(EHBA-U180).

Extração em aparelho de soxhlet

As brácteas trituradas de *A. excelsa* (1000g) foram extraídas com hexano à quente (soxhlet). Depois de evaporado o solvente foi obtido um extrato hexânico (EHBA) sob a forma de resíduo pastoso. O resíduo das brácteas desengordurado foi novamente submetido à extração utilizando etanol como solvente e após

filtração forneceu sob a forma de resíduo escuro, o extrato etanólico desengordurado (EEBA-D).

Uma nova amostra de brácteas (1000 g) foi extraída com etanol a quente, depois de evaporado o solvente foi obtido um extrato etanólico (EEBA).

Extração por Fluido Supercrítico

Todos os experimentos com extração supercrítica foram realizados no Laboratório de Separações Físicas (LASEFI), no Departamento de Engenharia de Alimentos da UNICAMP, sob a orientação da Dra Maria Ângela de Almeida Meireles.

As brácteas secas e trituradas foram empacotadas manualmente na célula de extração, colocando-se cerca de 2 g de amostra por vez, com auxílio de um funil e de uma haste metálica (1/4 polegada de diâmetro) para comprimir o material de forma a evitar a deformação e quebra do material sólido. A massa do urucuri foi determinada e mantida constante em todos os experimentos. Quando o leite estava formado, fechava-se a célula que foi adaptada ao equipamento de extração (cilindro extrator). Após este procedimento ligou-se a bomba para que a linha fosse pressurizada. A pressurização foi realizada em etapas: primeiro pressurizou-se o sistema até entrada da coluna de extração. Quando as condições operacionais foram alcançadas, abriu-se a V3 antes da coluna para que a célula de extração fosse pressurizada, permanecendo as válvulas de saída da coluna fechadas. Quando todo o sistema estava pressurizado nas condições desejadas de pressão e temperatura, as válvulas foram abertas dando início à operação de extração, (Figura 22).

As brácteas secas de urucuri (32 mesh) foram extraídas utilizando como modificador de fase o etanol nas concentrações de 5 e 10 %.



Figura 22: Aparelho de extração por fluido supercrítico, Laboratório de Engenharia de Alimentos (LASEFI), UNICAMP/Campinas

Quadro 1: Extração com fluido supercrítico das brácteas de *Attalea excelsa* utilizando CO₂ como solvente extrator e variações nas condições de pressão e temperatura e tamanho de partícula.

Experimento N ^o	Tamiz (mesh)	Pressão (bar)	Temperatura °C
EXP 01	10 mesh	250	50
EXP02	28 mesh	250	50
EXP03	32 mesh	250	50
EXP04	32 mesh + 5% etanol	250	50
EXP05	48 mesh	250	50
EXP06	32 mesh + 10% etanol	100	20
EXP07	32 mesh + 10% de etanol	300	70

O extrato obtido de cada extração foi coletado em frascos de vidro em frações nos intervalos de 30 minutos.

IV.4.2. *Pterodon emarginatus*

Extração por Maceração

- A Frio

Uma amostra de frutos triturados de sucupira branca (100 g) foi extraída a frio com hexano, em erlenmeyer sob agitação por 15 dias. O solvente foi retirado sob pressão reduzida resultando em um óleo verde escuro, viscoso e aromático (OSMT-MF).

Extração em extrator tipo Soxhlet – hexano

Os frutos triturados de sucupira-branca, lote 2001 (100 g) e lote 2002 (100g), foram extraídos em soxhlet com n-hexano (400 ml), por aproximadamente 12 horas, divididos em três dias. O solvente foi retirado em evaporador rotatório à pressão reduzida, resultando no extrato hexânico dos frutos de *Pterodon emarginatus* (OSMT-1, lote 2001 - 25% e OSMT-2002, lote 2 - 26%), sob a forma de material oleoso amarelado que foi armazenado em frasco âmbar em geladeira.

Extração por extrator tipo Soxhlet – etanol

Os frutos triturados de Sucupira-branca (100 g) foram extraídos em soxhlet com etanol (400 ml), por aproximadamente 8 horas. Após concentração em evaporador rotatório à pressão reduzida, foi obtido o extrato etanólico de frutos de *Pterodon emarginatus* (EESMT-1 – 38%), sob a forma de material resinoso de tom amarelado que foi armazenado em frasco âmbar em geladeira.

Extração por Fluido Supercrítico

Os frutos de *Pterodon emarginatus* secos e triturados, foram empacotadas manualmente na célula de extração, colocando-se cerca de 2 g de amostra por vez, com auxílio de um funil e de uma haste metálica (1/4 polegada de diâmetro) para comprimir o material de forma a evitar a deformação e quebra do material sólido. A massa de sucupira foi determinada e mantida constante em todos os experimentos. Quando o leito estava formado, fechava-se a célula que foi adaptada ao equipamento de extração (cilindro extrator). Após este procedimento ligou-se a bomba para que a linha fosse pressurizada. A pressurização foi realizada em etapas: primeiro pressurizou-se o sistema até entrada da coluna de extração.

Quando as condições operacionais foram alcançadas abriu-se a válvula de saída antes da coluna para que a célula de extração fosse pressurizada, permanecendo as válvulas de saída da coluna fechadas.

Experimentos realizados:

Experimento 01 - EXP 01 – pressão = 150 bar e temperatura = 35 °C

Experimento 02 - EXP02 - pressão = 250 bar e temperatura = 35 °C

Alcançadas as condições operacionais para cada experimento, a válvula V2 de entrada do solvente foi aberta, permanecendo a válvula V3 de saída fechada, para permitir que o dióxido de carbono entrasse em contato com a matriz sólida. A válvula V3 foi aberta dando início a operação de extração. O extrato foi coletado em frascos de vidro dividido em nove frações para o experimento 01 (EXP 01), com pressão a 150 bar e cinco para o experimento 02 (EXP 02), com pressão a 250 bar, no intervalo de 30 minutos entre cada uma. Adaptou-se na descarga do equipamento, uma coluna de vidro com adsovente PORAPAK Q (80 – 100 mesh), denominada coluna de captura, onde os terpenos mais voláteis ficaram retidos.

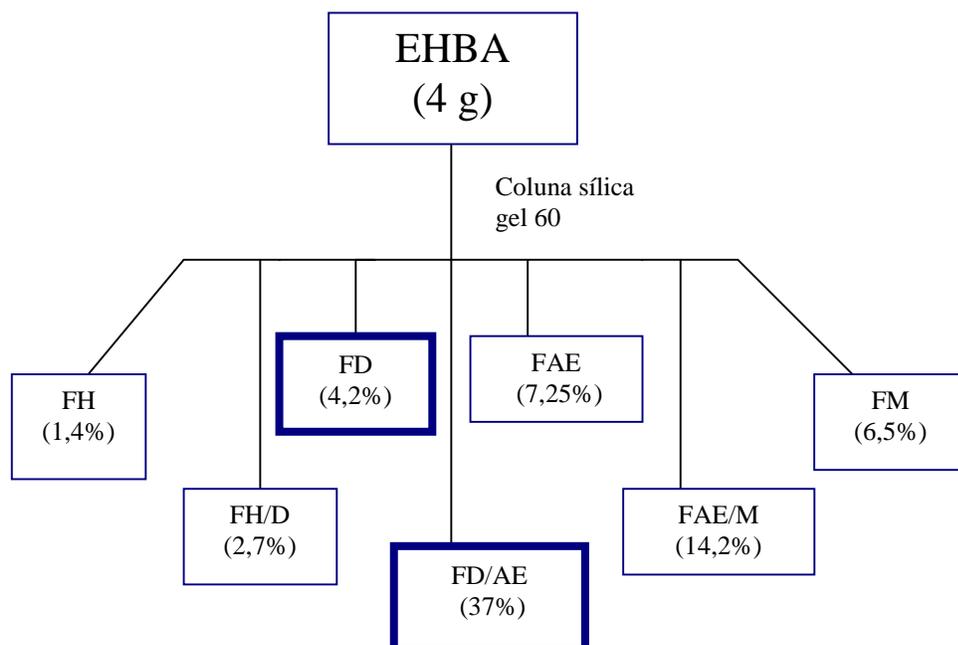
IV.5. Fracionamento dos Extratos

IV.5.1. *Attalea excelsa*

Parte (5 x 4 g) do extrato hexânico das brácteas de urucuri obtido por extração por Soxhlet (EHBA), foi fracionado em coluna cromatográfica de gel de sílica, utilizando-se gradiente de solventes em ordem crescente de polaridade: hexano, hexano/diclorometano, diclorometano, diclorometano/acetato de etila, acetato de etila, acetato de etila /metanol e metanol. As frações obtidas, (Tabela 01 e Esquema 01), foram analisadas por CCF em sílica gel 60 F₂₅₄ e reveladas com solução de vanilina 1% / H₂SO₄ 5% e ácido fosfomolibdico; e por CG-EM. Em paralelo foram realizados testes para avaliação da atividade repelente destas frações.

Tabela 01: Fracionamento em coluna de sílica gel do extrato de brácteas de *Attalea excelsa* (EHBA), utilizando gradiente de solventes.

% Solvente	FRAÇÕES OBTIDAS
Hexano (100)	FH
Hexano/diclorometano (1:1)	FH/D
Diclorometano (100)	FD
Diclorometano/acetato etila (1:1)	FD/A
Acetato etila (100)	FA
Acetato etila/metanol (1:1)	FA/M
Metanol (100)	FM

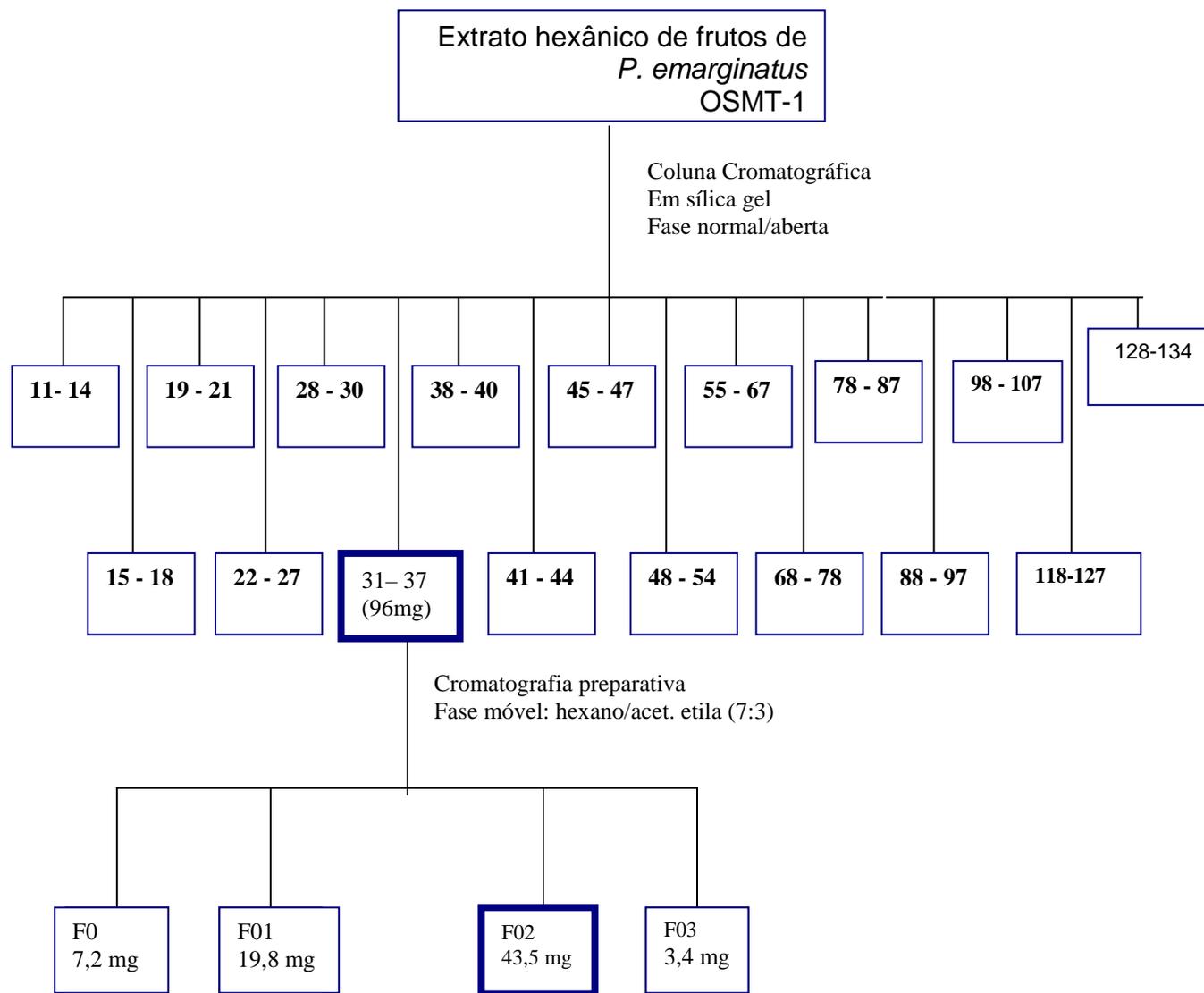


Esquema 1 Fluxograma da coluna cromatográfica em sílica gel, do extrato hexânico de brácteas de *A. excelsa*

IV.5.2. *Pterodon emarginatus*

500 mg do extrato hexânico dos frutos de sucupira branca, obtido por soxhlet (OSMT-1), foram fracionados em coluna cromatográfica de gel de sílica. A eluição constou de misturas de polaridades crescentes de hexano, acetato de etila e metanol, obtendo-se 134 frações, (esquema 2) que foram cromatografadas em CCF e reunidas por semelhança resultando em 25 frações.

A placa preparativa foi lavada em metanol puro e ativada em estufa a 60°C por 30 minutos. A fração 31-37 foi solubilizada em diclorometano e aplicada na placa preparativa e eluída duas vezes em 100 ml do eluente n-hexano / acetato de etila (7:3). Uma parte lateral da placa foi borrifada com vanilina/H₂SO₄, e aquecida a 100 °C por 5 minutos. As faixas foram marcadas e raspadas, sendo separadas e lavadas com diclorometano. As quatro frações foram filtradas e todo seu solvente retirado, estas foram cromatografadas em CCF e após derivatização com diazometano, foram enviadas para análise de CG/EM. Estas frações da preparativa foram analisadas por CG/EM e a fração F02-P, que obtivemos em maior quantidade (43,5 mg), foi enviada para análise de IV, RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃), RMN ¹H (COSY), RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃), RMN ¹³C (DEPT), CG/EM. As frações Forigem, F01-P e F03-P, foram avaliadas somente por CG/EM.



Esquema 2: Fluxograma da coluna cromatográfica em sílica gel, do extrato hexânico de frutos de *Pterodon emarginatus*

IV.5.2.1. Caracterização do diterpeno furânico 6 α ,7 β -diacetoxivouacapan-17 β -oato de metila

Espectroscopia de absorção no infravermelho - ν_{\max} (KBr, cm^{-1})

2926; 1744; 1368; 1248; 1017; 734 cm^{-1}

Espectrometria de RMN ^1H (200 MHz, TMS, $\delta=0$, CDCl_3)

δ 0,96; 0,98; e 1,03 (s, Me, C-4 e C-10); 3,35 (1 H, d, H-14); 3,70 (CO_2Me); 4,98 e 5,45 (HCOAc, H-7 e H-6); 6,10 e 7,23 (Hs furano)

Espectrometria de RMN ^{13}C (50 MHz, TMS, $\delta=0$, CDCl_3)

C quartenário: δ 33,28 (C-4); 38,59 (C-10); 150,30(C-12); 113,06 (C-13); 170,33 (C-17); 21,84 (C-24); CH (55,14; 170,33; 174,15; 48,01; 45,67; 141,60; 108,31; 103,7); CH_2 (39,17; 18,31; 43,44; 22,39); CH_3 (35,89; 20,78; 15,29; 52,13; 80,22; 73,26)

Espectrometria de massas – alta resolução – m/z (abundância relativa %)

446, 386, 354, 327 (27), 326 (100), 312 (47), 285, 267, 229 (25), 209, 178, 159, 131, 91, 69, 43 (26)

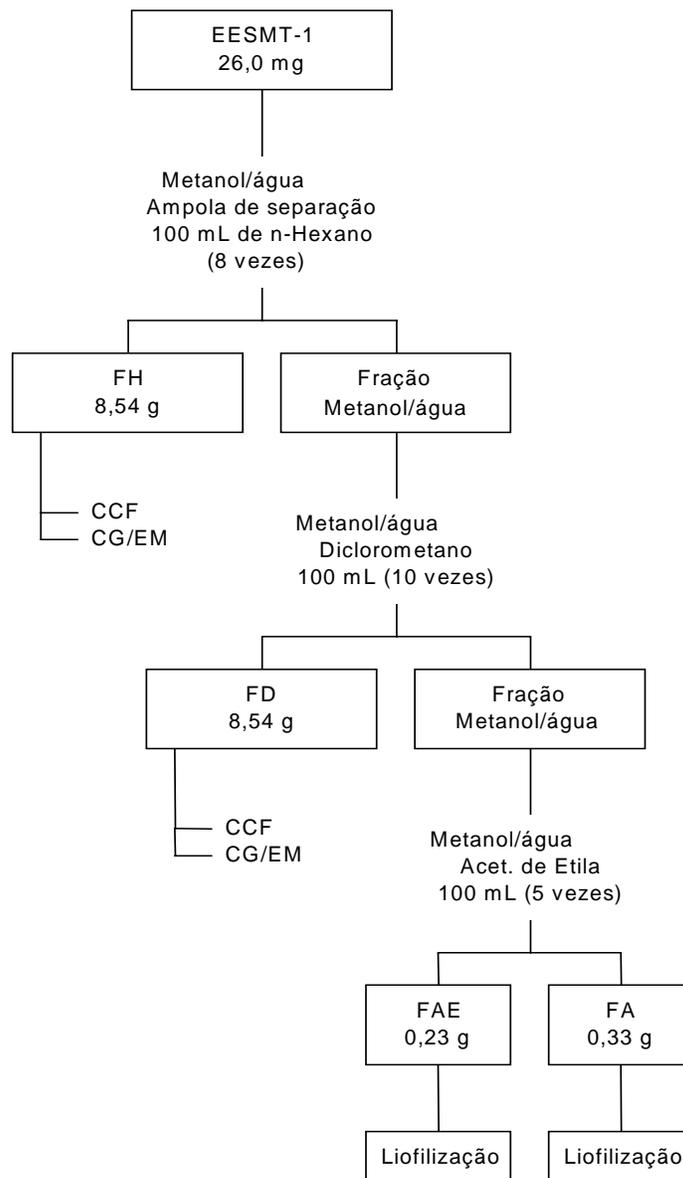
O ponto de fusão da fração 2 (F02 P-1) foi medido e comparado com a literatura (FASCIO, 1976; ARRIAGA, 2000)

IV.5.2.3. Partição do EESMT-1

Foi realizada partição líquido-líquido do extrato etanólico de frutos de *Pterodon emarginatus* (EESMT-1), com o objetivo de se localizar a atividade repelente do extrato, mesmo sendo menor que a do extrato hexânico dos frutos de *Pterodon emarginatus* (OSMT-1).

O extrato etanólico de frutos de *Pterodon emarginatus* (EESMT-1, 26 g) foi solubilizado em 100 mL de metanol/água (9:1) sendo a solução transferida para

uma ampola de separação de 1 L. A partição líquido-líquido foi realizada com gradiente crescente de solventes, hexano, diclorometano, acetato de etila. Foram obtidas 4 frações: fração hexano (FH-Pt); diclorometano (FD-Pt); acetato de etila (FAE-Pt) e aquosa (FA-Pt). A solução metanol/ água foi evaporada e posteriormente liofilizada, (Esquema 3).



Esquema 3: Etapas da partição do extrato etanólico de frutos de *Pterodon emarginatus* (EESMT-1)

Todas as frações obtidas na partição foram testadas frente a fêmeas de *A. aegypti* e analisadas por CCF e caracterizadas por CG/EM

IV.6. Ensaio Biológicos

Os ensaios em laboratório foram montados com *Culex quinquefasciatus* e *Aedes aegypti* e realizados no Laboratório de Biologia do Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais (NPPN-UFRJ), sob a orientação do Prof. Dr. Alfredo Martins de Oliveira Filho.

A maioria dos testes para a verificação da atividade repelente em *A. aegypti* de sucupira branca e urucuri foram realizados utilizando como voluntários a autora deste trabalho e o biólogo Celso Evangelista do LB/NPPN/UFRJ.

Todos os testes larvicidas e adulticidas também foram realizados pela autora com o auxílio da equipe do laboratório de biologia.

IV.6.1. Teste para verificação da atividade larvicida

Estes ensaios visam determinar a linha básica de suscetibilidade em larvas de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* aos extratos hexânicos de brácteas de *Attalea excelsa* e de frutos de *Pterodon emarginatus*.

O procedimento experimental é uma adaptação da metodologia aprovada pela World Health Organization, (WHO, 1970), (Figura 23). É válido para todos os ensaios com variação de concentrações dos extratos e das espécies.



Figura 23: Ensaio biológico utilizando-se as larvas F_1 , realizado de acordo com as recomendações da OMS.

Material

Larvas de terceiro estágio de *Culex quinquefasciatus* e *Aedes aegypti*, copos de vidro com capacidade para 300 mL (diâmetro de aproximadamente 7 cm), com 199 mL de água sem cloro (recipiente de teste), copos de vidro com capacidade para 100ml (com diâmetro de aproximadamente 7 cm), com 50ml de água sem cloro e 25 larvas do mosquito, pipeta Pasteur, bastão de vidro, 1 ml da solução do extrato na concentração a ser testada (0,1;1,0;10,0 e 100 ppm) fazendo 2 repetições de cada concentração.

Procedimento

Em um copo com 199 mL de água, é acrescentado 1mL da solução contendo a amostra na concentração a ser testada. Mistura-se com um bastão de vidro. Após 30 minutos acrescentam-se 50 mL de água contendo 25 larvas de terceiro estágio (separadas com o auxílio de uma pipeta pasteur). No controle sem tratamento são colocados 200ml de água e 50 mL de água contendo 25 larvas de mosquito. Quando foi preciso utilizar solvente para as diluições das concentrações (acetona), o mesmo foi utilizado no controle, na mesma proporção. Após 24 horas observa-se o número de larvas vivas (quando sobem serpenteando para a superfície) e mortas (permanecem no fundo do copo).

O ensaio é considerado válido quando os valores dos índices de mortalidade encontrados nos controles estiverem ente 5 e 20%, faz-se a correção de Abbot. Valores superiores implicam em descarte do ensaio. Foram testadas, no mínimo três concentrações do extrato da planta em larvas dos mosquitos. Os valores da percentagem de mortalidade obtidos após 24 horas, deverão ficar entre 10 e 90%.

IV.6.1.1. *Attalea excelsa*

Foram testados os extratos hexânico, etanólico de urucuri e ácido palmítico nas concentrações de 100, 10, 1 e 0,1 ppm.

As amostras (extratos e fração purificada) foram solubilizadas em acetona e testadas com larvas de terceiro estágio para as duas espécies de mosquitos (*A. aegypti* e *C. quinquefasciatus*), sendo a leitura realizada 24 h após o início do experimento.

IV.6.1.2. *Pterodon emarginatus*

Foram testados os extratos hexânico e etanólico de sucupira branca, nas concentrações de 100, 10, 1 e 0,1 ppm.

Os extratos foram solubilizados em acetona e testados com larvas de terceiro para as duas espécies de mosquitos (*A. aegypti* e *C. quinquefasciatus*), e a leitura realizada 24 h após o início do experimento.

IV.6.2. Teste para verificação da atividade aduítica

A amostra (extrato hexânico e etanólico de urucuri; extrato hexânico e etanólico de sucupira) foi solubilizada em acetona ou óleo mineral e aplicada em papel de filtro é colocado em um cilindro de plástico (modelo OMS) e um outro papel sem amostra, somente contendo o veículo, em outro cilindro semelhante, (Figura 24). Os dois cilindros foram separados por uma porta deslizante e 25 fêmeas adultas de *C. quinquefasciatus* e/ou *A. aegypti* introduzidas no cilindro branco, a porta foi aberta e os insetos deslocados para o cilindro da amostra; após 1 hora foram deslocados ao cilindro branco e retidos durante 24 horas, depois foi realizada a leitura, verificando quantos mosquitos ficaram intoxicados e /ou mortos.



Figura 24: Kit da OMS para ensaios biológicos de resistência de mosquitos adultos a inseticidas, através do uso de papéis impregnados.

IV.6.3. Repelência em superfície impregnada (antebraço humano)

Esta técnica foi adaptada, a partir da original desenvolvida por Dr Yap Han Heng, (HENG, 1996).



Figura 25: Gaiolas para teste de repelência em superfície impregnada em antebraço humano, em uma área tratada de 50 cm², contendo 25 fêmeas de *A. aegypti*, não alimentadas com sangue.

Metodologia

São utilizadas duas caixas de alumínio (30x30x30cm) com a parte lateral de tela e a frontal de tecido onde se coloca o braço tratado. Vinte e cinco fêmeas de mosquitos da espécie *A. aegypti* são inseridas, com o auxílio do sugador de vidro dentro da caixa controle e Vinte e cinco na caixa teste, (Figura 25).

As fêmeas de *A. aegypti* utilizadas nos experimentos deverão estar com idade variando entre 4 e 8 dias e alimentadas somente com água e açúcar.

O ensaio é realizado utilizando-se dois controles, óleo vegetal (5 mg/cm²), para determinação do efeito de barreira mecânica e um repelente padrão comercial, a N,N-dietil-m-toluamida (DEET), em solução a 20% em etanol (0,5 mg/cm²).

As amostras são solubilizadas em acetona ou etanol (250 µL), nas doses de 250, 100, 50 e 25 mg e com auxílio de uma espátula, são aplicadas na pele do antebraço de voluntário humano, numa área de 50 cm², o braço é envolto em uma faixa de papel com uma abertura de 25 cm², que expõe parte da área tratada com a amostra ou o controle.

O braço é mantido na caixa com os mosquitos por 5 minutos. A exposição é repetida nos tempos de 1, 2, 4, 6, e 8 horas pós-tratamento, verificando assim o efeito repelente residual do produto testado. Após cada leitura, novas fêmeas são colocadas na gaiola. O experimento é realizado em triplicata.

Critério de Atividade

Deve-se anotar a cada minuto quantos mosquitos pousaram e quantos picaram. O extrato bruto ou fração é considerado repelente ou fagorepelente quando não ocorrer alimentação das fêmeas de *A. aegypti*, após 8 horas de tratamento, na dose de 0,5 mg/cm², resultado este igual ao do controle positivo realizado com o repelente comercial DEET.

IV.6.3.1. *Attalea excelsa*

Foram testados os extratos hexânico, etanólico bruto e etanólico desengordurado de brácteas de urucuri, e frações obtidas na coluna cromatográfica do EHBA (FH, FH/D, FD, FD/FAE, FAE, FAE/FM), nas concentrações 5,0; 2,0; 1,0 e 0,5 mg/cm².

IV.6.3.2. *Pterodon emarginatus*

Foram testados os extratos hexânico e etanólico dos frutos de sucupira branca, frações da partição do EESMT-1 (FH-PTt., FD-Pt., FAE-Pt.), nas concentrações 5,0; 2,0; 1,0 e 0,5 mg/cm² e a fração 2 obtida na preparativa (F02-P) na concentração de 1,0 e 0,5 mg/cm².

V. RESULTADOS E DISCUSSÃO

V.1. Preparo dos Extratos: Avaliação do Rendimento das Extrações

Neste trabalho várias técnicas de extração foram utilizadas para as espécies *Attalea excelsa* e *Pterodon emarginatus* com o objetivo de se obter um maior rendimento associado à permanência da atividade repelente dos extratos. Os resultados obtidos para cada planta são apresentados a seguir.

Attalea excelsa

As brácteas de urucuri são estruturas fibrosas pobres em material extrativo, ao contrário das folhas, que apresentam um bom rendimento, mas não apresentam nenhuma atividade repelente de mosquitos, (resultados preliminares anteriores a esta tese não mostrados aqui). A presença de grande atividade repelente de insetos em extratos de brácteas nos levou a procurar um método e um solvente que contornasse o problema do baixo rendimento obtido através da preparação de extratos por maceração a frio, e que, ao mesmo tempo garantisse a presença de sua atividade biológica, (Tabela 3).

A extração por maceração a frio foi o primeiro método utilizado resultando em um baixo rendimento, associado ao longo tempo de extração (15 dias) e grande volume de solvente. A adição de aquecimento à maceração reduziu o tempo de extração (3 dias), sem contudo, levar a um aumento considerável no rendimento final.

A extração por ultrassom, apesar de apresentar um rendimento comparável ao obtido através da maceração a quente, num menor tempo, apresenta alguns fatores desfavoráveis como, por exemplo, indisponibilidade de equipamentos com porte industrial, grande volume de solvente utilizado em cada extração, associado à possível degradação de substâncias orgânicas.

A extração utilizando fluido supercrítico (FSC), (Figura22), foi o método que apresentou melhores rendimentos, (Tabela 2b), sendo que alguns fatores como tamanho da partícula e utilização de modificador de fase, foram fundamentais na obtenção destes resultados. Foram utilizadas brácteas trituradas secas em vários tamanhos: 10, 28, 32 e 48 mesh, mantendo-se constantes a temperatura (50 °C) e pressão (250 bar).

As brácteas com 10 e 48 mesh, quando extraídas com fluido supercrítico, apresentaram um rendimento muito pequeno (0,05%), menor até do que aquele obtido da maceração a frio com hexano (0,3%). Provavelmente o pequeno tamanho das partículas da planta (48 mesh), faça com que ocorra a presença de caminhos preferenciais, reduzindo a interação matéria prima e CO₂, já com partículas muito grandes ocorre um menor contato entre o solvente e a planta reduzindo o rendimento final.

Os pós das brácteas com 28 e 32 mesh apresentaram rendimentos também baixos (0,1%). Para contornar o problema, optamos pela utilização de um modificador de fase (etanol 5%), técnica sugerida em literatura (ZANCAN, 1998) para a modificação da polaridade do CO₂, tornando a extração mais efetiva. Após a adição do etanol observamos um pequeno aumento no rendimento final da extração das brácteas com 32 mesh (0,2%) resultado não satisfatório. Partindo destes resultados fizemos mais dois experimentos modificando outros parâmetros tais como temperatura e pressão. Utilizamos duas condições a primeira, baixa pressão (100 bar) e baixa temperatura (20 °C) e a segunda, alta pressão (300 bar) e alta temperatura (70 °C) ambas associados à adição de modificador de fase (etanol 10%). Os resultados foram muito interessantes, pois mesmo com baixos valores de temperatura e pressão, observamos um aumento considerável do rendimento que passou de 0,2% (mesh 32, 5% etanol, 250 bar, 50 °C) para 0,97% (mesh 32, 10% etanol, 100 bar, 20 °C). A extração realizada com alta temperatura e alta pressão também apresentou um ótimo resultado, elevando esse rendimento para 1,2% (mesh 32, 10% etanol, 300 bar, 70 °C). Provavelmente a adição de etanol como co-solvente promoveu a extração de mais substâncias (polares) que colaboraram para o aumento do rendimento, (Tabela 2b).

Apesar dos resultados serem bons a extração por fluido supercrítico se torna problemática pelo alto custo de manutenção e do solvente (CO₂ puro), e pela dificuldade de ser ter disponível um extrator de larga escala, tornando o método inviável como padrão de extração para brácteas de *A. excelsa*, para o desenvolvimento desta tese.

Um outro método realizado foi a extração por aparelho de Soxhlet, onde vários intervalos de tempo de extração e solventes foram testados, (Tabela 3). Verificamos que, a partir de 12 horas de extração contínua, o rendimento final é

de 0,5%. Apesar de não ser tão alto quanto à obtida com FSC, tínhamos a disponibilidade de aparelhos grandes (1,5; 5 e 30 L) em nosso laboratório. Considerando essa disponibilidade e que 12 horas é um tempo relativamente pequeno de extração, optamos por utilizá-lo em todas as extrações.

Um outro parâmetro analisado foi polaridade do solvente. Dois solventes de polaridades diversas foram escolhidos: o hexano e o etanol, e vários extratos foram feitos e testados posteriormente.

A extração direta com hexano resultou no extrato hexânico de brácteas de *A. excelsa* (EHBA - 0,5%). O resíduo da extração anterior foi então extraído com etanol, fornecendo o chamado extrato etanólico desengordurado de brácteas de *A. excelsa* (EEBA-D - 1,5%). Uma outra amostra de brácteas foi extraída diretamente com etanol resultando no extrato etanólico de brácteas de *A. excelsa* (EEBA - 2,5%).

Estes extratos foram avaliados com relação a sua atividade repelente para fêmeas de *A. aegypti* em várias concentrações, e foi verificado que o extrato mais ativo na menor dose testada (0,5 mg/cm²), era aquele mais apolar (EHBA), (Gráfico 1).

A presença de intensa atividade repelente apenas nos extratos preparados com hexano nos chamou a atenção para a possível presença de ftalatos, contaminantes frequentemente encontrados no hexano, e que são dotados de atividade repelente (WILKINSON, 1987). No início do trabalho o hexano utilizado nas extrações era destilado e tratado, o que não garantia sua pureza. Optamos assim por utilizarmos o hexano grau pesticida, com tampas revestidas de teflon e sempre com acompanhamento da pureza por CG.

Tabela 2a. Rendimento das extrações realizadas com brácteas secas de *A. excelsa* utilizando vários métodos extrativos.

Método extrativo	Solvente/tempo - código	Rendimento (%)
Maceração a frio	Hexano/15 dias - EHBA-MF	0,3
Maceração quente	Hexano/3 dias - EHBA-MQ	0,4
Ultrasom	Hexano/30 min. – EHBA-U30	0,2
	Hexano/60 min. – EHBA-U30	0,4
	Hexano/120 min. – EHBA-U30	0,4
	Hexano/180 min. – EHBA-U30	0,4
Aparelho de Soxhlet	Hexano/ 12 horas - EHBA	0,5
	Etanol/12 horas - EEBA	2,5

Tabela 2b. Rendimento das extrações realizadas com brácteas secas de *Attalea excelsa* com fluido supercrítico, utilizando-se CO₂ como solvente extrator.

Pressão (bar)	Temperatura (°C)	Tamanho de partícula (mesh)	Co-solvente (v/v)	Rendimento (%) – código
250	50	10	Não	0,05 FSCAE/250-10
		28	Não	0,1 FSCAE/250-28
		32	Não	0,1 FSCAE/250-32
		32	Etanol 5%	0,2 FSCAE/250-32E5
		48	Não	0,05 FSCAE/250-48
100	20	32	Etanol 10%	0,97 FSCAE/100-32E10
300	70	32	Etanol 10%	1,2 FSCAE/300-32E10

Pterodon emarginatus

O procedimento realizado com as brácteas de urucuri foi repetido com os frutos secos e triturados da sucupira branca, apesar do rendimento extrativo desta planta ser superior ao das brácteas.

Foram testados três métodos extrativos diferentes com o objetivo de se verificar também o rendimento e a permanência da atividade repelente. Os extratos foram feitos utilizando hexano como solvente, e etanol para futuras comparações.

A maceração a frio com hexano, foi o primeiro método testado, resultando em um rendimento baixo (15%) e longo tempo de extração (dez dias).

A extração utilizando fluido supercrítico foi realizada também com CO₂ como solvente extrator, sem a utilização de modificador de fase, mas com a utilização de uma coluna PORAPAK, que foi colocada na saída do CO₂ para os frascos coletores.

Os frutos triturados não foram tamizados, pois seu alto teor de óleo formava um filme sobre as peneiras, impossibilitando a determinação do mesh, tal como realizado com as brácteas de urucuri. Dessa forma a influência do tamanho da partícula sobre o rendimento da extração não pode ser avaliado.

A extração utilizando fluido supercrítico (FSC) foi o método que apresentou maior rendimento, como observado também nas extrações do urucuri. Foram realizados dois experimentos, onde somente a pressão foi alterada, mantendo-se a temperatura constante a 35 °C. Utilizou-se baixa pressão (150 bar) e depois alta pressão (250 bar). Os resultados foram surpreendentes, pois o aumento da pressão não aumentou o rendimento como esperado e, sim, o fez cair. Este resultado se deve, provavelmente, a formação de caminhos preferenciais na matéria prima, diminuindo assim a área de interação entre o solvente extrator e a planta, (Tabela 3).

Da mesma forma que foi realizada com urucuri, os frutos de sucupira branca foram também extraídos com aparelho de Soxhlet, apresentando bons resultados. Verificamos que a partir de 12 horas de extração contínua com hexano o rendimento final era de 25%. Apesar de não ser tão alto quanto a extração com o FSC, foi o método escolhido pelas mesmas razões citadas anteriormente na

descrição de urucuri. Dois solventes foram escolhidos nos extremos de faixa de polaridade, o hexano e o etanol e os extratos resultantes também foram testados. A extração direta com hexano resultou no extrato hexânico de frutos secos e triturados de *P. emarginatus* (OSMT-1). Uma outra amostra de frutos foi extraída diretamente com etanol resultando no extrato etanólico de frutos secos e triturados de *P. emarginatus* (EESMT), (Tabela 3)

Tabela 3. Rendimento das extrações realizadas com frutos triturados de *Pterodon emarginatus* utilizando vários métodos extrativos.

Método extrativo	Solvente/tempo	Rendimento (%)
Maceração a frio	Hexano/10 dias – OSMT-MF	15
Aparelho de Soxhlet	Hexano/12 horas – OSMT-1	25
	Etanol/8 horas – EESMT-1	38
Extração supercrítica (EXP01), 35 °C, 150 bar	CO ₂ /6 horas – FSCPE/150	30
Extração supercrítica (EXP02), 35 °C, 250 bar	CO ₂ /6 horas – FSCPE/250	24

Estes extratos depois de removidos os solventes, foram testados com fêmeas de *A. aegypti* em várias concentrações, onde verificamos a maior atividade repelente dos extratos apolares, (Gráfico 6).

O extrato hexânico dos frutos de sucupira branca, obtido por extração em aparelho de soxhlet do lote 2001 (OSMT-1) e lote 2002 (OSMT-2), foi cromatografado em placa de sílica gel, utilizando como fase móvel à mistura hexano/acetato de etila (70:30) e reveladas com vanilina/H₂SO₄ Foi observada a presença dos diterpenos furânicos que se caracterizam pela coloração rósea intensa e várias outras bandas de coloração roxo e amarelo, caracterizando a presença outros terpenos e esteróides respectivamente. Os dois lotes cromatografados por CCF mostraram a permanência do perfil das substâncias presentes no lote de 2001, (Figura 26). Porém todo o trabalho foi realizado com os frutos do lote 2001, chamado de lote único.

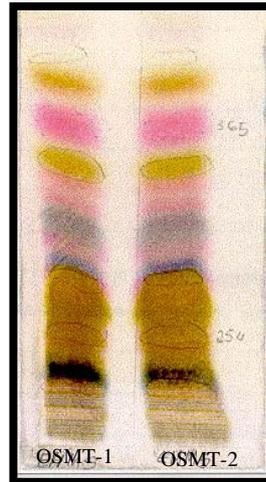


Fig. 26 Perfil em cromatografia de camada fina do extrato hexânico dos frutos de *Pterodon emarginatus*, colhidos no estado do Mato grosso em 2001(lote 01) e 2002 (lote 02).

Na extração com fluido supercrítico o extrato obtido dos frutos de sucupira branca foi coletado em frascos de vidro. A coleta foi dividida em 14 frações sendo nove para o primeiro experimento a 150 bar e cinco para o segundo, realizado a 250 bar, com intervalo de 30 minutos entre cada coleta. Estas frações foram aplicadas em placa de sílica gel e eluídas com a mistura dos solventes hexano e acetato de etila na proporção 70:30, com o objetivo de se verificar possível diferença entre as frações coletadas. Na mesma placa foram aplicados a fração da coluna cromatográfica do OSMT-1(F31-37) e o padrão de geraniogeraniol (Sigma). Foi observado um perfil idêntico nas duas extrações, tanto por CCF como por CGAR/EM verificando-se assim que o aumento da pressão, na extração supercrítica dos frutos de sucupira branca, não alterou o perfil químico do extrato de sucupira branca, (Figura 27). A única diferença encontrada nas duas extrações foi a redução no rendimento final do óleo dos frutos obtido a 250 bar, (FSCPE/250), (Tabela 3). Tal fato ocorreu provavelmente pela formação de caminhos preferenciais na matéria prima empacotada no cilindro, levando a uma extração menos eficiente, (ZANCAN, 2001).

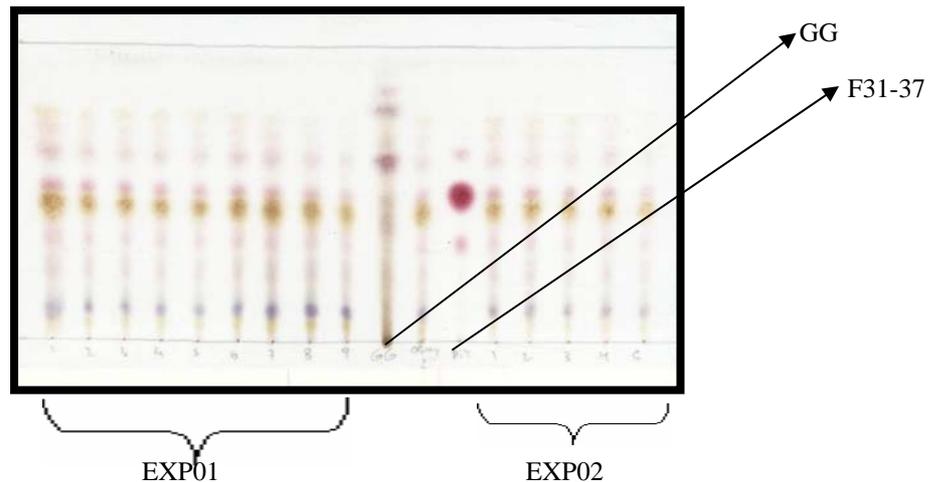


Figura 27: Perfil em cromatografia de camada fina das frações obtidas na extração supercrítica, dos frutos secos e triturados de *P. emarginatus*, utilizando CO₂ como solvente extrator.

GG-Geraniolgeraniol

F31-37 - Fração da Coluna Cromatográfica do OSMT-1

EXP01 - Extração supercrítica dos frutos de *Pterodon emarginatus*, 150 bar, 35 °C

EXP02 - Extração supercrítica dos frutos de *Pterodon emarginatus*, 250 bar, 35 °C

V.4. Testes Biológicos

V.4.1. Teste para verificação da atividade Larvicida

Os extratos etanólico, (EEBA e EEBA-D), hexânico (EHBA) de brácteas de urucuri e extrato hexânico (OSMT-1) e etanólico (EESMT-1) de sucupira branca, foram testados em 4 doses diferentes (100, 10, 1 e 0,1 ppm) frente a larvas de terceiro estágio das espécies *Culex quinquefasciatus* e *Aedes aegypti*, não apresentando atividade larvicida em nenhuma das doses, (Tabela 4a). O ácido palmítico isolado do EHBA também foi testado nas mesmas concentrações dos extratos (100, 10, 1 e 0,1 ppm), e também não apresentou atividade larvicida, (Tabela 4b). Estes resultados não corroboram os publicados por um grupo indiano que mostrou 66% de mortalidade das larvas de quarto estágio de *A. aegypti*, para o ácido palmítico, na concentração de 100 ppm. (RAHUMAN, 2000).

Tabela 4 a: Percentagens de mortalidade de larvas de terceiro estágio de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*, após 24 h de exposição a diferentes

concentrações de vários dos extratos de brácteas de *Attalea excelsa*.

Extratos (ppm) hexânico EHBA	Espécie	Nº larvas testadas	% M
0,1	<i>A. aegypti</i>	50	0
	<i>C. quinquefasciatus</i>		0
1,0	<i>A. aegypti</i>	50	0
	<i>C. quinquefasciatus</i>		0
10,0	<i>A. aegypti</i>	50	0
	<i>C. quinquefasciatus</i>		0
100,0	<i>A. aegypti</i>	50	0
	<i>C. quinquefasciatus</i>		0
etanólico bruto EEBA	Espécie	Nº larvas testadas	% M
0,1	<i>A. aegypti</i>	50	0
	<i>C. quinquefasciatus</i>		0
1,0	<i>A. aegypti</i>	50	0
	<i>C. quinquefasciatus</i>		0
10,0	<i>A. aegypti</i>	50	0
	<i>C. quinquefasciatus</i>		0
100,0	<i>A. aegypti</i>	50	0
	<i>C. quinquefasciatus</i>		0
etanólico desengordurado EEBA-D	Espécie	Nº larvas testada	% M
0,1	<i>A. aegypti</i>	50	0
	<i>C. quinquefasciatus</i>		0
1,0	<i>A. aegypti</i>	50	0
	<i>C. quinquefasciatus</i>		0
10,0	<i>A. aegypti</i>	50	0
	<i>C. quinquefasciatus</i>		0
100,0	<i>A. aegypti</i>	50	0
	<i>C. quinquefasciatus</i>		0

Tabela 4 b: Percentagens de mortalidade de larvas de terceiro estágio de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* após 24 h de exposição a diferentes

concentrações do ácido palmítico.

Concentração (ppm) Ácido Palmítico	Repetição	Nº larvas testadas	% M
0,1	<i>A. aegypti</i>	50	0
	<i>C. quinquefasciatus</i>		0
1,0	<i>A. aegypti</i>	50	0
	<i>C. quinquefasciatus</i>		0
10,0	<i>A. aegypti</i>	50	0
	<i>C. quinquefasciatus</i>		0
100,0	<i>A. aegypti</i>	50	0
	<i>C. quinquefasciatus</i>		0

Tabela 4 c: Percentagens de mortalidade de larvas de terceiro estágio de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*, após 24 h de exposição a diferentes concentrações de vários dos extratos de frutos de *Pterodon emarginatus*

Extratos (ppm) hexânico OSMT-1	Espécie	Nº larvas testadas	% M
0,1	<i>A. aegypti</i>	50	0
	<i>C. quinquefasciatus</i>		0
1,0	<i>A. aegypti</i>	50	0
	<i>C. quinquefasciatus</i>		0
10,0	<i>A. aegypti</i>	50	0
	<i>C. quinquefasciatus</i>		0
100,0	<i>A. aegypti</i>	50	0
	<i>C. quinquefasciatus</i>		0
etanólico bruto EESMT-1	Espécie	Nº larvas testadas	% M
0,1	<i>A. aegypti</i>	50	0
	<i>C. quinquefasciatus</i>		0
1,0	<i>A. aegypti</i>	50	0
	<i>C. quinquefasciatus</i>		0
10,0	<i>A. aegypti</i>	50	0
	<i>C. quinquefasciatus</i>		0
100,0	<i>A. aegypti</i>	50	0
	<i>C. quinquefasciatus</i>		0

V.4.2. Teste para verificação da atividade Adulticida

Os extratos hexânicos de sucupira branca (OSMT-1) e urucuri (EHBA) foram impregnados em papel de filtro e testados com fêmeas adultas de *A. aegypti* para verificação da mortalidade destas fêmeas.

Na dose de 1g de extrato (EHBA e OSMT-1) por cm², não foi verificada a alteração no comportamento dos mosquitos após 24 horas da exposição, nem a morte de nenhuma fêmea dos mosquitos testados.

V.4.3. Repelência em superfície impregnada (antebraço humano)

Os extratos brutos (hexânico e etanólico) de ambas as plantas e as frações obtidas em coluna cromatográfica a partir do fracionamento dos extratos mais ativos foram solubilizados em acetona, aplicados em antebraço humano de voluntários, nas doses 5,0; 2,0; 1,0 e 0,5 mg/cm² e expostos a 25 fêmeas de *A. aegypti*. Nos intervalos de 0, 1, 2, 4, 6 e 8 horas pós-tratamento fazia-se a leitura de quantos mosquitos se alimentaram no espaço de cinco minutos. Um braço era tratado com a amostra (teste) e o outro somente com o solvente (controle), (Figura 25). Para controle positivo foi utilizado como repelente padrão a N,N-dietil-m-toluamida (DEET) presente em várias formulações do mercado cuja dose para inibir a alimentação de 100% das fêmeas de *A. aegypti*, por um período de oito horas é de 0,5 mg/cm², dose esta determinada por nós em laboratório.

Attalea excelsa

Vários extratos de urucuri foram testados utilizando fêmeas de *A. aegypti* com a finalidade de se localizar a atividade repelente reportada popularmente. Começamos os testes com extratos de polaridades diferentes (apolar e polar), foram testados os extratos hexânico (EHBA), etanólico (EEBA) e etanólico desengordurado, (EEBA-D) de brácteas de *A. excelsa* nas doses 5,0; 2,0; 1,0 e 0,5 mg/cm². O extrato hexânico aplicado no braço apresentou uma excelente atividade repelente, pois mesmo na menor dose (0,5 mg/cm²) nenhuma fêmea do mosquito se alimentou no intervalo de 8 horas, além de ficarem afastadas do

braço tratado, comportamento idêntico ao dos mosquitos expostos ao repelente sintético DEET. No braço controle as fêmeas dos mosquitos se alimentaram normalmente e apresentaram comportamento normal, (Gráfico 1). O extrato etanólico na dose de 0,5 mg/cm² não apresentou atividade repelente, esta somente apareceu na dose de 1 mg/cm² por um período menor, de 6 horas, (Gráfico 2). O extrato etanólico desengordurado foi testado nas mesmas condições, apresentando atividade repelente de 8 horas, somente nas doses de 2 e 5 mg/cm² não sendo ativo nas menores doses, (Gráfico 3), nos mostrando a importância da presença dos ácidos graxos para a permanência da atividade repelente. Partindo destes resultados, nós nos concentramos no estudo do extrato hexânico das brácteas de urucuri, cuja performance foi muito melhor que a dos outros extratos.

O mesmo procedimento foi repetido com as frações obtidas na coluna cromatográfica do EHBA, (Esquema 1). As frações diclorometano (FD) e diclorometano/acetato de etila (FD/AE) apresentaram excelente repelência, na dose de 0,5 mg/cm² ao contrário das outras frações que não apresentaram atividade, (Gráfico 4). A análise por CG/EM se concentrou nestas duas frações com o objetivo de identificar as substâncias responsáveis por esta atividade. A análise do EHBA por CG/EM mostrou a abundância do ácido palmítico, o que era de se esperar na família Palmae. Este foi isolado por placas preparativas da fração hexano/diclorometano e também testado nas concentrações 2,0; 1,0 e 0,5 mg/cm², não apresentando atividade, (Gráfico 5).

Gráfico 1: Percentagem de inibição da alimentação de fêmeas de *Aedes aegypti* expostas à pele humana tratada com extrato hexânico das brácteas secas de *Attalea excelsa* (EHBA).

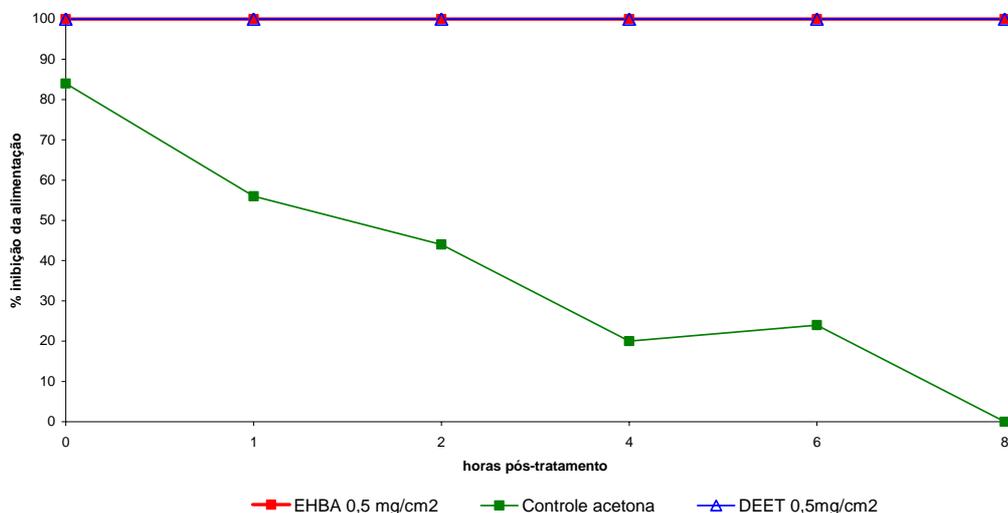


Gráfico 2: Percentagem de inibição da alimentação de fêmeas de *Aedes aegypti* expostas à pele humana tratada com extrato etanólico das brácteas secas de *Attalea excelsa* (EEBA).

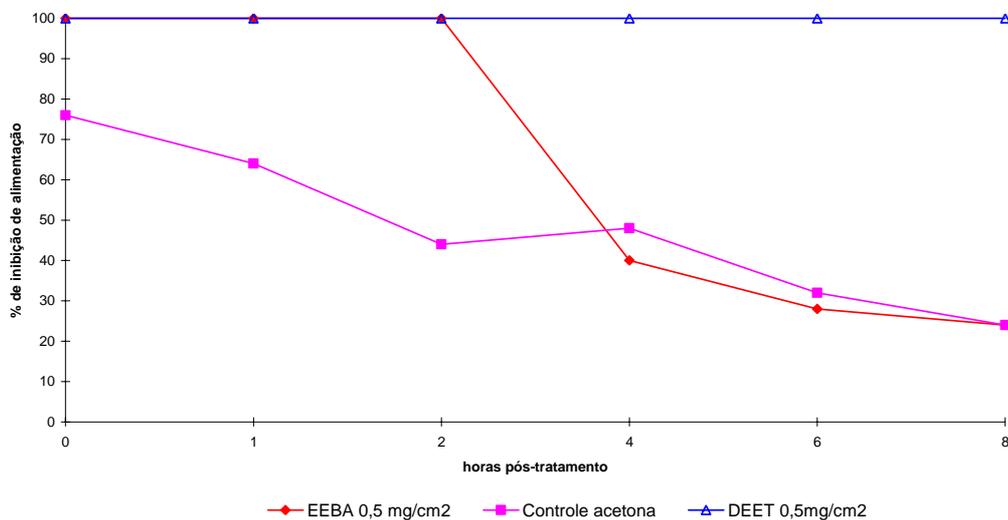


Gráfico 3: Percentagem de inibição da alimentação de fêmeas de *Aedes aegypti* expostas à pele humana tratada com extrato etanólico desengordurado das brácteas secas de *Attalea excelsa* (EEBA-D).

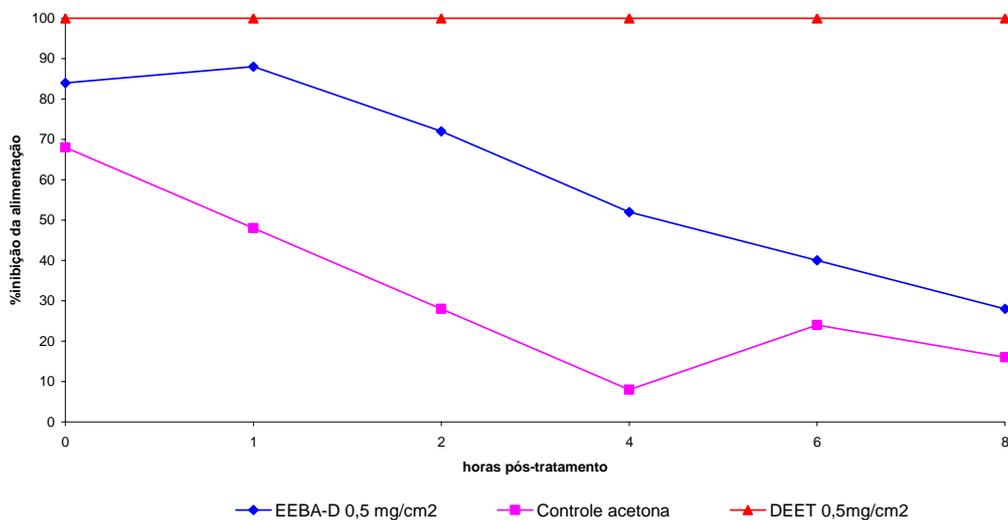


Gráfico 4: Percentagem de inibição da alimentação de fêmeas de *Aedes aegypti* expostas à pele humana tratada com frações da coluna cromatográfica do extrato hexânico das brácteas secas de *Attalea excelsa*.

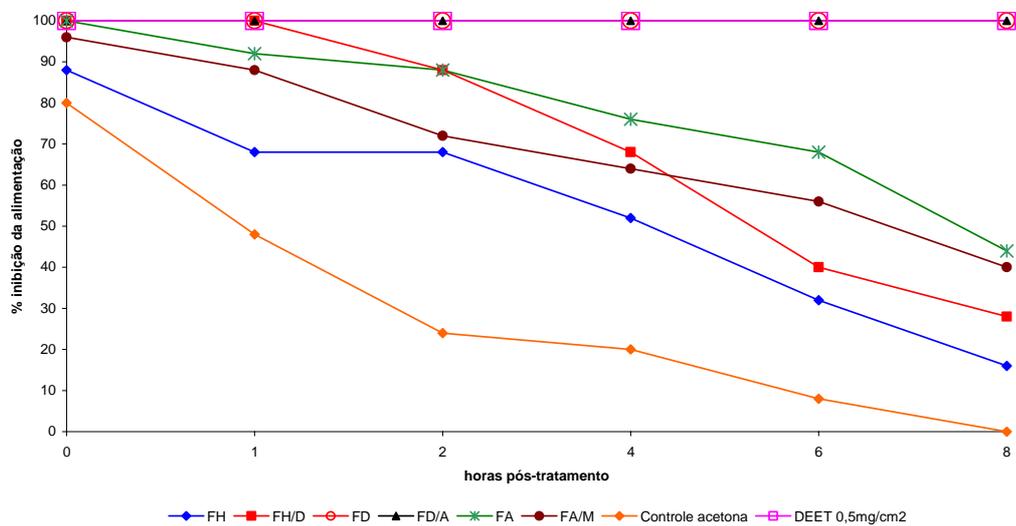
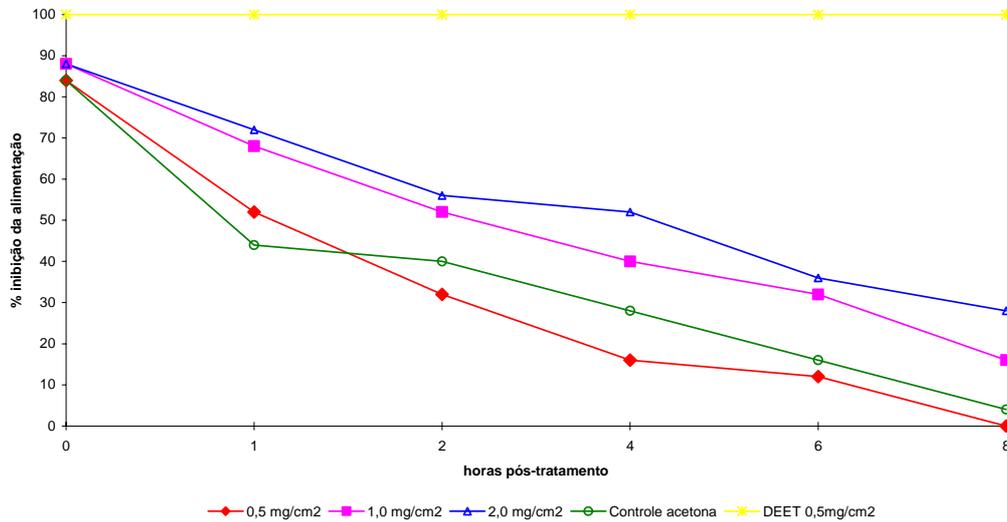


Gráfico 5: Percentagem de inibição da alimentação de fêmeas de *Aedes aegypti* expostas à pele humana tratada com ácido palmítico das brácteas secas de *Attalea excelsa*



Pterodon emarginatus

O mesmo procedimento dos testes realizados com os extratos de urucuri foi repetido com os extratos de sucupira branca. Os primeiros experimentos foram feitos com o óleo obtido da extração dos frutos secos de sucupira branca com hexano, OSMT-1, seguido pelo extrato etanólico, EESMT-1, fração 31-37 e com o diterpeno isolado $6\alpha,7\beta$ -diacetoxivouacapan- 17β -oato de metila. Foram também testadas as frações obtidas na partição, fração hexano (FH-P); diclorometano (FD-P); acetato de etila (FAE-P).

O extrato apolar, OSMT-1 apresentou melhor performance por um período de 8 horas na menor dose, $0,5 \text{ mg/cm}^2$, (Gráfico 6); já o extrato etanólico dos frutos de sucupira branca (EESMT-1) foi ativo por 8 horas em uma dose 4 vezes maior (2 mg/cm^2), (Gráfico 7), mostrando que a atividade repelente da sucupira está na sua parte apolar, assim como o urucuri.

Tanto a fração 31-37, como o diterpeno isolado $6\alpha,7\beta$ -diacetoxivouacapan-

17 β -oato de metila, não apresentaram atividade repelente nas duas doses testadas (0,5 e 1mg/cm²) frente a fêmeas de *A. aegypti*, mostrando que estes diterpenos não são ativos, apesar de estarem em grande quantidade no óleo, (Gráfico 8 e Gráfico 9).

As frações obtidas da partição foram testadas em uma dose duas vezes maior (1mg/cm²) que a dose efetiva do repelente sintético DEET (0,5 mg/cm²). A fração hexânica (FH-P) apresentou baixa repelência, ou seja, os mosquitos voltaram a se alimentar 1 hora após a exposição a esta fração. Já a fração diterpênica (FD-P) apresentou uma ação repelente por 6 horas, ao contrário da fração acetato de etila (FAE-P), que na dose testada não repeliu nenhuma fêmea, (Gráfico 10).

Gráfico 6: Percentagem de inibição da alimentação de fêmeas de *Aedes aegypti* expostas à pele humana tratada com extrato hexânico dos frutos secos e triturados de *Pterodon emarginatus* (OSMT-1).

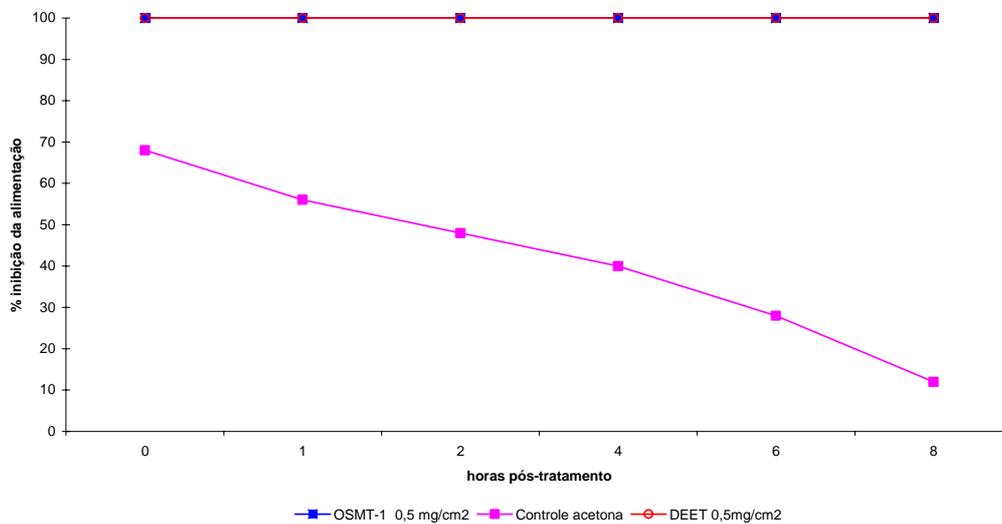


Gráfico 7: Percentagem de inibição da alimentação de fêmeas de *Aedes aegypti* expostas à pele humana tratada com extrato etanólico dos frutos secos e triturados de *Pterodon emarginatus* (EESMT-1).

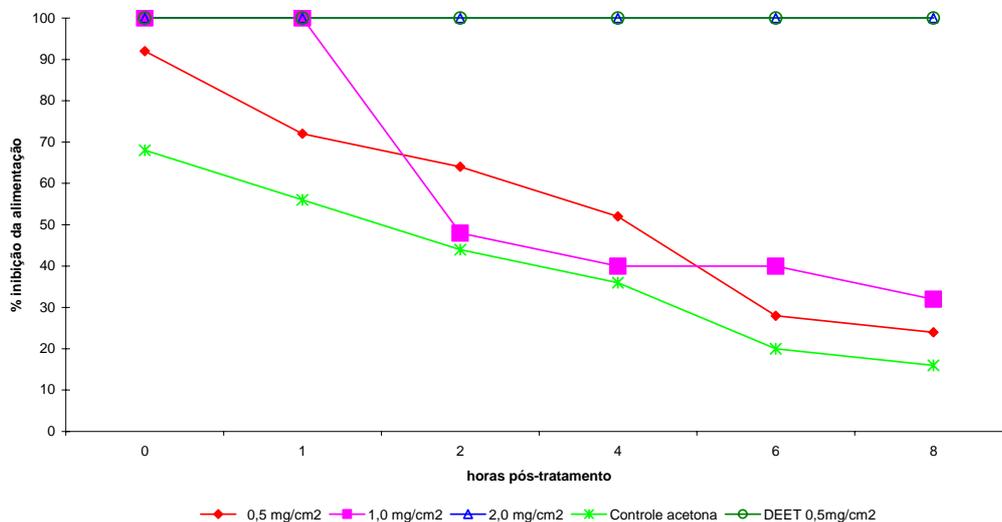


Gráfico 8: Percentagem de inibição da alimentação de fêmeas de *Aedes aegypti* expostas à pele humana tratada com a fração 31-37 obtida na coluna cromatográfica do extrato hexânico dos frutos secos e triturados de *Pterodon emarginatus*.

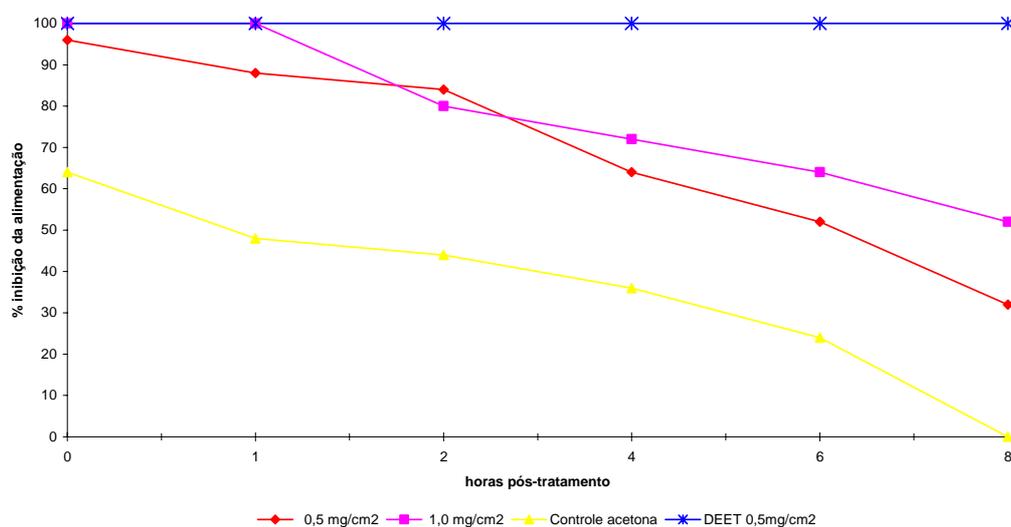


Gráfico 9: Percentagem de inibição da alimentação de fêmeas de *Aedes aegypti* expostas à pele humana tratada com o 6 α ,7 β -diacetoxivouacapan-17 β -oato de metila. Diterpeno isolado por placa preparativa da mistura de diterpenos de *Pterodon emarginatus*.

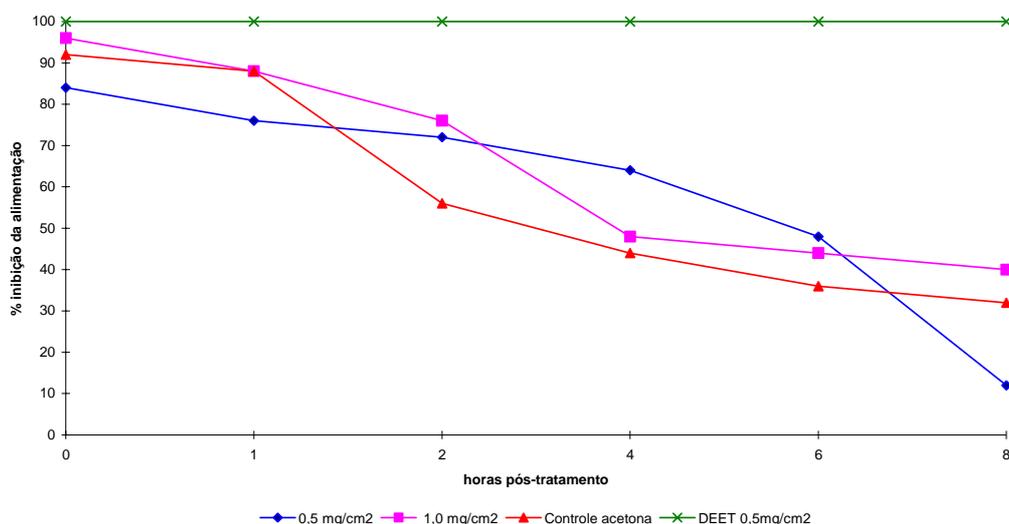
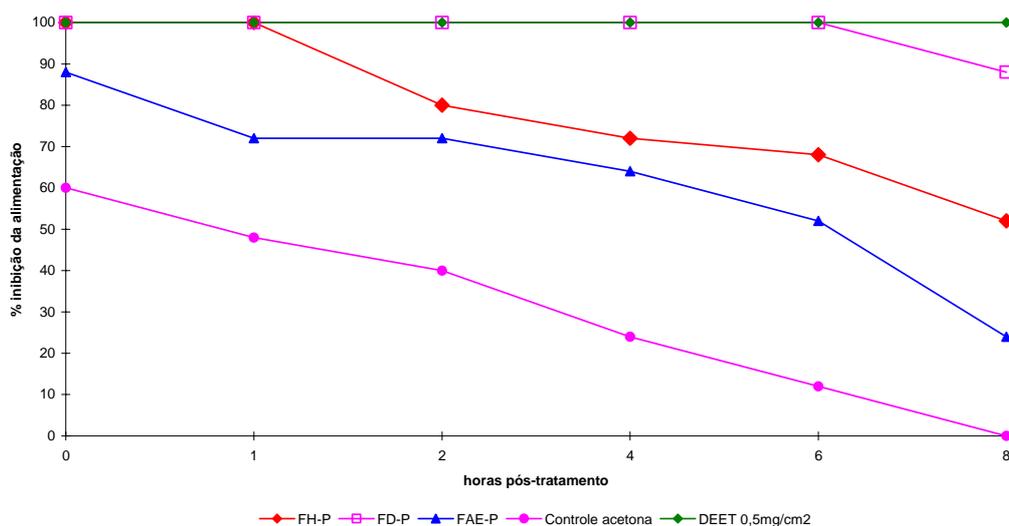


Gráfico 10: Percentagem de inibição da alimentação de fêmeas de *Aedes aegypti* expostas à pele humana tratada com frações obtidas por partição com gradiente de solventes, do extrato etanólico de frutos de *P. emarginatus* (EESMT-1), na dose de 1,0 mg/cm².



V.5. Fracionamento dos Extratos

V.5.1. *Attalea excelsa*

Após o resultado dos ensaios de repelência com os vários extratos preparados das brácteas de urucuri, decidimos pelo fracionamento daquele que se apresentou mais ativo, que foi o extrato hexânico obtido através da técnica de Soxhlet (EHBA). O perfil químico do extrato em questão foi determinado por cromatografia com fase gasosa acoplada ao espectrômetro de massas, tendo evidenciado grande proporção de ácido palmítico (48%), oléico (25%) e linoleico (12%). Esse extrato (EHBA) foi fracionado em coluna cromatográfica de gel de sílica, conforme descrito (Tabela 02) obtendo-se 7 frações que foram analisadas por CCF em sílica gel 60 F₂₅₄, reveladas com ácido fosfomolibdico (Figura 28a) e solução de vanilina/H₂SO₄, (Figura 28b).

Os resultados das análises por CG-EM deste extrato e das frações da coluna, estão descritos separadamente no item V.6. Em paralelo foram realizados testes para avaliação da atividade repelente destas frações, onde verificou a presença da atividade repelente somente nas frações diclorometano (FD) e na diclorometano/acetato de etila (FD/AE), (Gráfico 4).

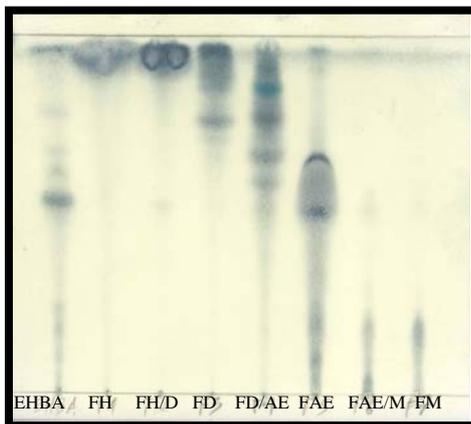


Figura 28 a: cromatografia em camada fina das frações obtidas na coluna de sílica gel do EHBA eluídas na mistura de hexano/acetato de etila na proporção de 7:3, usando como revelador químico o ácido fosfomolibdico

FH: fração hexano; FH/FD: fração hexano/diclorometano; FD: fração diclorometano; FAE: fração acetato etila; FM: metanol; FD/AE: fração diclorometano/acetato etila; FAE/M: fração acetato etila/metanol

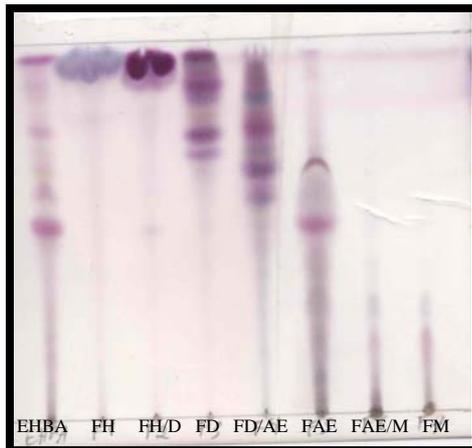


Figura 28 b: cromatografia em camada fina das frações obtidas na coluna de sílica gel do EHBA eluídas na mistura de hexano/acetato de etila na proporção de 7:3, usando como revelador químico vanilina/H₂SO₄.

FH: fração hexano; FH/FD: fração hexano/diclorometano; FD: fração diclorometano; FAE: fração acetato etila; FM: metanol; FD/AE: fração diclorometano/acetato etila; FAE/M: fração acetato etila/metanol.

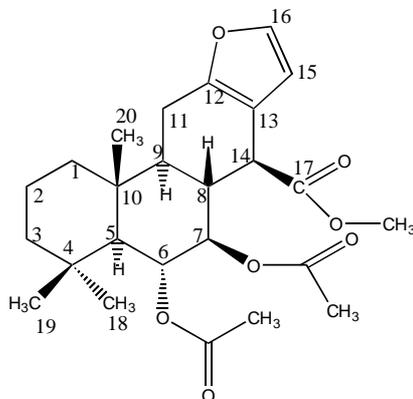
V.5.2. *Pterodon emarginatus*

Os extratos obtidos a partir dos frutos de sucupira branca (OSMT-1), levaram ao isolamento de um diterpeno pertencente ao grupo dos diterpenos tricíclicos furânicos, e que podem apresentar um número grande de atividades biológicas diferentes. O 6 α ,7 β -diacetoxivouacapan-17 β -oato de metila foi isolado com o objetivo de se verificar sua relação com a atividade repelente presente no extrato hexânico de sucupira branca. Outras substâncias foram caracterizadas pela análise direta por CGAR/EM, do extrato hexânico e etanólico dos frutos de *P. emarginatus*.

V.5.2.1. Caracterização do diterpeno furânico 6 α ,7 β -diacetoxivouacapan-17 β -oato de metila

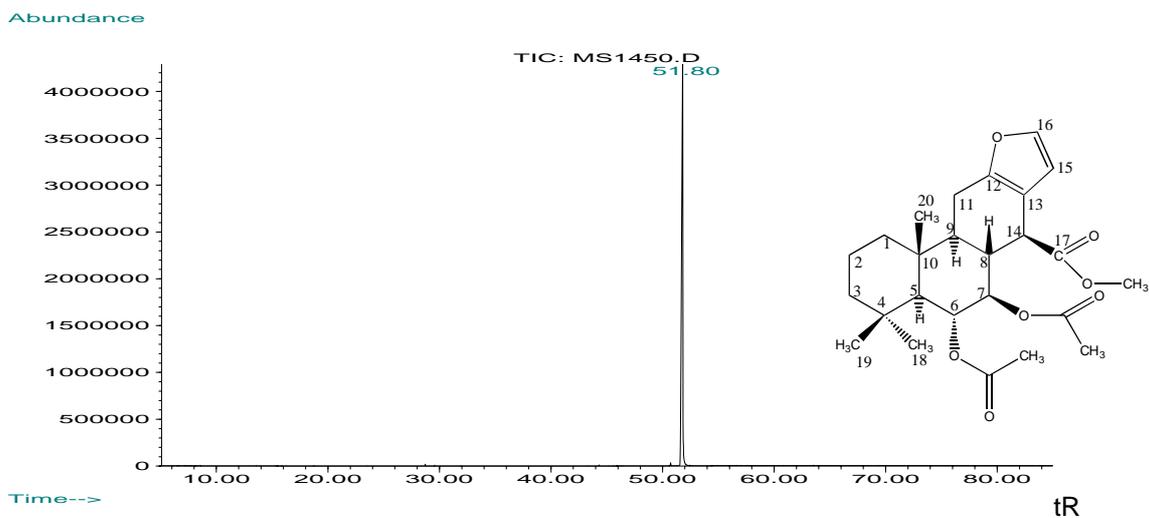
As frações 31-37 obtidas da coluna cromatográfica do extrato hexânico de frutos de sucupira branca (OSMT-1), foram fracionadas por cromatografia preparativa, originando quatro frações.

A fração denominada F02-p apresentou aspecto cristalino, com ponto de fusão entre 205 e 206,5 °C. A análise dos dados espectrais sugeriu que fosse o diterpeno furânico 6 α ,7 β -diacetoxivouacapan-17 β -oato de metila.

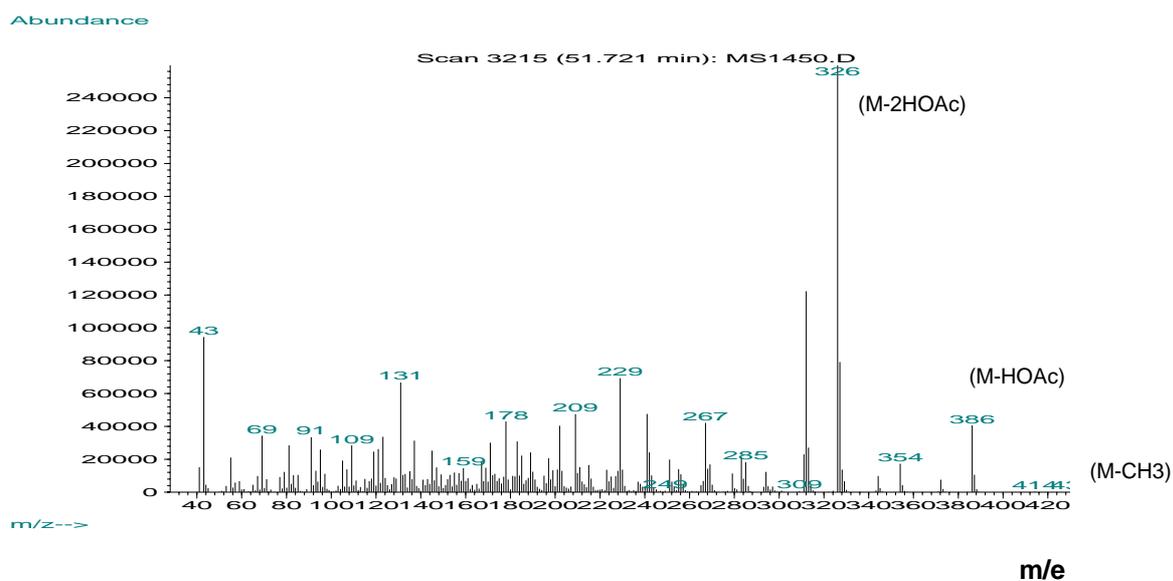


6 α ,7 β -diacetoxivouacapan-17 β -oato de metila
(C₂₅H₃₄O₇ - PM = 446)

O espectro de massas da substância, (Espectro 2), corresponde ao espectro de massa do diterpeno tricíclico furânico 6 α ,7 β -diacetoxivouacapan-17 β -oato de metila, que mostrou sinais a m/z 386, 354, 326, 285, 267, 229, 209, 178, 159, 131, 109, 91, 69 e 43 e pico base a m/z 326. O sinal relacionado ao íon molecular não foi observado, provavelmente a perda de um grupamento acetoxi (60), do íon molecular (446) deu origem ao fragmento m/z 386. O pico base originou-se provavelmente da perda de dois grupos acetoxi do (M-120).



Cromatograma 1: Perfil por cromatografia com fase gasosa do diterpeno $6\alpha,7\beta$ -diacetoxivouacapan- 17β -oato de metila.



Espectro 1: Espectro de massas do $6\alpha,7\beta$ -diacetoxivouacapan- 17β -oato de metila.

O espectro de RMN ^1H , (Espectro 2), mostra dois sinais na forma de singletes largos a 6,10 e 7,23, relacionados respectivamente aos hidrogênios 15 e 16 do anel furânico. O singlete a 3,70 ppm corresponde aos hidrogênios do grupamento metila ligado ao éster no C-14. Os singletes em 0,96; 0,98 e 1,03 ppm correspondem aos sinais dos hidrogênios metílicos em C-18, C-19 e C-20 e os grupamentos acetoxi ligados respectivamente aos C-6 e C-7 podem ser identificados pelos sinais em 4,98 e 5,45 ppm, correspondentes aos hidrogênios dos grupamentos metílicos vizinhos à carbonila do éster.

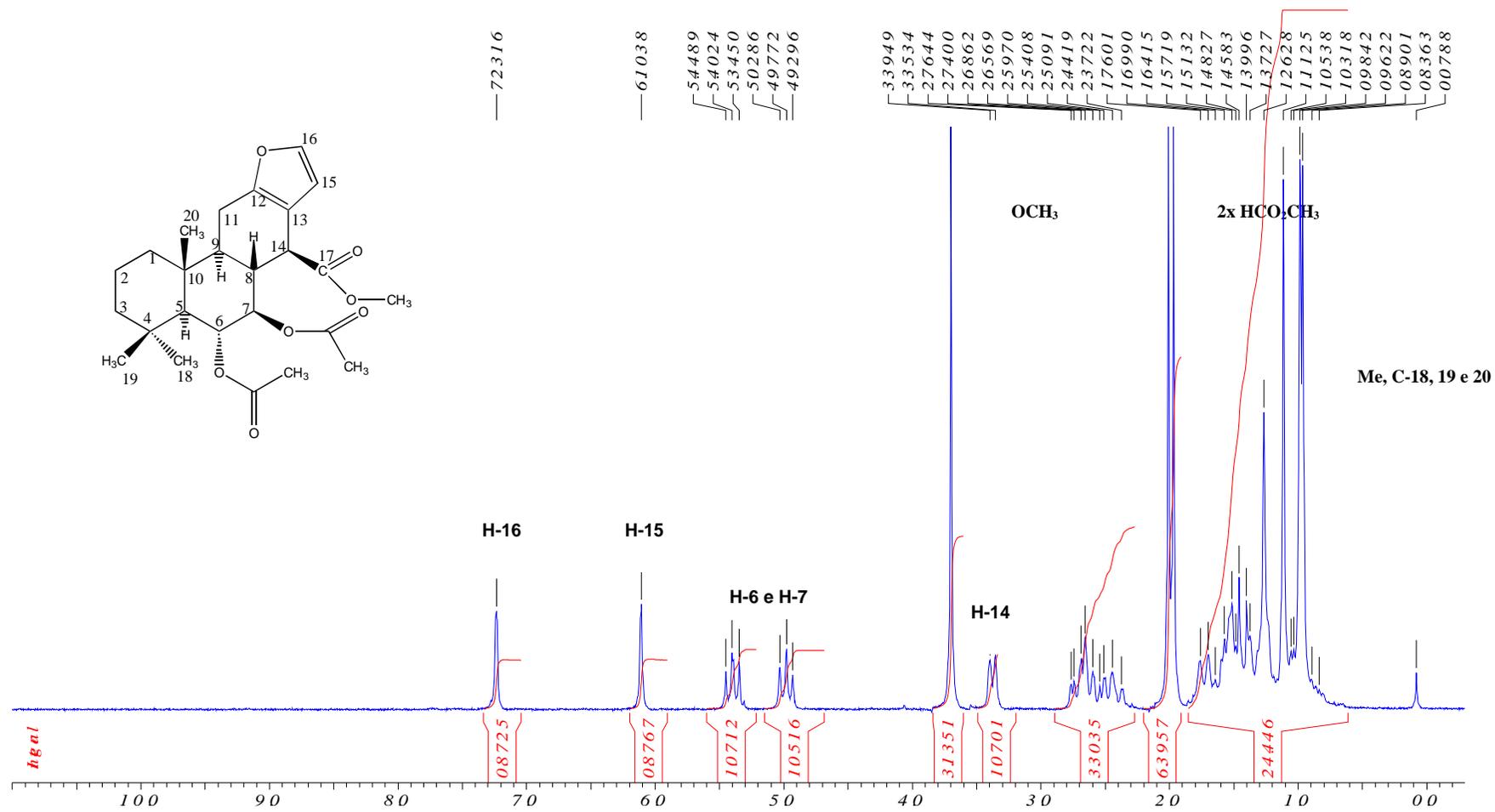
O quadro 2 mostra os sinais que tiveram suas multiplicidades definidas no espectro de RMN ^{13}C , (Espectro 3). Estes sinais estão de acordo com aqueles descritos na literatura (MAHAJAN, 1973; CAMPOS, 1994 E ARRIAGA, 2000).

Quadro 2: Deslocamentos químicos (ppm) atribuídos aos átomos de carbono da substância 6 α ,7 β -diacetoxivouacapan-17 β -oato de metila.

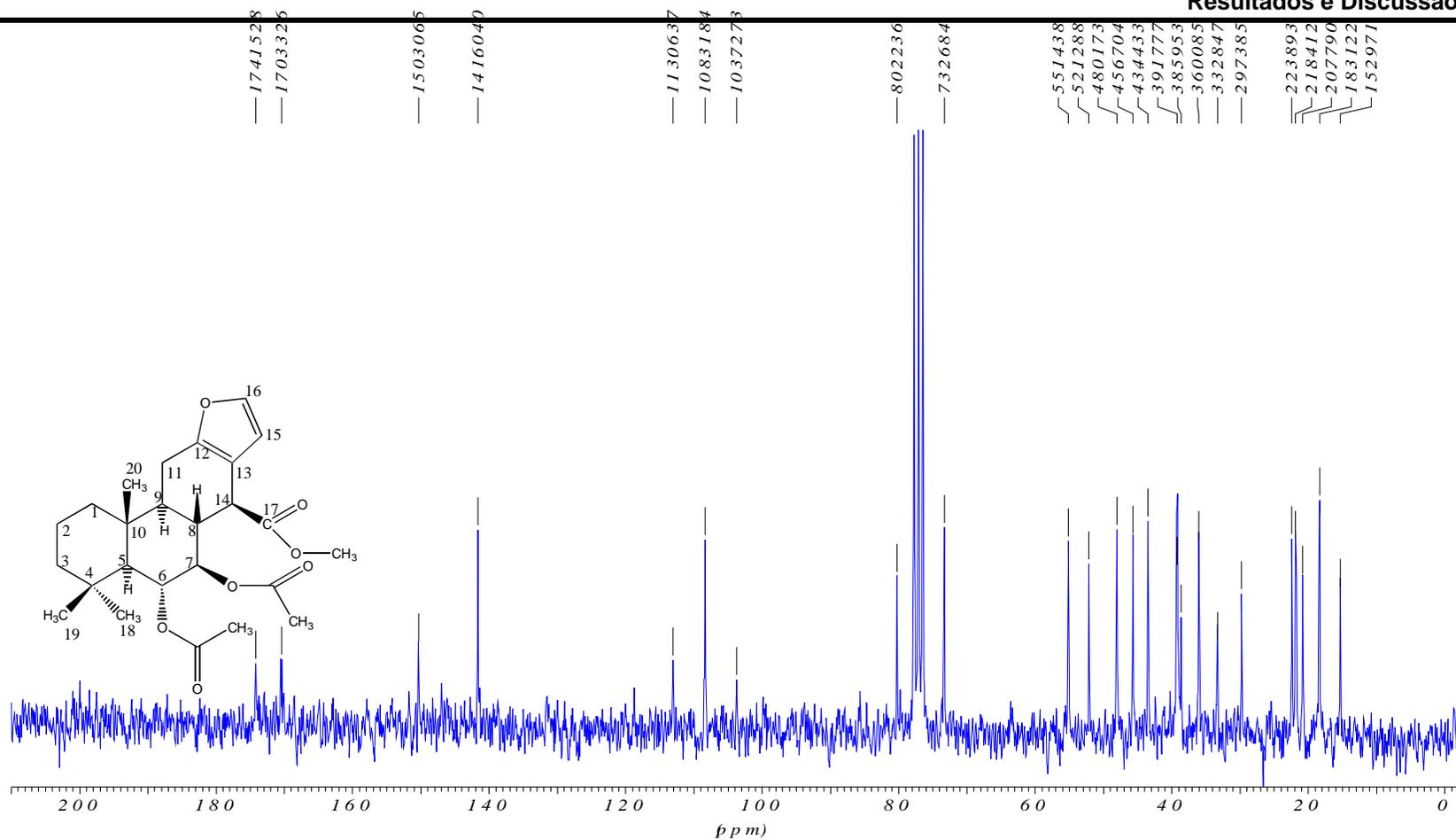
C	CH	CH₂	CH₃
33,28 (C-4)	55,14 (C-5)	39,17 (C-1)	35,89 (C-18)
38,59 (C-10)	170,33 (C-6)	18,31 (C-2)	20,78 (C-19)
150,30 (C-12)	174,15 (C-7)	43,44 (C-3)	15,29 (C-20)
113,06 (C-13)	48,01 (C-8)	22,39 (C-11)	52,13 (MeO-17)
170,33 (C-17)	45,67 (C-9)		80,28 (C-22)
21,84 (C-24 ou 25)	141,60 (C-14)		73,27 (C-23)
	108,31 (C-15)		
	103,70 (C-16)		

No espectro de DEPT, (Espectro 4), observou-se a presença de quatro grupos CH₂ e oito CH. Verificamos o total de 17 carbonos, excetuando os quartenários, o que está de acordo com a estrutura proposta C₂₅H₃₄O₇.

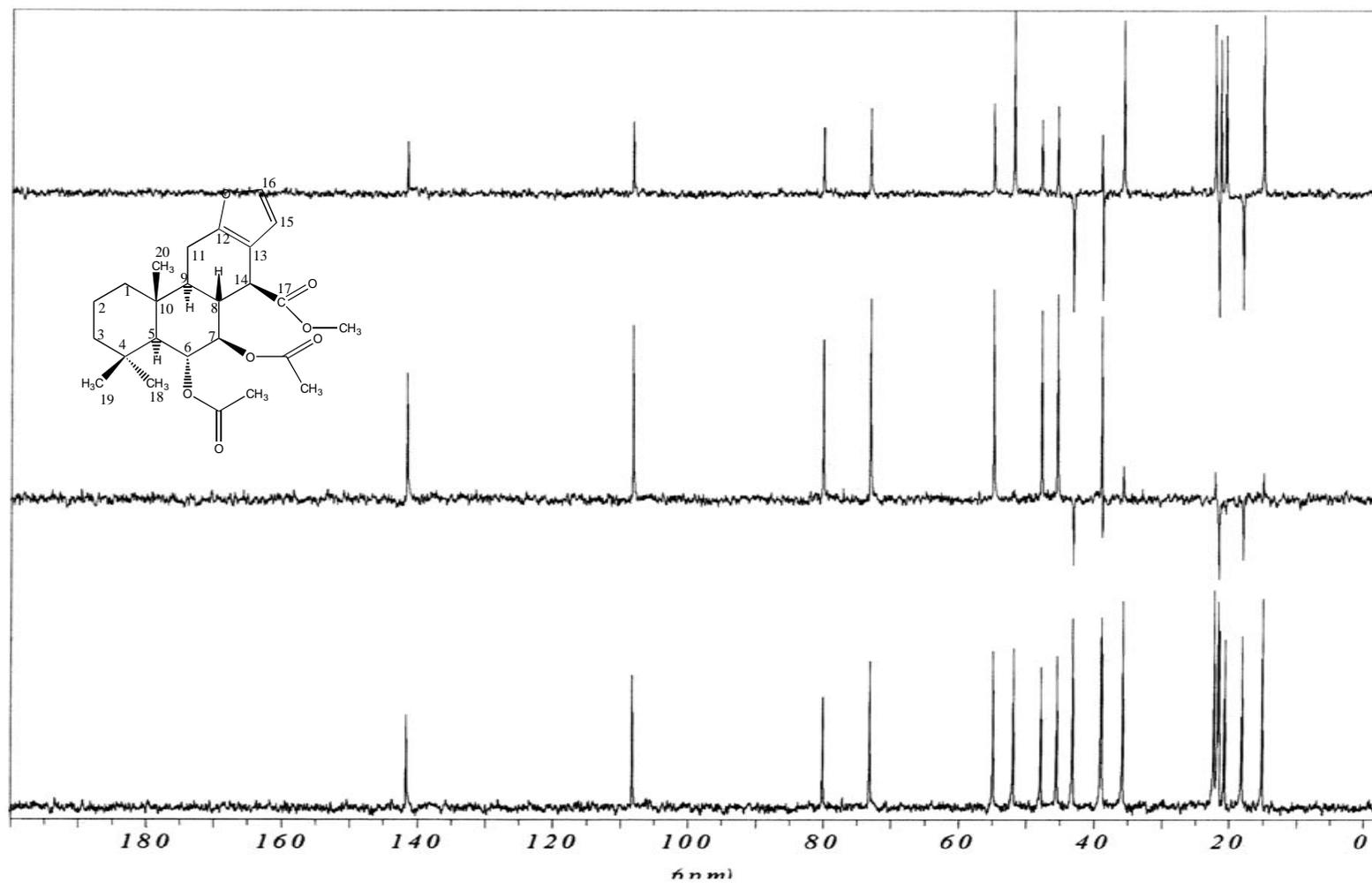
Dt



Espectro 2: RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) de 6 α ,7 β -diacetoxivouacapan-17 β -oato de metila



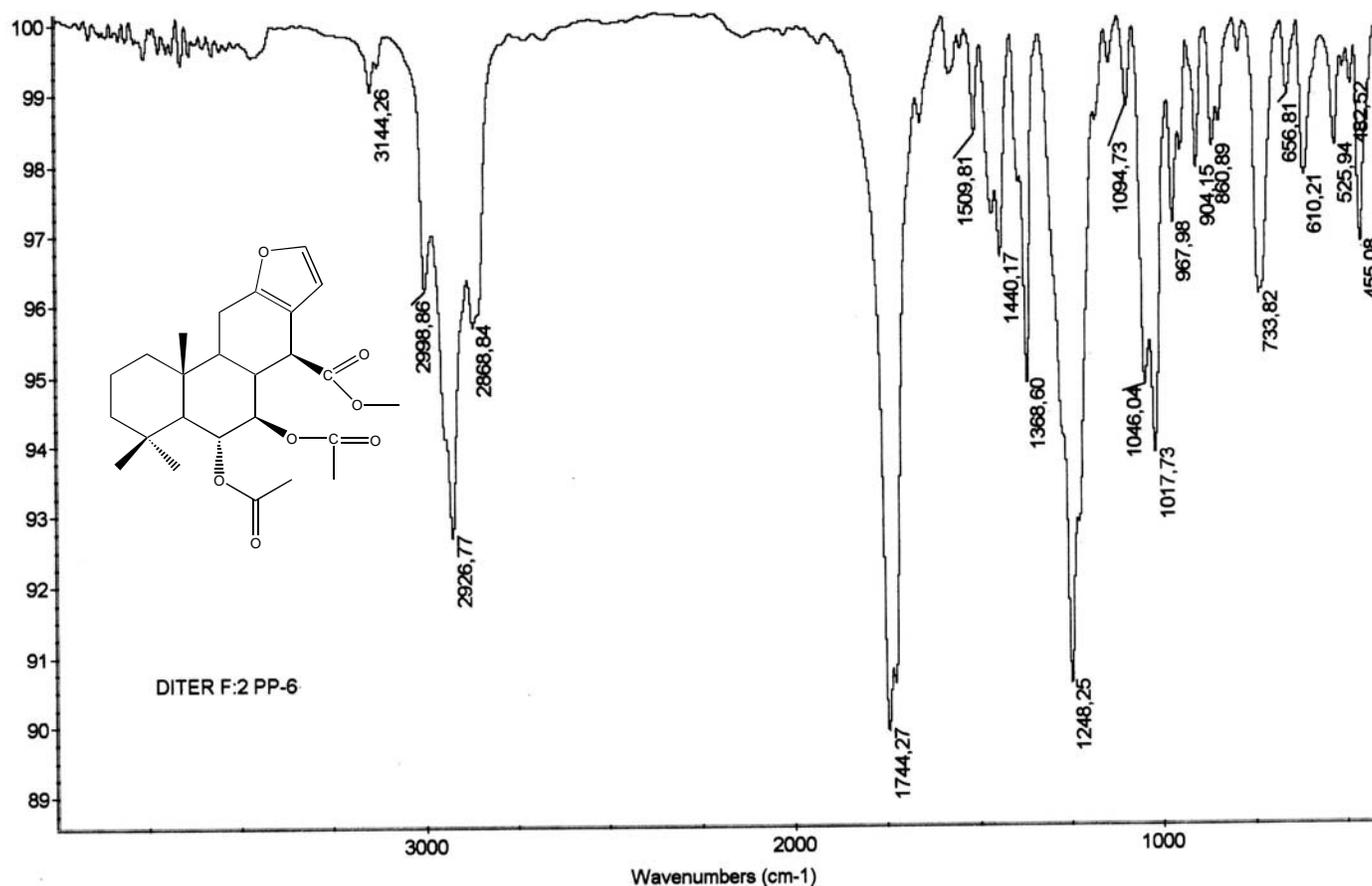
Espectro 3: RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) de 6 α ,7 β -diacetoxivouacapan-17 β -oato de metila



Espec

tro 4: RMN ^{13}C (DEPT) de 6 α ,7 β -diacetoxivouacapan-17 β -oato de metila

O espectro de absorção na região do infravermelho, (Espectro 5), apresentou sinais principais em 1744 cm^{-1} (estiramento da ligação C=O dos acetatos); 1248 cm^{-1} (vibração da deformação assimétrica C-O do acetato); 1017 cm^{-1} (vibração da deformação assimétrica C-O-C de éster) e 734 cm^{-1} (furano)



Espectro 5: Espectro de infravermelho (KBr) de $6\alpha,7\beta$ -diacetoxivouacapan- 17β -oato de metila

V.6 Análise por Cromatografia com Fase Gasosa de Alta Resolução acoplada ao Espectrômetro de Massas (CGAR/EM)

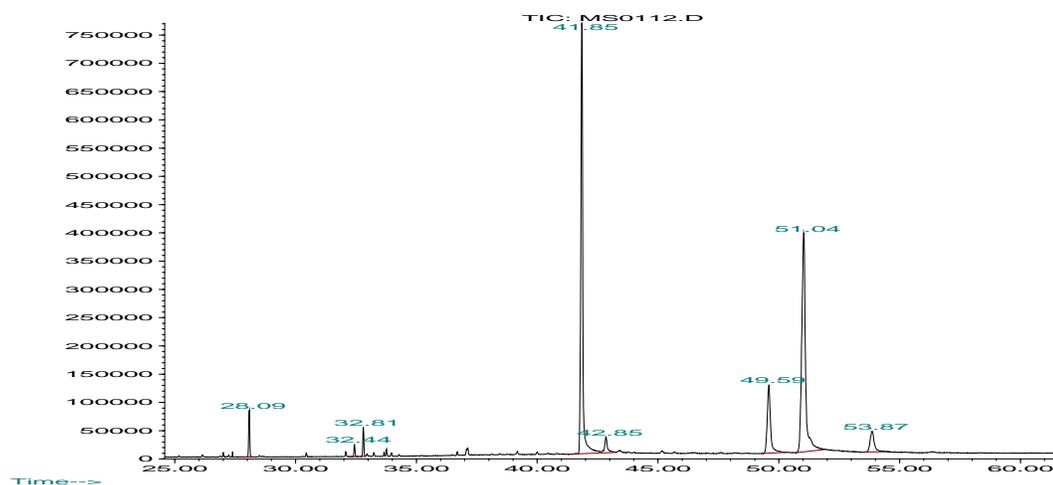
A rapidez e a extrema sensibilidade do CGAR-EM é de particular vantagem na análise de substâncias em extratos vegetais por permitir a detecção das substâncias presentes em pequena concentração.

A identificação através do CGAR-EM requer comparação dos espectros de massa com um padrão e se este não estiver disponível recorre-se à literatura.

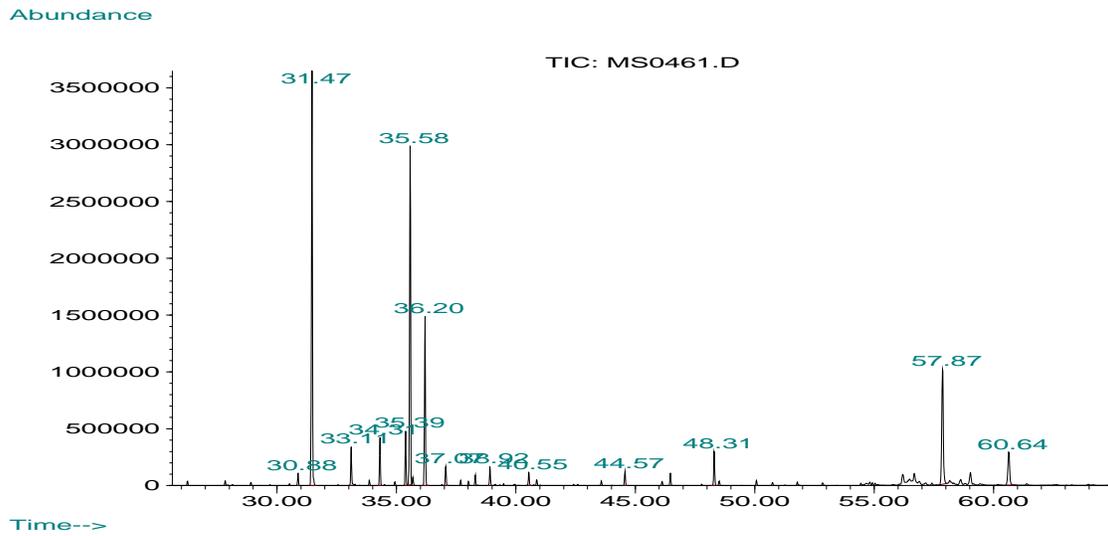
No início deste trabalho três colunas capilares foram testadas, HP-1 (100% dimetilpolisiloxano-apolar), HP-5 (5% fenil metilpolisiloxano-apolar) e HP-WAX (polietilenoglicol-polar) para a verificação da seletividade dos sinais cromatográficos. A coluna HP-5 (5% fenil metilpolisiloxano-apolar) apresentou melhor resolução. Todos os extratos e frações de *A. excelsa* e *P. emarginatus* foram submetidos à análise por cromatografia com fase gasosa de alta resolução acoplada ao espectrômetro de massas, utilizando a coluna HP-5.

V.6.1. Perfis por CGAR/EM em diferentes colunas capilares dos extratos hexânicos de brácteas de *Attalea excelsa* (EHBA) e *Pterodon emarginatus* (OSMT-1)

Attalea excelsa

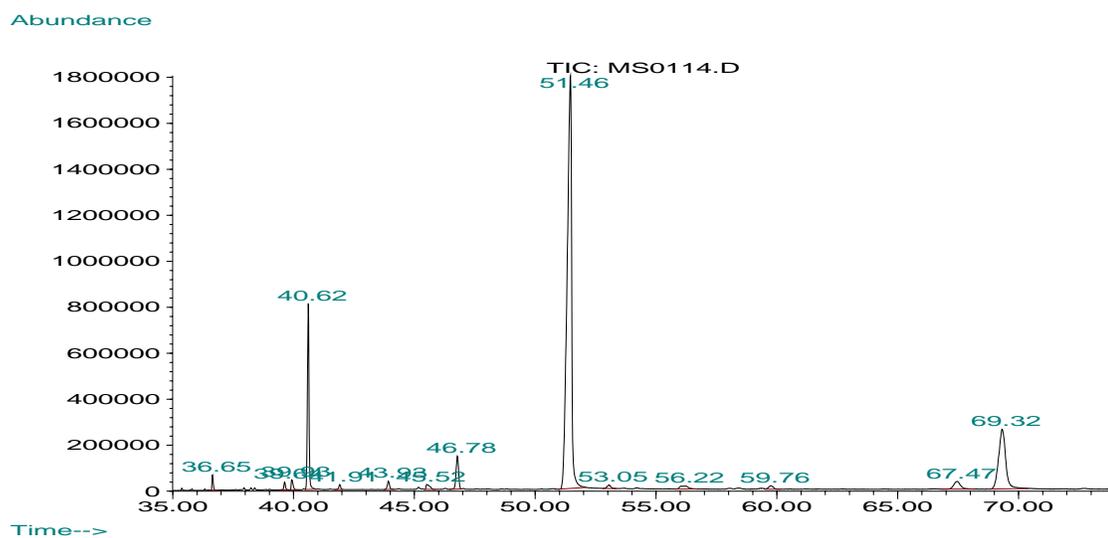


Cromatograma 2a: Perfil por cromatografia com fase gasosa do extrato hexânico de bráctea de *A excelsa* (EHBA) na coluna capilar HP-WAX (polietilenoglicol-polar)

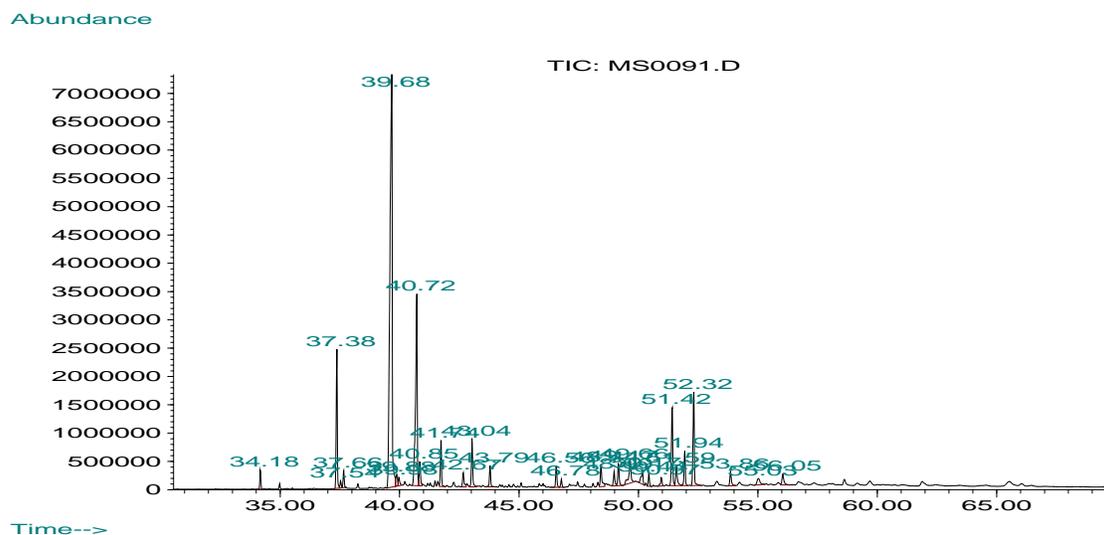


Cromatograma 2b: Perfil por cromatografia com fase gasosa do extrato hexânico de bráctea de *A. excelsa* (EHBA), HP-1 (100% dimetilpolisiloxano-apolar)

Pterodon emarginatus



Cromatograma 2c: Perfil por cromatografia com fase gasosa do extrato hexânico de frutos de *P. emarginatus* (OSMT-1) na coluna capilar HP-WAX (polietilenoglicol-polar)



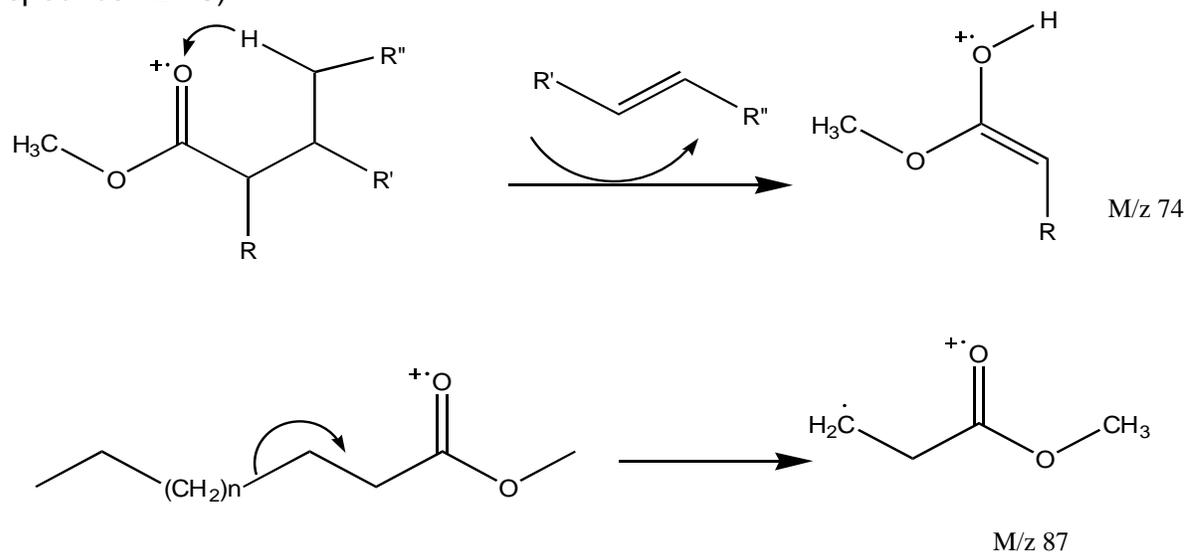
Cromatograma 2d: Perfil por cromatografia com fase gasosa do extrato hexânico de frutos de *P. emarginatus* (OSMT-1) na coluna capilar HP-1 (100% dimetilpolisiloxano-apolar)

V.6.2. *Attalea excelsa*

V.6.2.1. Perfil por CG/EM do extrato hexânico de brácteas de urucuri

A caracterização dos ésteres metílicos de cadeia linear do extrato hexânico das brácteas de urucuri foi realizado através da análise dos espectros de massa do extrato e das frações, (Espectros 7-11). A busca de íons resultantes de rota de fragmentação característica de ésteres metílicos de cadeia linear e de íons moleculares nos espectros de massa analisados, (Quadro 3, esquema 4), confirmado pela comparação dos espectros de massa da biblioteca com alto grau de coincidência de sinais (acima de 90%). Os cromatogramas obtidos para o extrato hexânico das brácteas de urucuri deram um perfil desse extrato, que é constituído basicamente de hidrocarbonetos lineares, ácidos graxos saturados e insaturados e esteróides, (Cromatogramas 2a-2c). Os espectros de massa comparados aos espectros da biblioteca do espectrômetro utilizado e a comparação com dados da literatura (NUNES, 1999) mostrou a presença de, hidrocarbonetos lineares, ésteres de ácidos graxos, (Quadro 3), e esteróides como

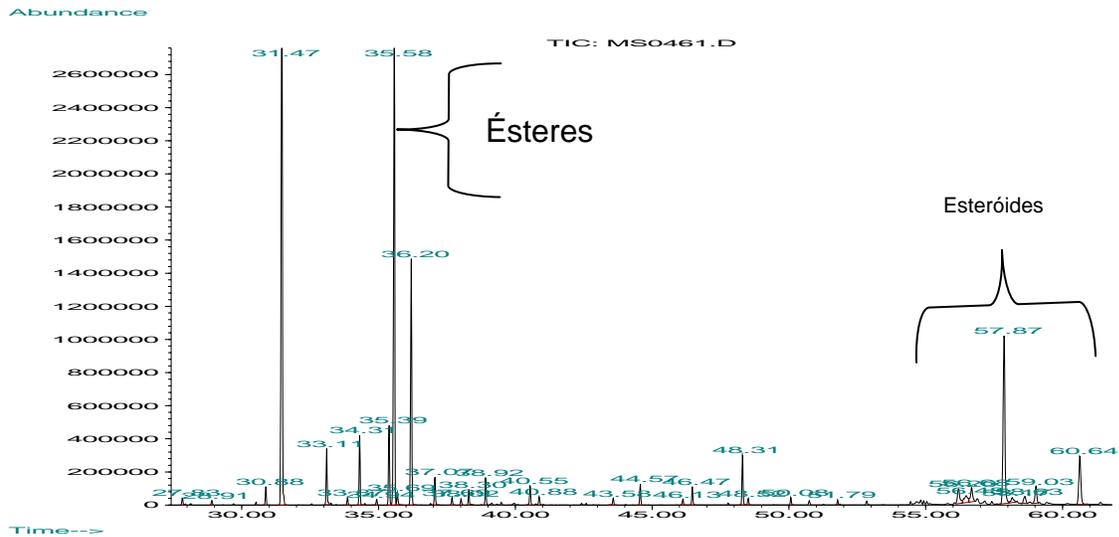
estigmasterol, campesterol, β -sitosterol, estigmastenona, (Cromatograma 2c, Espectros 12-15).



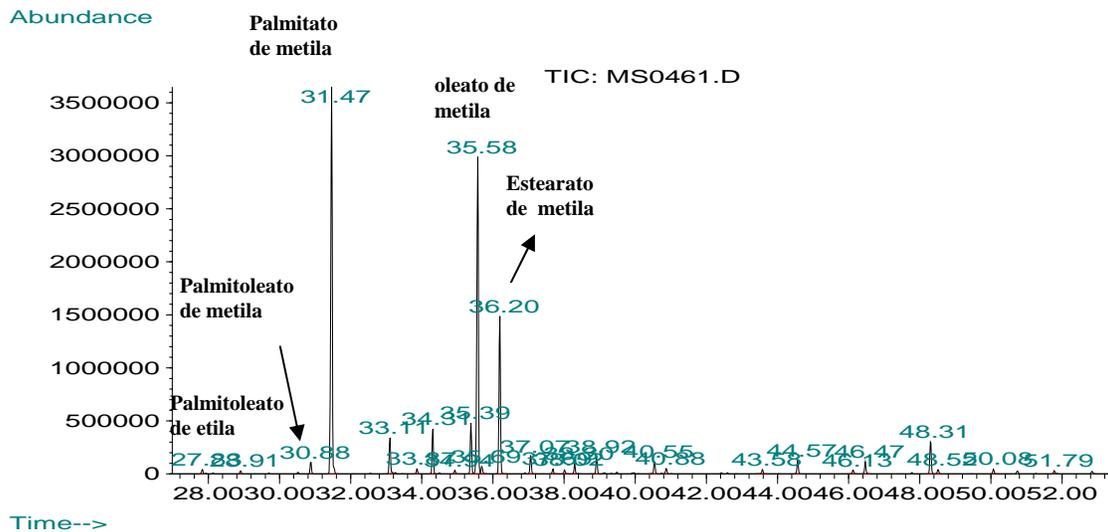
Esquema 4: rotas de fragmentações características de ésteres metílicos lineares

Quadro 3: Ésteres metílicos de cadeia linear, caracterizados por CGAR/EM, no extrato hexânico de brácteas de *Attalea excelsa* (EHBA).

M ⁺	Tempo de retenção (min)	Fórmula Molecular	Nome
268	30,88	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	Palmitoleato de metila
270	31,47	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	Palmitato de metila
280	34,31	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	Undecanoato de metila
284	33,10	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	Palmitato de etila
294	35,39	C ₁₉ H ₃₄ O ₂	Linoleato de metila
296	35,58	C ₁₉ H ₃₆ O ₂	Oleato de metila
298	36,20	C ₁₉ H ₃₈ O ₂	Estearato de metila
310	37,07	C ₂₀ H ₃₈ O ₂	Oleato de etila
326	40,55	C ₂₁ H ₄₂ O ₂	Eicosanoato de metila
354	44,57	C ₂₃ H ₄₆ O ₂	Docosanoato de metila
382	48,31	C ₂₅ H ₅₀ O ₂	Lignocerato de metila

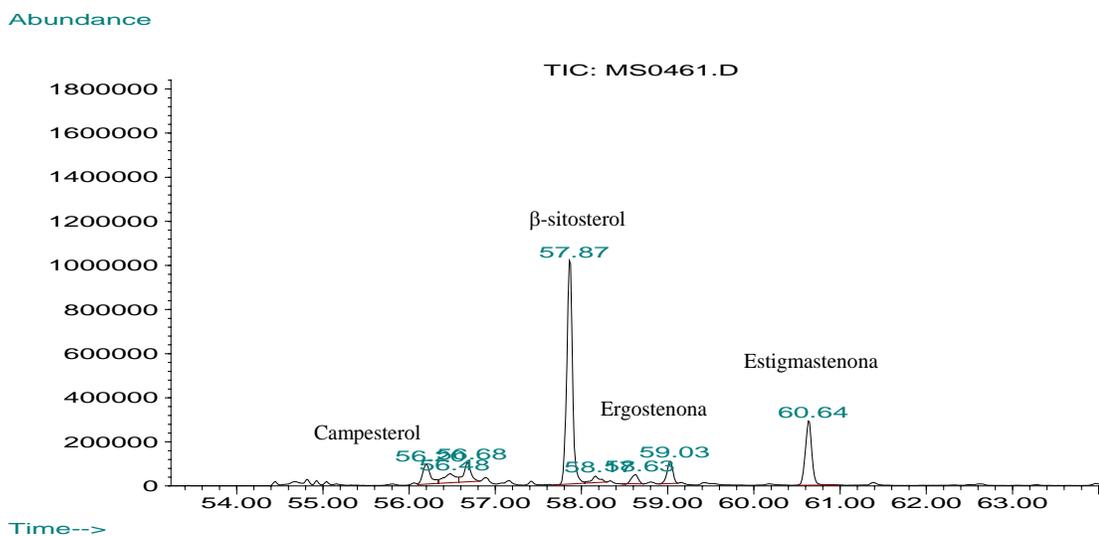


Cromatograma 3a: Perfil por cromatografia com fase gasosa do extrato hexânico de bráctea de *A. excelsa* (EHBA) em HP-5 (5% fenil metilpolisiloxano-apolar)



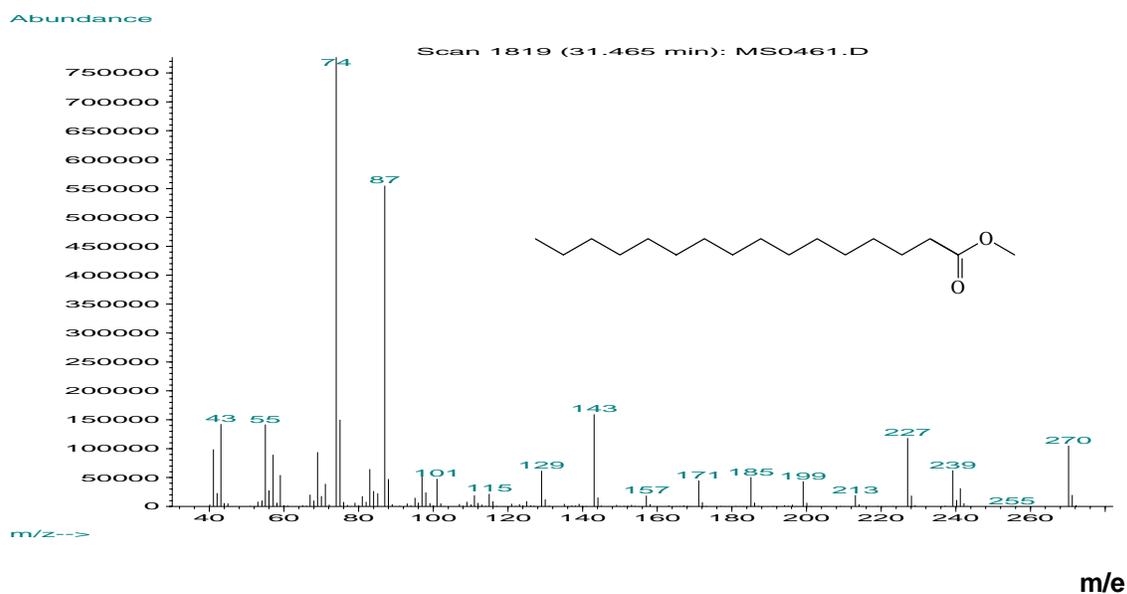
tR

Cromatograma 3b: Perfil por cromatografia com fase gasosa do extrato hexânico de bráctea de *A. excelsa* (EHBA), detalhe da região dos ésteres de ácidos graxos, em HP-5 (5% fenil metilpolisiloxano-apolar)

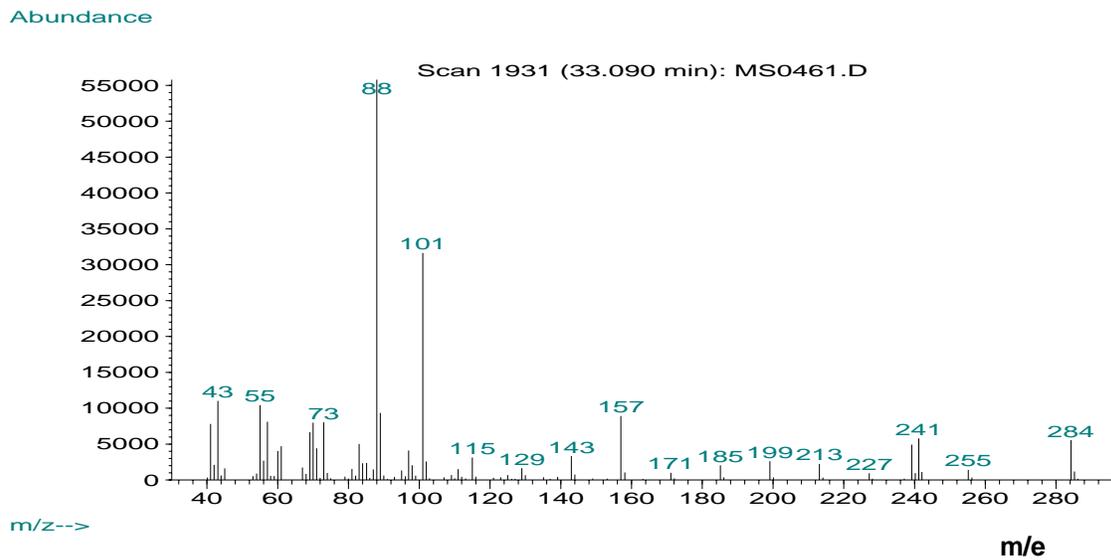


Cromatograma 3c: Perfil por cromatografia com fase gasosa do extrato hexânico de bráctea de *A. excelsa* (EHBA), detalhe da região dos esteróides, em HP-5 (5% fenil metilpolisiloxano-apolar)

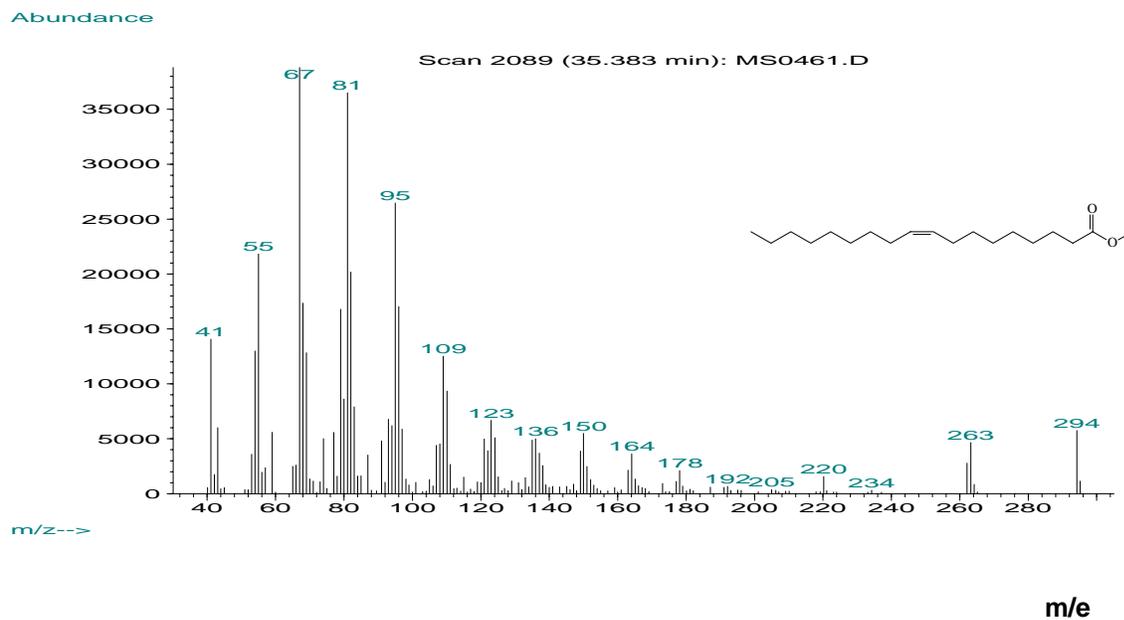
Ésteres de ácidos graxos



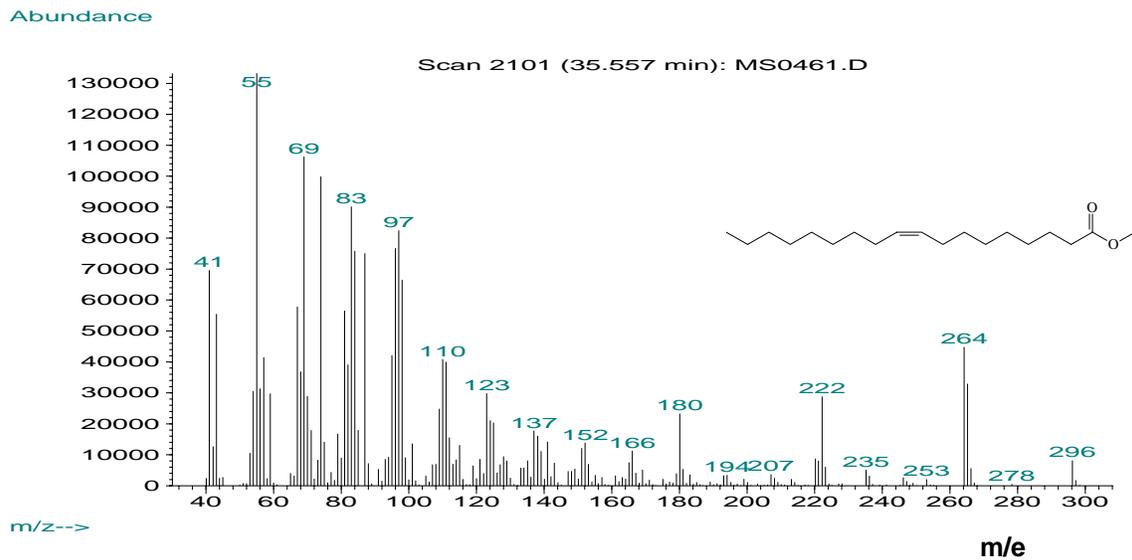
Espectro 6: Espectro de massas do palmitato de metila presente no extrato hexânico de brácteas de *A. excelsa* (EHBA)



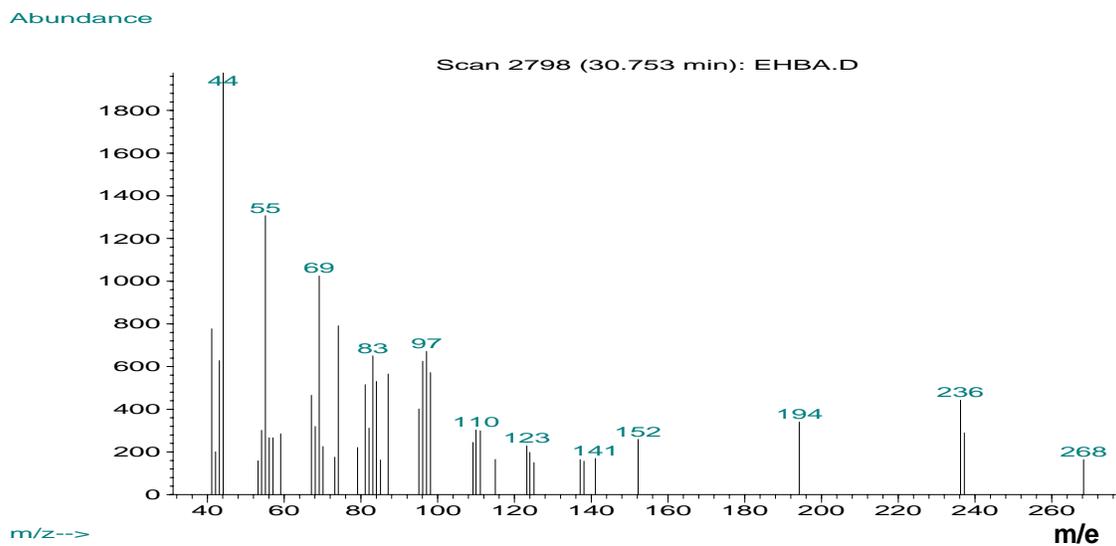
Espectro 7: Espectro de massas do palmitato de etila presente no extrato hexânico de brácteas de *A. excelsa* (EHBA)



Espectro 8: Espectro de massas do linoleato de metila presente no extrato hexânico de brácteas de *A. excelsa* (EHBA)

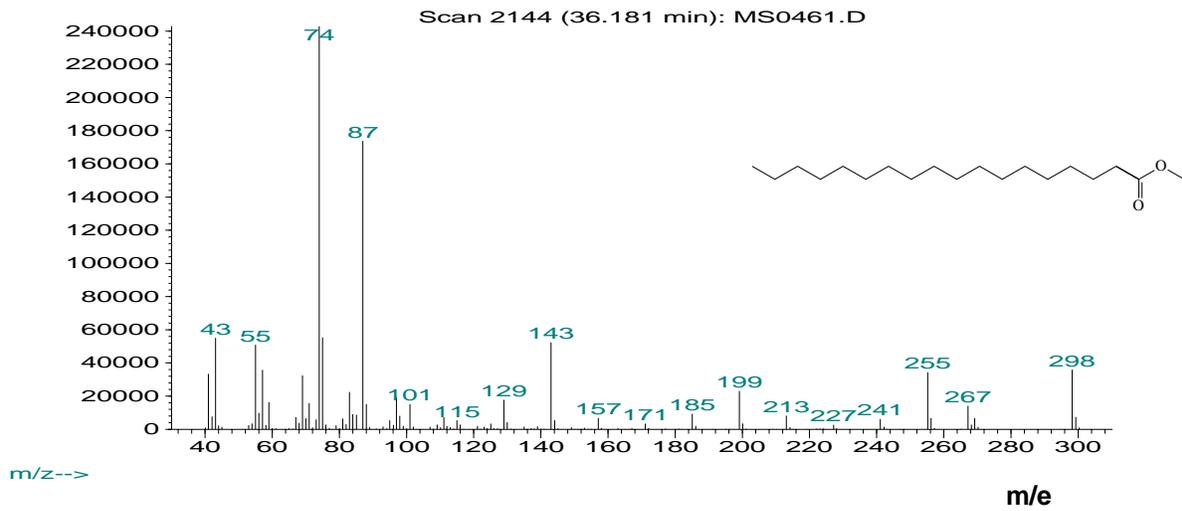


Espectro 9: Espectro de massas do oleato de metila presente no extrato hexânico de brácteas de *A. excelsa* (EHBA)



Espectro 10: Espectro de massas do palmitoleato de metila presente no extrato hexânico de brácteas de *A. excelsa* (EHBA)

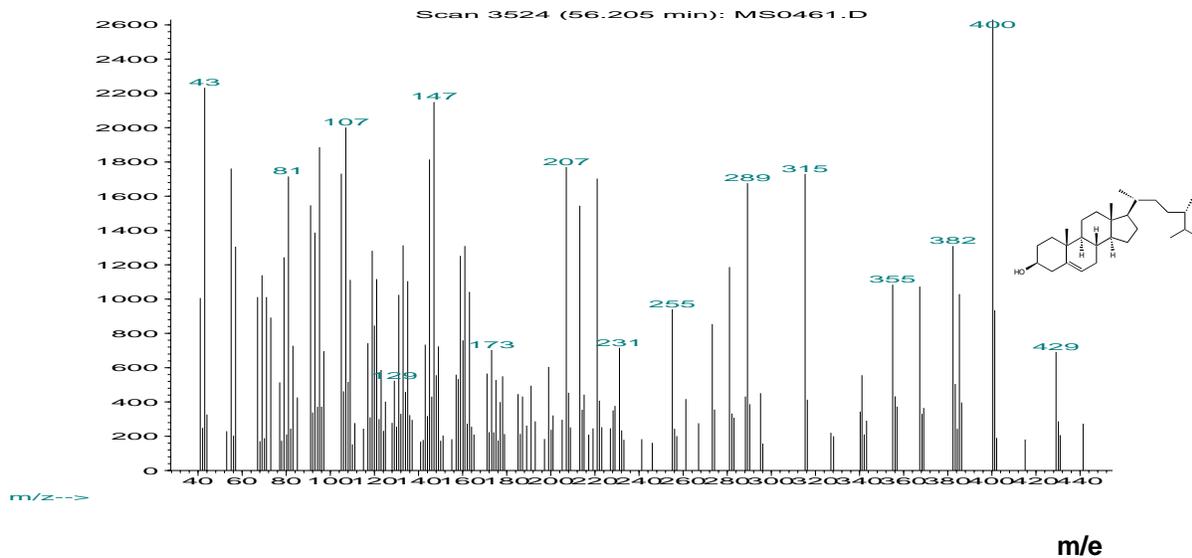
Abundance



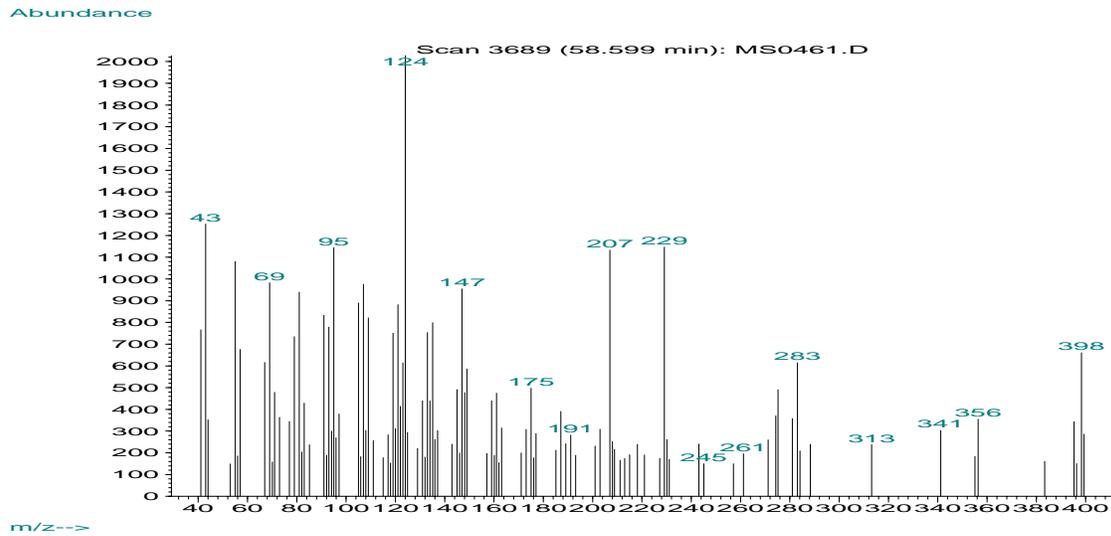
Espectro 11: Espectro de massas do estearato de metila presente no extrato hexânico de brácteas de *A. excelsa* (EHBA)

Esteróides

Abundance

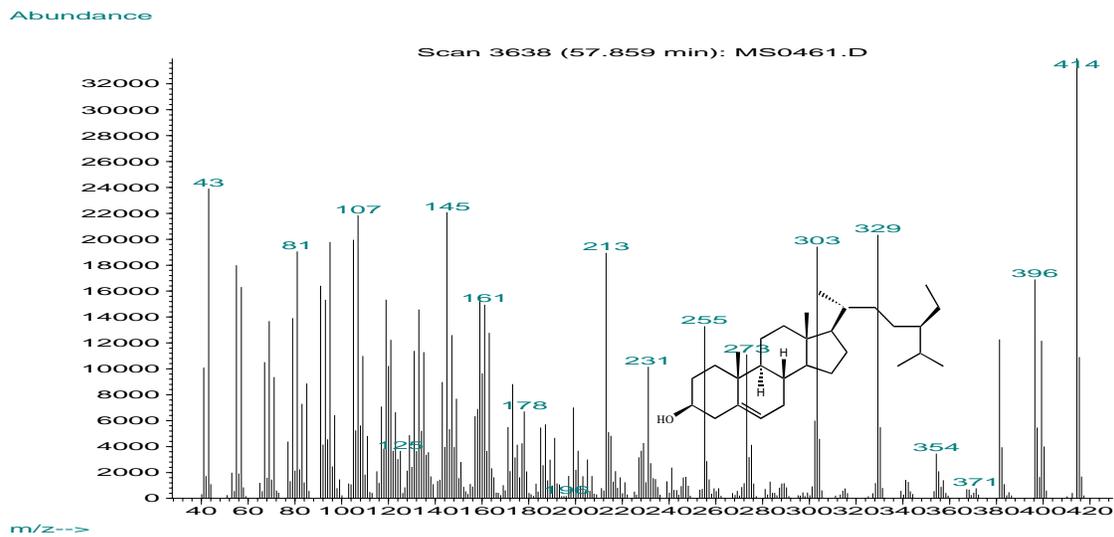


Espectro 12: Espectro de massas do campesterol presente no extrato hexânico de brácteas de *A. excelsa* (EHBA)



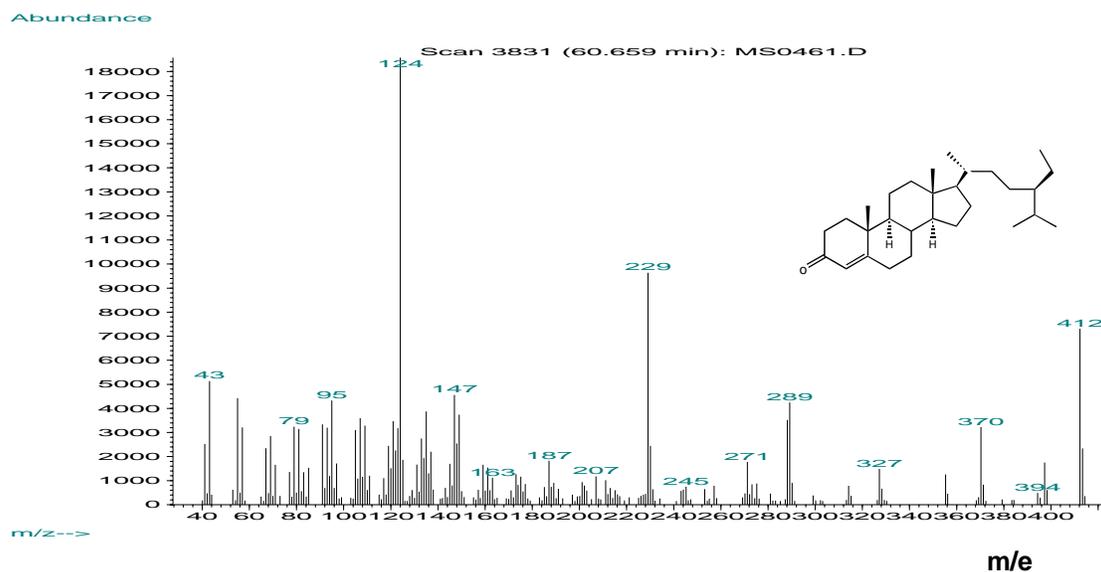
m/e

Espectro 13: Espectro de massas do ergost-4-en-3-ona presente no extrato hexânico de brácteas de *A. excelsa* (EHBA)



m/e

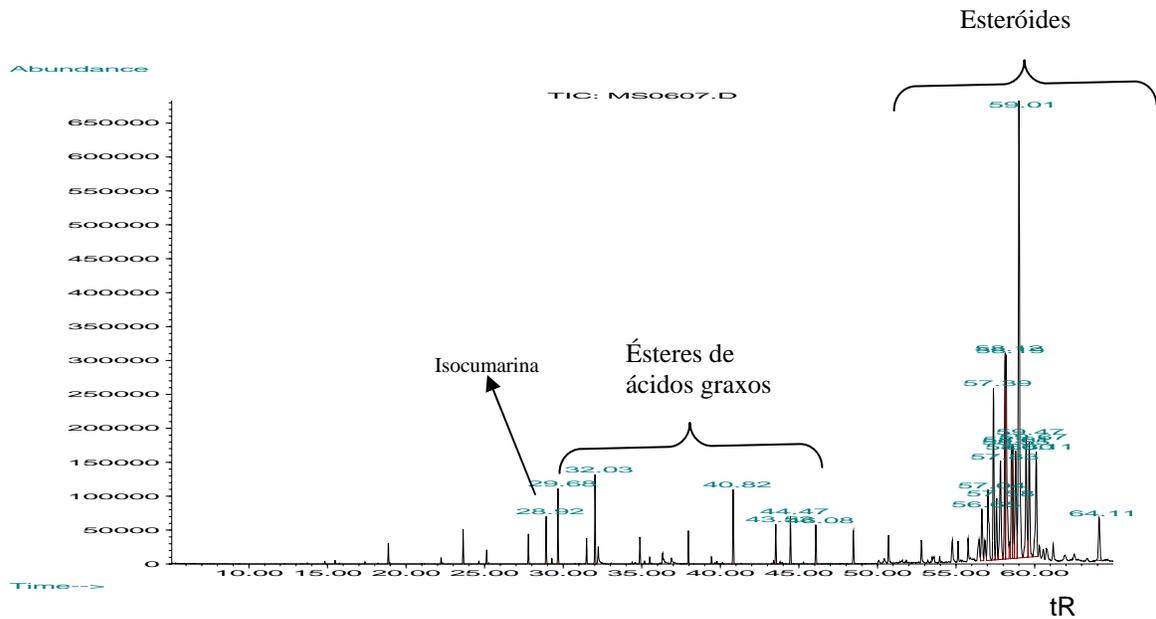
Espectro 14: Espectro de massas do β sitosterol presente no extrato hexânico de brácteas de *A. excelsa* (EHBA)



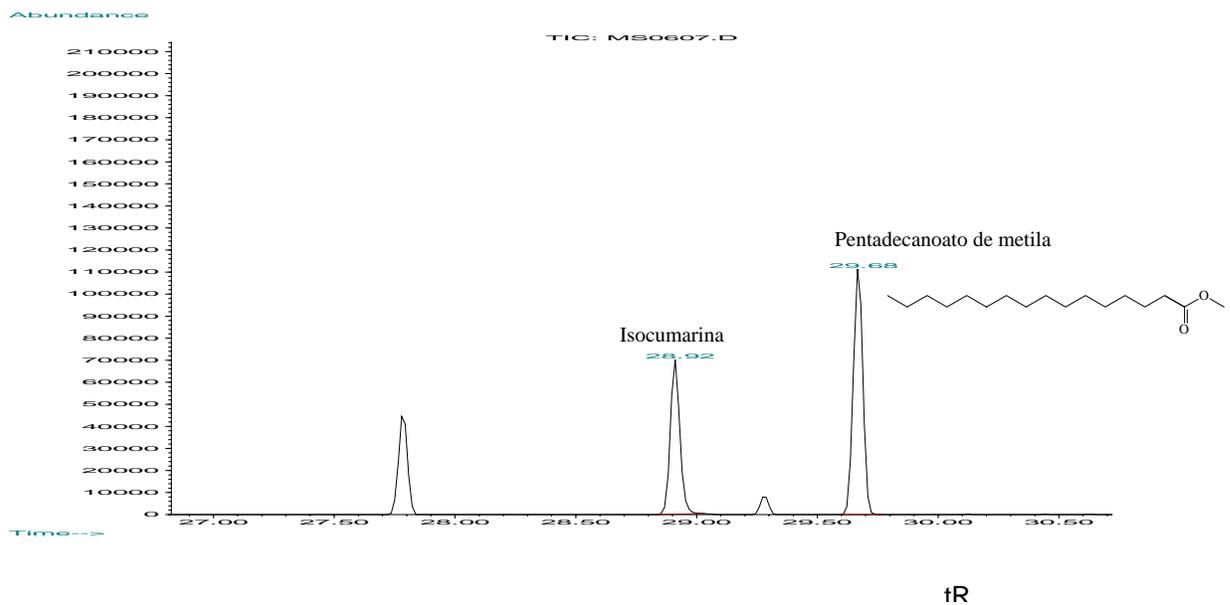
Espectro 15: Espectro de massas do estigmast-4-en-3-ona presente no extrato hexânico de brácteas de *A. excelsa* (EHBA)

V.6.2.2. Perfil por CG/EM da fração diclorometano (FD), obtida em coluna de sílica gel do extrato hexânico de brácteas de *A excelsa* (EHBA)

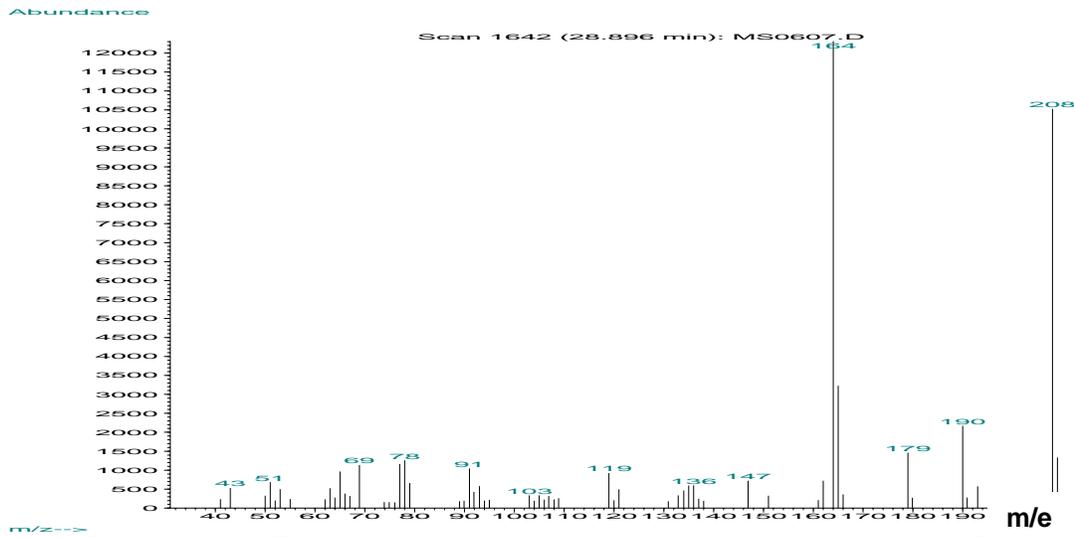
O extrato hexânico das brácteas (EHBA) fracionado em coluna cromatográfica originou sete frações das quais somente as diclorometano (FD) e diclorometano/acetato de etila (FD/AE), foram as mais ativas, (Gráfico 4), havia além de ácido palmítico, um ácido graxo predominante nesta espécie (48%), a presença de grande quantidade de esteróides, principalmente estigmastenona e de uma isocumarina que apareceu nas duas frações em pequena quantidade. O fato que somente as duas frações com esta isocumarina demonstraram repelência nos faz relacionar esta substância com a possível atividade repelente das frações.



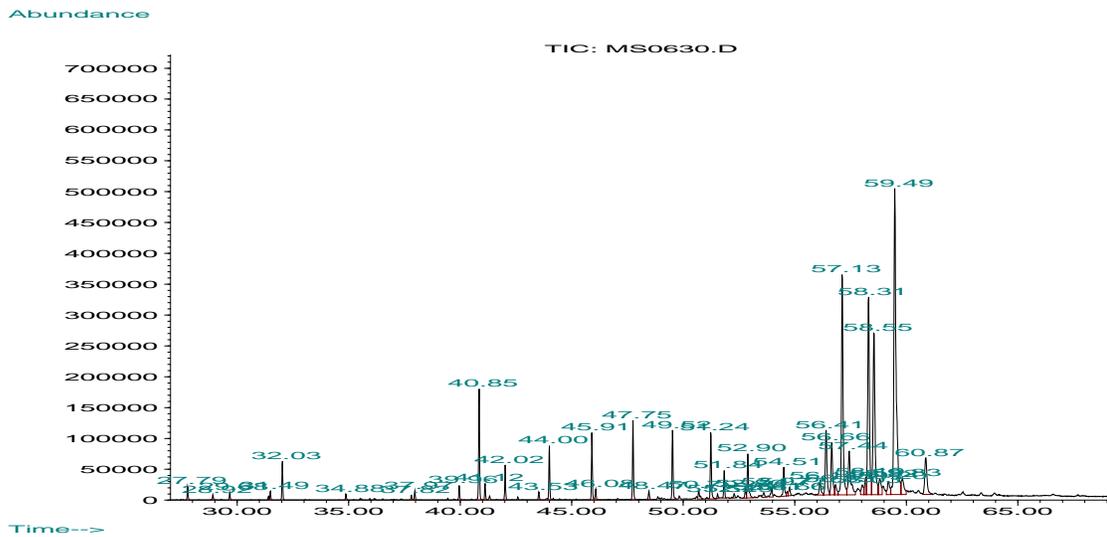
Cromatograma 4a: Perfil por cromatografia com fase gasosa da FD obtida da coluna em sílica gel do extrato hexânico de brácteas de *A. excelsa* (EHBA), em HP-5 (5% fenil metilpolisiloxano-apolar)



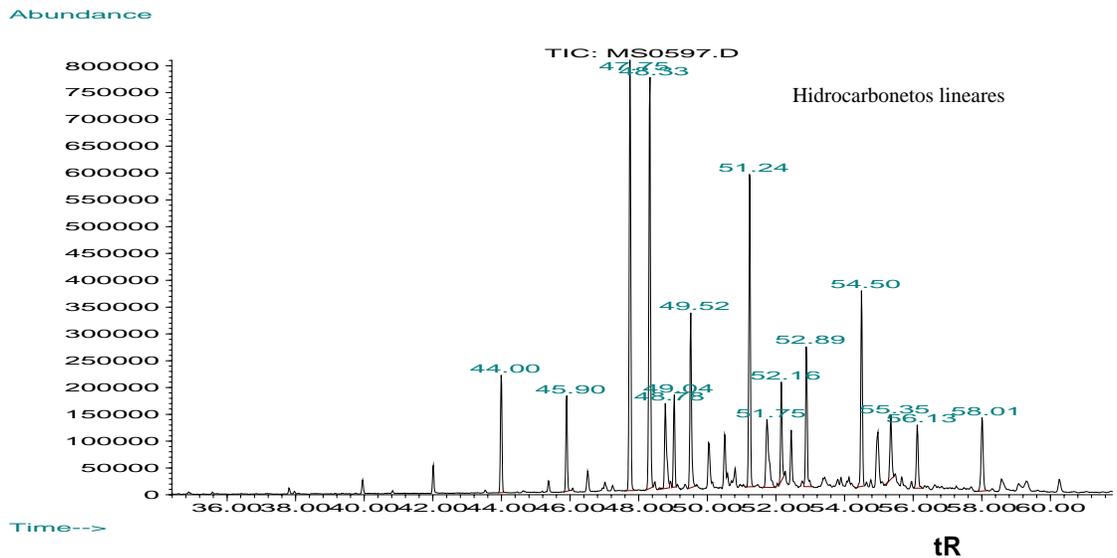
Cromatograma 4b: Perfil por cromatografia com fase gasosa da FD obtida da coluna em sílica gel do extrato hexânico de brácteas de *A. excelsa* (EHBA), detalhe da região da isocumarina



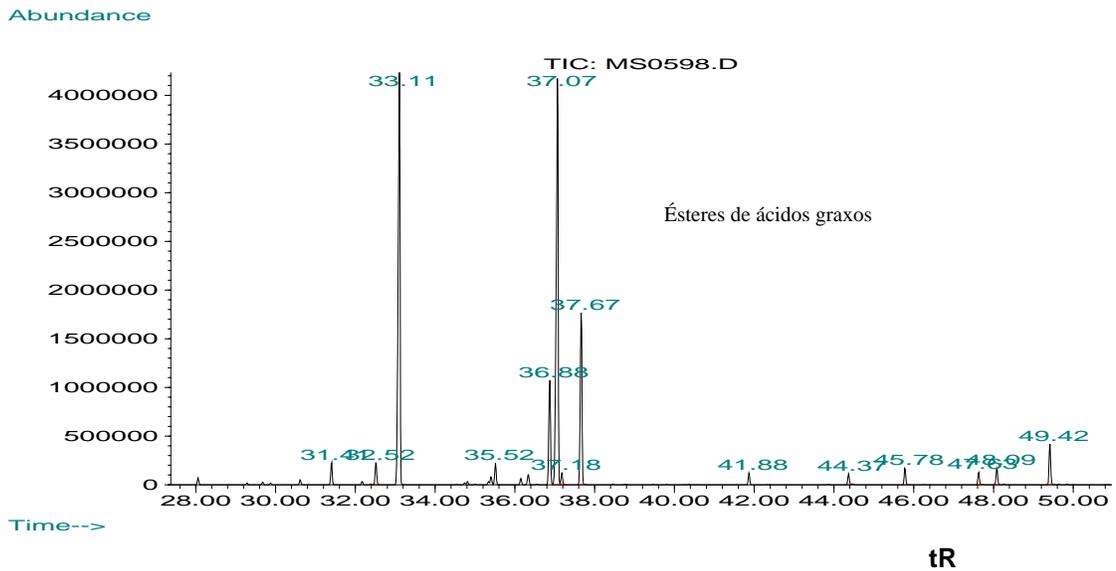
Espectro 16: Espectro de massas da isocumarina presente na FD obtida da coluna em sílica gel do extrato hexânico de bráctea de *A. excelsa* (EHBA)



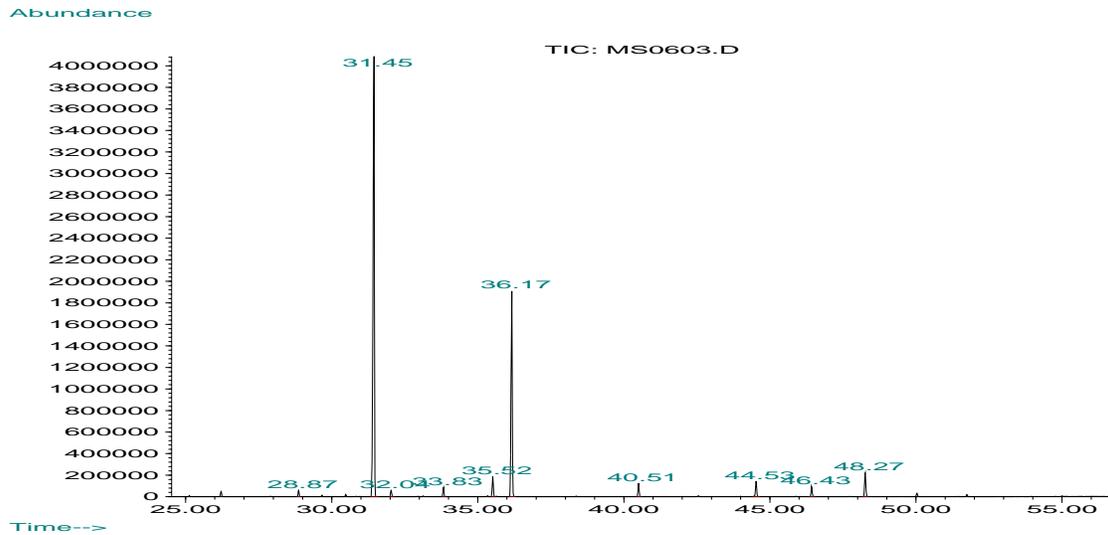
Cromatograma 4c: Perfil por cromatografia com fase gasosa da FD/AE o tR coluna em sílica gel do extrato hexânico de bráctea de *A. excelsa* (EHBA), em HP-5 (5% fenil metilpolisiloxano-apolar)



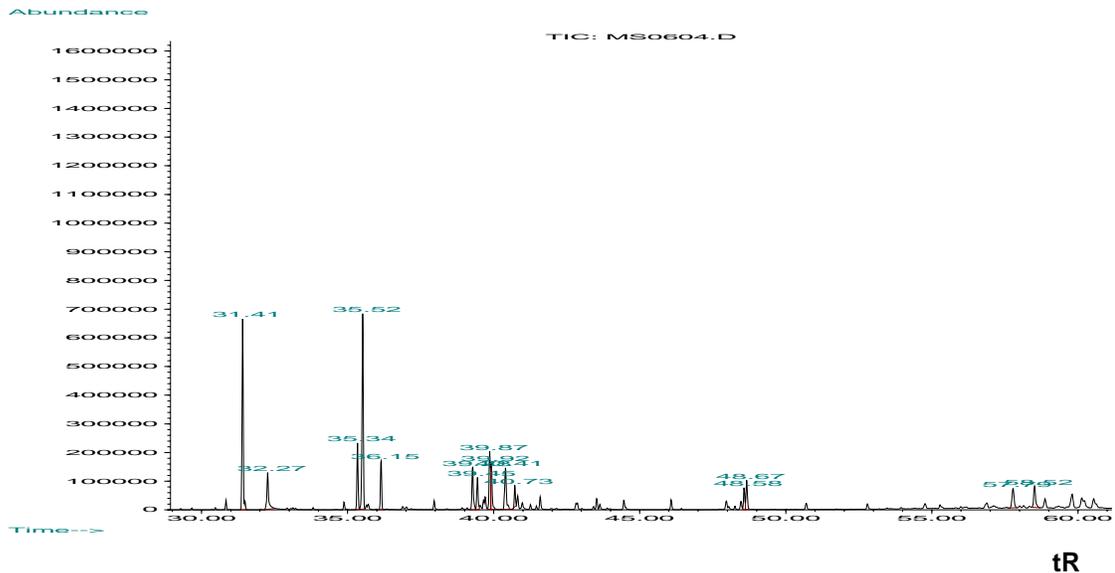
Cromatograma 5a: Perfil por cromatografia com fase gasosa da fração nexano (FH), obtida da coluna em sílica gel do extrato hexânico de bráctea de *A excelsa* (EHBA), em HP-5 (5% fenil metilpolisiloxano-apolar).



Cromatograma 5b: Perfil por cromatografia com fase gasosa da fração hexano/diclorometano (FH/D), obtida da coluna em sílica gel do extrato hexânico de bráctea de *A excelsa* (EHBA), em HP-5 (5% fenil metilpolisiloxano-apolar)



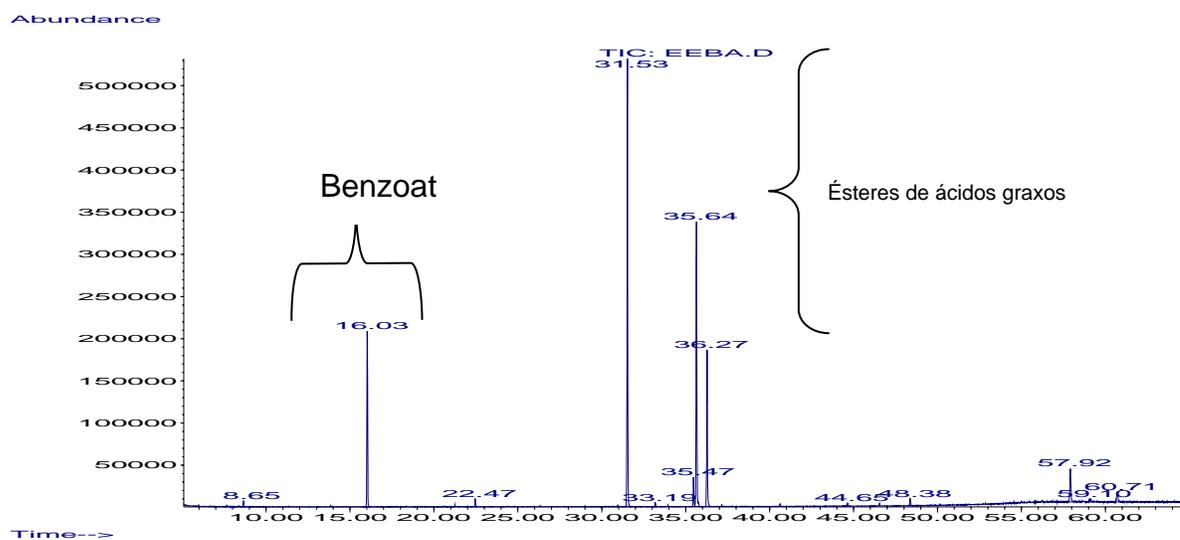
Cromatograma 5c: Perfil por cromatografia com fase gasosa da fração α tR etila (FAE), obtida da coluna em sílica gel do extrato hexânico de bráctea de *A excelsa* (EHBA), em HP-5 (5% fenil metilpolisiloxano-apolar)



Cromatograma 5d: Perfil por cromatografia com fase gasosa da fração acetato de etila/metanol (FAE/M), obtida da coluna em sílica gel do extrato hexânico de bráctea de *A excelsa* (EHBA), em HP-5 (5% fenil metilpolisiloxano-apolar)

V.6.2.3. Perfil por CG/EM do Extrato Etanólico de Brácteas de *A. excelsa* (EEBA)

O extrato etanólico de brácteas de *A. excelsa* foi analisado por CGAR/EM em coluna em HP-5 (5% fenil metilpolisiloxano-apolar). Por comparação com a biblioteca (Wiley 7n.l), observou-se uma região dos derivados do ácido benzóico (Tempo de retenção entre 16 e 22 min., outra dos ésteres de ácidos graxos entre 31 a 44 min. e uma pequena região com esteróides em 57 a 60 min., (cromatograma 5).

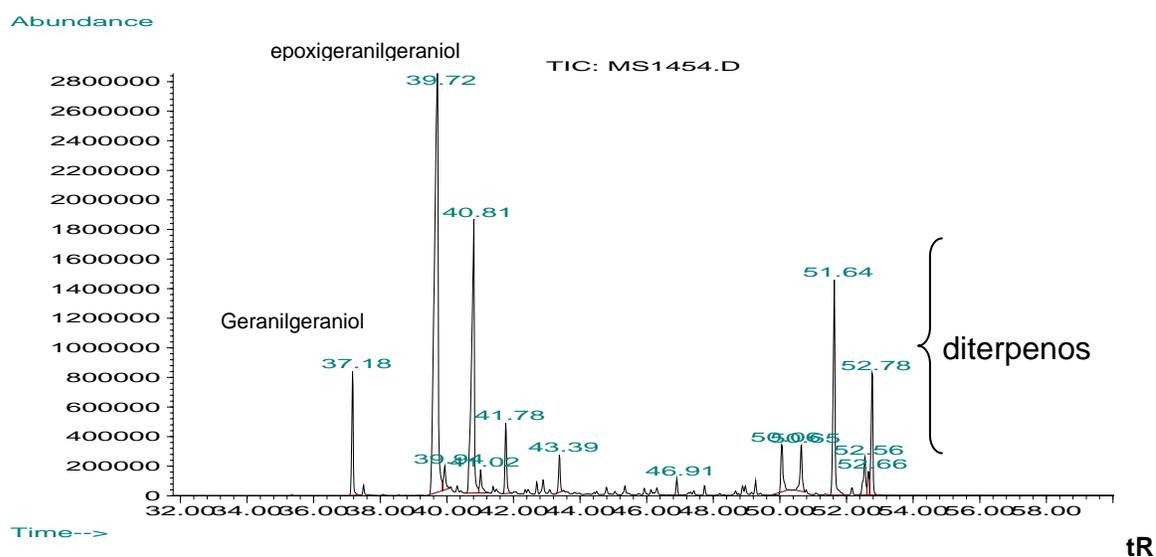


Cromatograma 6: Perfil por cromatografia com fase gasosa do extrato etanólico de brácteas de *A. excelsa* (EEBA), em HP-5 (5% fenil metilpolisiloxano-apolar)

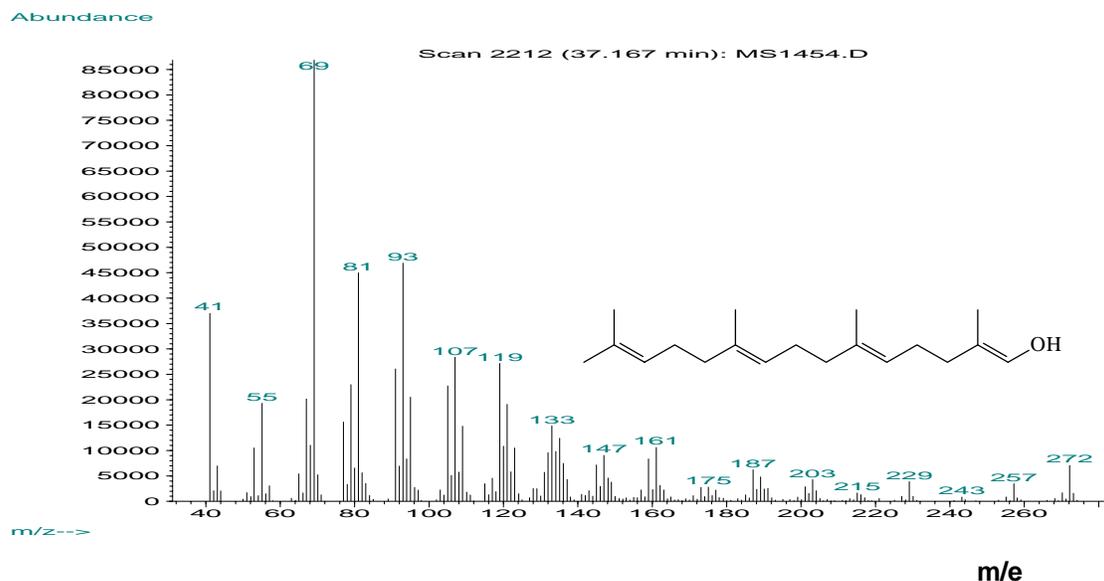
V.6.3. *Pterodon emarginatus*

Do extrato hexânico dos frutos de sucupira baranca (OSMT-1), utilizando cromatografia com fase gasosa de alta resolução acoplada à espectrometria de massa foram caracterizados ácidos graxos em pequena quantidade, sesquiterpenos (cariofileno, cariofileno, mirceno, pineno) e diterpenos tricíclicos furânicos (Cromatograma 8, espectros 18-20), que estão em maior quantidade no extrato OSMT-1, (Cromatograma 7).

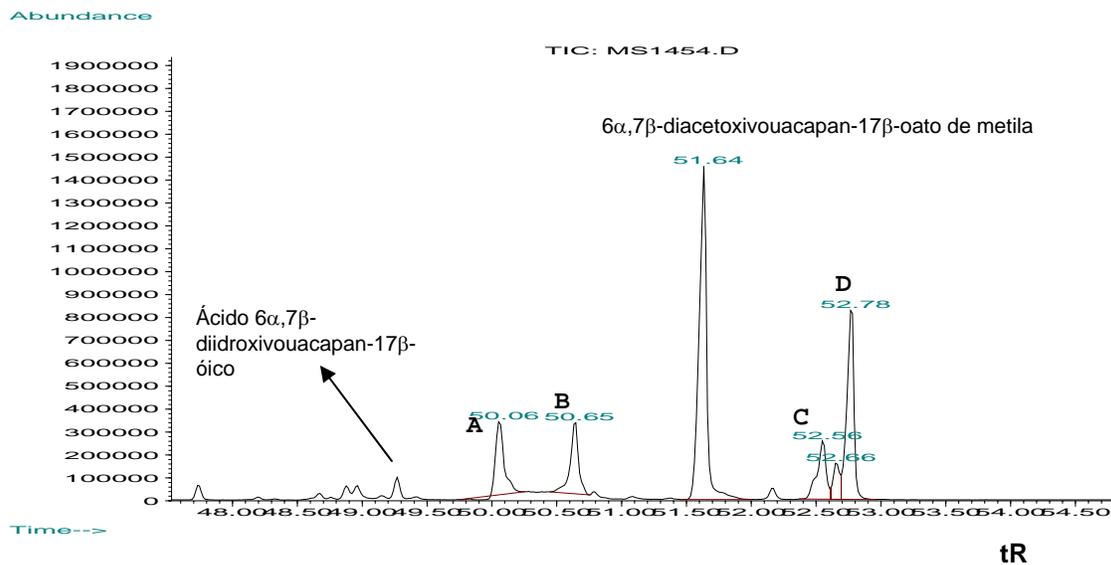
V.6.3.1. Perfil por CG/EM do extrato hexânico de frutos de *P. emarginatus* (OSMT-1)



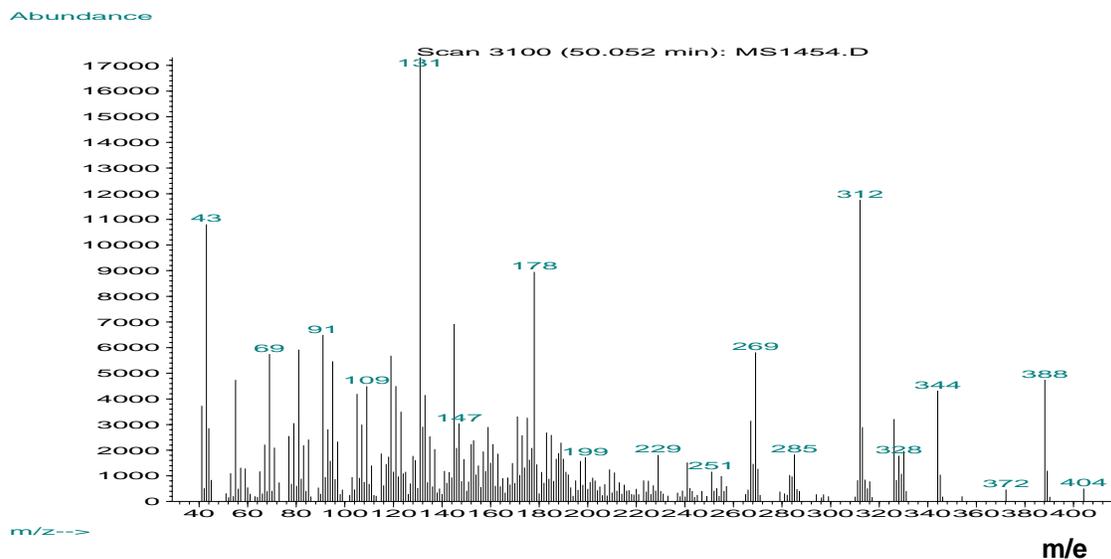
Cromatograma 7: Perfil por cromatografia com fase gasosa do extrato hexânico de frutos de *P. emarginatus* (OSMT-1)



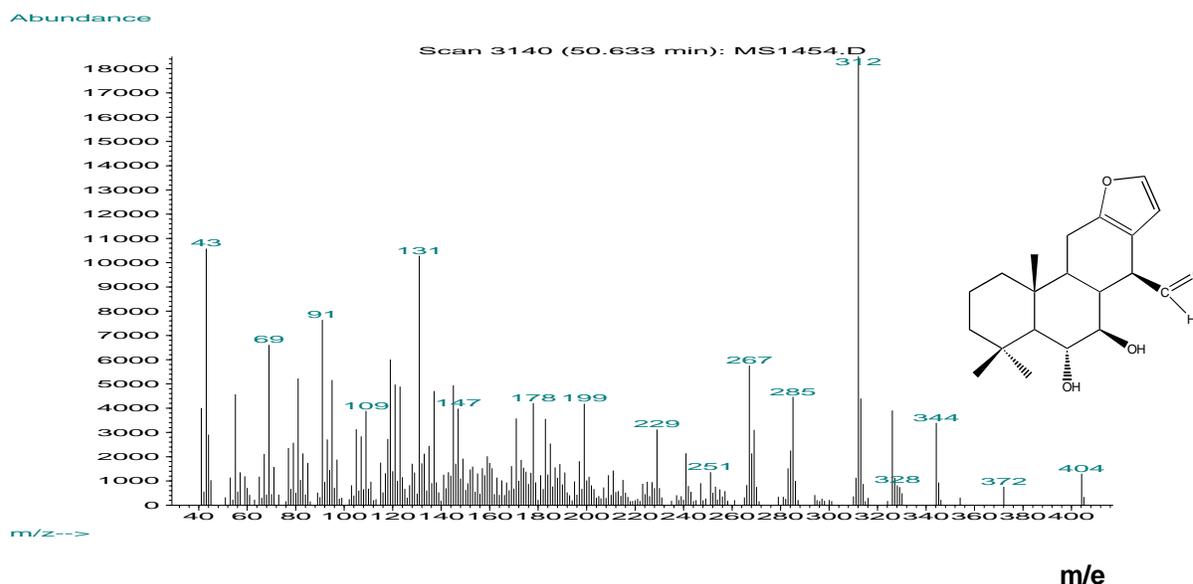
Espectro 17: Espectro de massas do diterpeno geranylgeraniol, extrato hexânico de frutos de *P. emarginatus* (OSMT-1).



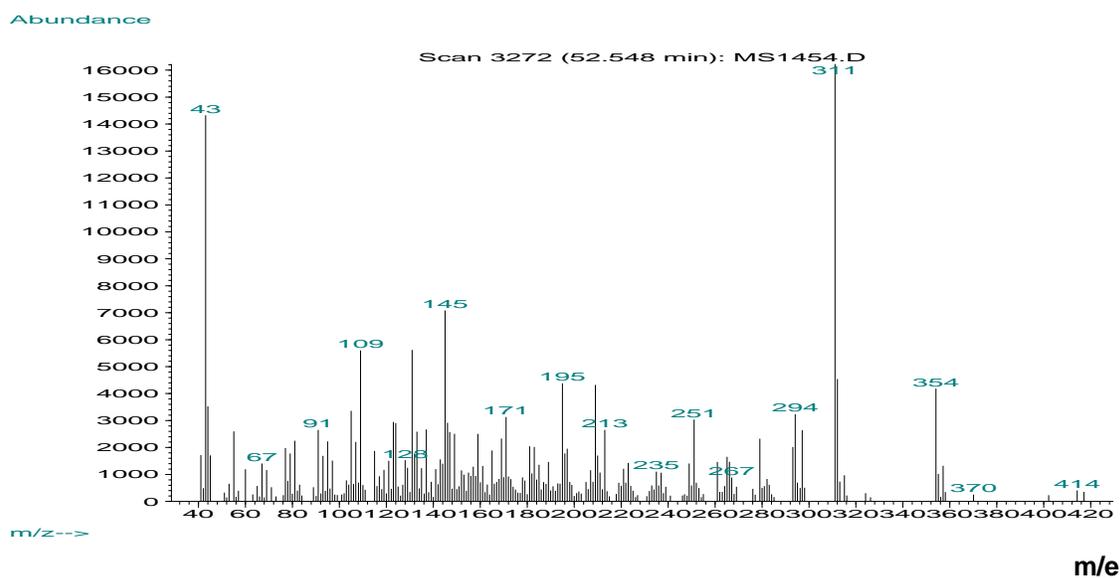
Cromatograma 8: Perfil por cromatografia com fase gasosa do extrato hexânico de frutos de *P. emarginatus* (OSMT-1), detalhe da região dos diterpenos furânicos



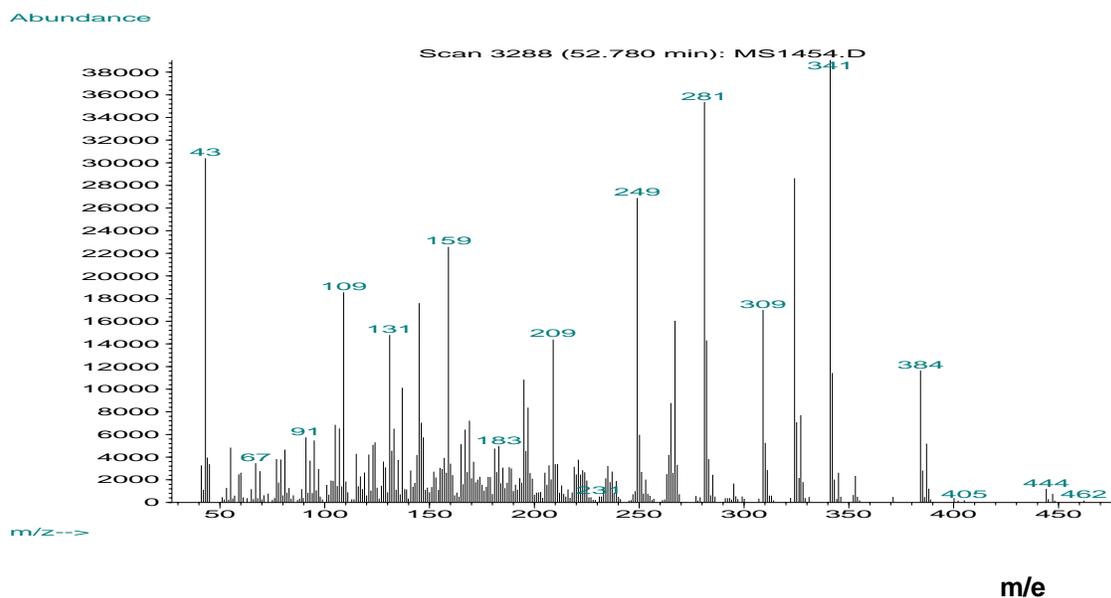
Espectro 18: Espectro de massas do diterpeno 6 α -hidroxi-7 β -acetoxivouacapan-17 β -oato de metila (A), com $T_r = 50,06$ presente no do extrato hexânico de frutos de *P. emarginatus* (OSMT-1)



Espectro 19: Espectro de massas do diterpeno 6 α ,7 β -diacetoxivouacapan-14 β -al, com $T_r = 50,65$ (B), presente no do extrato hexânico de frutos de *P. emarginatus* (OSMT-1)



Espectro 20: Espectro de massas do diterpeno (C), com $T_r = 52,55$ presente no do extrato hexânico de frutos de *P. emarginatus* (OSMT-1)



Espectro 21: Espectro de massas do diterpeno $6\alpha,7\beta$ -diacetoxi- 17β -hidroxivinhaticoato de metila (D), com $T_r = 52,78$ presente no do extrato hexânico de frutos de *P. emarginatus* (OSMT-1)

VI. CONCLUSÕES

Foi verificado que a atividade repelente de mosquitos hematófagos (*Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*), das duas espécies tratadas neste trabalho, está diretamente relacionada com a presença de substâncias apolares no extrato hexânico de brácteas de *Attalea excelsa*.

Através dos testes biológicos realizados com os extratos etanólicos de brácteas de *Attalea excelsa* podemos verificar que quando a parte graxa era retirada a atividade diminuía sensivelmente. Possivelmente os ácidos graxos por terem cadeia longa se complexem com as substâncias ativas fazendo com estas fiquem mais tempo disponíveis sobre a pele do voluntário. O extrato hexânico de brácteas de *Attalea excelsa* possui mais de 90 % de ácidos graxos, uma pequena percentagem de esteróides, ambas classes químicas não demonstram repelência em nosso modelo, outras substâncias estão presentes em menor concentração. A atividade repelente deste extrato é impressionante, pois na menor concentração testada de 0,5 mg/cm² obtivemos a inibição da alimentação de fêmeas de *Aedes aegypti* por 8 horas, enquanto extrato etanólico (EEBA) só apresentou atividade repelente equivalente em uma dose 4 vezes maior (2 mg/cm²).

Quando o extrato hexânico das brácteas de *A. excelsa* (EHBA) foi fracionado em coluna cromatográfica, verificou-se que nas frações diclorometano (FD) e diclorometano/acetato de etila (FD/AE), eram as mais ativas, havia além de ácido palmítico (48%), a presença de grande quantidade de esteróides, principalmente estigmastenona e em pequena quantidade uma isocumarina que apareceu nas duas frações. O fato que somente estas duas frações demonstraram repelência nos faz relacionar esta isocumarina com a possível atividade repelente das frações.

A presença de esteróides nas plantas possivelmente atue na proteção ao ataque de insetos, talvez como adjuvantes da isocumarina porque as brácteas são órgãos de proteção da inflorescência.

O ácido palmítico apesar de estar em grande quantidade no EHBA e nas frações, não atua diretamente na atividade repelente, pois nas quatro doses testadas ele não apresentou nenhuma atividade repelente frente a fêmeas de *Aedes aegypti*

O extrato apolar dos frutos de *Pterodon emarginatus*, OSMT-1 apresentou o melhor resultado, repelindo os mosquitos por um período de 8 horas na menor dose testada, 0,5 mg/cm², Já o extrato etanólico (EESMT-1) foi ativo por 8 horas em uma dose quatro vezes

maior ($2\text{mg}/\text{cm}^2$), mostrando que a atividade repelente da sucupira está na sua parte apolar assim como o urucuri.

O diterpeno $6\alpha,7\beta$ -diacetoxivouacapan- 17β -oato de metila, um componente isolado do óleo, não apresentou atividade repelente nas duas doses testadas ($0,5$ e $1\text{mg}/\text{cm}^2$) frente a fêmeas de *Aedes aegypti*, sugerindo que este e os demais diterpenos tricíclicos furânicos semelhantes, não são ativos, apesar de estarem em grande quantidade no óleo. Eles podem fixar as substâncias que realmente inibem a alimentação dos mosquitos.

Das duas plantas trabalhadas o óleo dos frutos de sucupira branca apresentou um maior potencial como matéria prima para futuras formulações de produtos repelentes em larga escala, pois além de um excelente rendimento, apresentou uma grande atividade repelente frente aos mosquitos testados, numa dose comparável ao repelente sintético DEET, Tabela 10. Além disso, o aroma floral agradável do óleo, devido à presença de geranilgeraniol, torna atrativo ao usuário as loções e cremes formulados. Em resumo ele é um promissor repelente natural que irá concorrer com os sintéticos do mercado.

O urucuri apesar de ter ótima atividade repelente de mosquitos, possui baixo rendimento, que reduz a viabilidade desta planta como matéria prima para uso em larga escala, pois seriam necessárias toneladas das brácteas do urucuri para obter alguns gramas do extrato, o que certamente iria encarecer o produto final, contrariando o objetivo deste projeto que visa produtos acessíveis e baratos para uso em saúde pública. No outro lado a isocumarina isolada representa um modelo valioso para novos repelentes sintéticos.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADAMS, R. P. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy. Allured Publishing Corporation. Carol Stream, Illinois USA, 1995.
2. AHMED, S.GRAING, M.; HYLIN, J. W.; MITCHEL, W.C. AND LITSINGER, J. A. Natural Pesticides from the Neem Tree and other Tropical Plants, Ed.H.Schmutterer, GTZ, Eschborn, 1984, p. 565-580.
3. ARRIAGA, A. M. C.; DE CASTRO, M. A. B.; SILVEIRA, E. R. AND BRAZ-FILHO R. Further Diterpenoids Isolated from *Pterodon polygalaeflorus*. **J Braz. Chem. Soc.** V. 11, n. 2, p. 187-190, 2000.
4. BALANDRIN, M. F.; KLOCKE, J. A.; WURTELE, E. S.; BOLLINGER, W. H., **Science**, v. 228, p.115, 1985.
5. BARBOSA RODRIGUES, J. Sertum palmarum Brasiliensium, Imp. Typ.Veuve Monnom, 1903.
6. BARROSO, G. M. Sistemática de Angiospermas do Brasil, São Paulo, EDUSP, 1978, v. 1, 245 p.
7. BARROSO, G. M. Sistemática de Angiospermas do Brasil, Editora UFV, 1991, v. 2, 377 p.
8. BELL A. E.; FELLOWS, L. E.; SIMMONDS, S.J. Natural Products from Plants for the Control of Insect Pests, Ed. Marcel Dekker, U.S., 1990
9. BRÁZ FILHO, R.; GOTTLIEB, O.R.; ASSUMPÇÃO, R. M. V. Chemistry of Brazilian Leguminosae. XXXIV Isoflavones of *Pterodon pubescens*. **Phytochemistry**, São Paulo (Brazil), v.10, n. 11, p. 2835-2836. 1971.

10. BRUNETON, J. Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia, Editorial Acribia, S. A. Zaragoza, España, 1991 p. 432-433.
11. BRUNNER, G. Gas Extraction: Na Introduction to Fundamental of Supercritical Fluids and Applications to Separations Processes. 1ª Ed., Steinkopf Darmstadt, New York, 1994, Springer, v. 4, p. 387.
12. BUCHILLET, D. Medicinas Tradicionais e Medicina Ocidental na Amazônia. Edição CEJUP. Belém, 1991, 504 p.
13. CAMPOS A. M.; SILVEIRA, E. R., BRAZ-FILHO, R. AND TEIXEIRA, T. C. Diterpenoids from *Pterodon polygalaeflorus*. **Phytochemistry** v.36, n.2, p. 403-406, 1994.
14. CARVALHO J. C. T Validação Química-Farmacológica da Espécie Vegetal *Pterodon emarginatus* Vog. (Atividade Antiinflamatória), Tese de Doutorado, USP, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo, 1998, p.60-61
15. CLARK, E. P. Quassin and Neoquassin **J. Amer. Chem. Soc.**v.59, p. 2511-2514, 1937.
16. COELHO, M. C. F.; PINTO, J. E. B. P.; MORAIS, A. R.; CID, L. P. B. AND LAMEIRA, O. A. Germinação de Sementes de Sucupira –Branca (*Pterodon pubescens* (Benth.)Benth.) “in vitro” e “ex vitro”. **Ciênc. Agrotec.**, v. 25, n. 1, p. 38-48, 2001
17. CONSOLI, R. A. G.B. E OLIVEIRA, R.L. Principais Mosquitos de Importância Sanitária no Brasil, Editora Fiocruz 1994.
18. CORBETT, C. E. Plantas Ictiotóxicas FM/USP, 1940
19. COSTA, N. A.; NASCIMENTO, C.N.B. et al, EMBRAPA-CPATU, 1986.
20. CROSBY, D. G., In Natural Pest Control Agents, American Chemical Society, Washington, D. C., 1966, p.1-16.

21. DALES M. J., A Review of Plant Material Used for Controlling Insect Pests, NRI Bulletin 65, U. K., Natural Resources Institute, Chatham 1996.
22. DALGREN, R. M. T. A Revised System of Classification of the Angiosperms. **Bot. J. Linn. Soc.** v. 80, p.91-124, 1980.
23. DE PAULA, V. F.; BARBOSA, L. C. A; DE MUNER, A J.; VELOSO, D. P. AND PICANÇO, M. C. Synthesis and Insecticidal Activity of New Amide Derivatives of Piperine. **Pest Manag Sci**, v.56, p. 168-174, 2000.
24. DE LEÃO, R. N. Q. Doenças Infecciosas e Parasitárias: Enfoque Amazônico, Instituto Evandro Chagas, Edição CEJUP, Belém, Pará, 1997 p.227.
25. DOP, P. AND GAUTIÉ, A. Manuel de Technique Botanique, Histologie et Microbie Vegetales, J. Lamarre ed, Paris, 1928, p. 593.
26. DOS SANTOS FILHO, D.; VICHNEWSKI, W.; BAKER, P. M. ; GILBERT, B. Prophylaxis of Schistosomiaris. Diterpenes from *Pterodon pubescens*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Brazil, v. 44, p. 51-53, 1972.
27. DRANSFIELD, J. and UHL, N.W. Outline of a Classification of Palms. **Principes**, v. 30, n. 1, p. 3-11, 1986.
28. EVANS, D.A. and RAJ, R.K. Larvicidal Efficacy of Quassin Against *Culex quinquefasciatus*. **Indian. J. Med. Res.**, v. 93, p.324-327, 1991.
29. FASCIO, M.; GILBERT, B.; MORS, W. B.; NISHIDA, T. Two New Diterpenes from *Pterodon pubescens*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 42, p. 97-101, 1970.
30. FASCIO, M.; MORS, W. B.; GILBERT, B.; MAHAJAN, M. B.; MONTEIRO M. B.; DOS SANTOS FILHO, D.; VICHNEWSKI, W. Diterpenoid Furans from *Pterodon* species. **Phytochemistry**, v. 15, p. 201-203, 1976.

31. FONTAINE, R. E. Progress in Mosquito Control. **Californ. Agricultura**, v. 34, p. 4-5, 1980.
32. FERREIRA, V. L. P. E YOKOMIZO, Y. Possible Use of Heart of the *Euterpe* Palm as a Human Food. **Colet. Inst. Tecnol. Aliment.** v.9, p. 27-41, 1978.
33. GALIRA, E.; GOTTLIEB, O. R. Chemistry of Brazilian Leguminosae. XLVI Isoflavones from *Pterodon appariciori*. **Phytochemistry**, Brazil, v. 13 n.11 p. 2593-2595, 1974.
34. GLASSMAN, S. F Flavonoids as Taxonomic Markers in Some Cocosoid Palms. **Pl. Syst. Evol.** v. 142, p.157-169, 1993.
35. GODFREY, C. R. A.; Agrochemicals from Natural Products, New York, ed. Dekker, 1995.
36. HARBONE, J. B., ROBERTSON, J. and HOLLOWAY, P.J. Chemotaxonomic Studies in Selected Cocosoid Palms. **Principes**, v. 25, p. 54-62, 1981.
37. HEIM DE BALSAC, F., HEIM DE BALSAC, H. and MAHEU, J. **Oil-bearing Palms of Guiana**. Bull. Agence Gén. Colonies. v. 24, p. 260-274, 1931.
38. HENG, Y. H. Division of Control of Tropical Diseases (CTD), School of Biological Sciences, Universiti Sains Malaysia, Penang, Malaysia, 1996.
39. HERDENSON, A., GALEANO, G. and BERNAL, R. Field Guide to the Palms of the Americas. Princeton Univ. Press, New Jersey, 1995.
40. HENG, Y. H. Review of the Evaluation Methods and Criteria for Repellents and other Personal Protection Devices, Vector Control Research Unit., School of Biological Sciences, Universiti Sains Malaysia, WHO Geneva, October 1996.
41. HOEHNE, F. C. Plantas e Substâncias Vegetais Tóxicas e Mediciniais, Departamento de Botânica do Estado de São Paulo, p.155-159, 1978.

42. JOLY, A. B. Introdução à Taxonomia Vegetal. 3^o Edição. Companhia Editora Nacional. São Paulo, 1976.
43. LEITE DE ALMEIDA, M. E.; GOTTLIEB, O. R. The Chemistry of Brazilian Leguminosae. Further Isoflavones from *Pterodon apparicioi*. **Phytochemistry**, v.14, n. 12, p. 2716, 1975.
44. LIMA, R. R. B. Ministério da Agricultura, v. 35, n. 7/12, p. 14-29, 1947.
45. LORENZI, H.; DE SOUZA, H. M.; MEDEIROS-COSTA J. T.; CERQUEIRA, L. S. C. E BEHR, N. V. Palmeiras no Brasil Nativas e Exóticas. Editora Plantarum Ltda Nova Odessa, São Paulo, 1996, 303 pp.
46. LUBRANO, C. and ROBIN, J. R. Major Compounds Study in Fruit Pulp Oils of Six Guiana Palm Species **Acta Botanica Gallica**, v. 144, n.4, p. 495-499, 1997.
47. LUBRANO, C.; ROBIN, J. R. and KHAIA, T. A. Fatty-acid, Sterol and Tocopherol Composition of Oil from the Fruit Mesocarp of Six Palm Species in French-Guiana. **Oleagineux**, v.49, p.59-65, 1994.
48. LUCKNER, M. Secondary Metabolism in Microorganisms, Plants and Animals. Third revised and enlarged edition. Springer- Verlag. Berlin, 1990.
49. MAHAJAN, J. R.; MONTEIRO, M. B. New Diterpenoids from *Pterodon emarginatus*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 42, p. 103-107, 1970.
50. MAHAJAN, J. R.; MONTEIRO, M. B. New Diterpenoids from *Pterodon emarginatus*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Brasília-DF, v. 44 n.1, p. 51-53, 1972.

51. MAHAJAN, J. R.; MONTEIRO, M. B. New Diterpenoids from *Pterodon emarginatus*. **Journal of the Chemical Society, f Perkin-trans**, Brasília-DF, v.1, p. 520-525, 1973.
52. MATHIAS, L., Novos Estudos sobre as Leguminosas Ictiotóxicas. Tese de Doutorado, NPPN, UFRJ, Rio de Janeiro, 1994, p. 1-5.
53. MATOS, F. J. A. Introdução a Fitoquímica Experimental. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, 1988., 112 p.
54. MAUL, A. A., WASICHY, R., BACCHI, E. M. Extração por Fluido Supercrítico. **Rev. Bras. Farmacog.**, v. 5, p. 185-200, 1996.
55. MCINDOO, N. E. Agricultural Research Administration, Bureau of Entomology and Plant Quarantine, U.S. Depart. of Agriculture, Washington, D.C., 1945.
56. MORS, W. B and RIZZINI, C. T. Useful Plants of Brazil, Holden-Day Inc., 1966, 166p.
57. MORS, W. B.; DOS SANTOS FILHO, D.; FASCIO, M.; MONTEIRO, H.; GILBERT, B. and. PELLEGRINO, J. Chemoprophylactic Agent in Schistosomiasis: 14, 15-epoxygeranylgeraniol. **Science**, v. 157 n. 3791, p. 950-951, 1967.
58. National Research Council.. Neem: A Tree for Solving Global problems. National Academy Press, Washington, D, C. 1992, p. 141.
59. NETO, J. J. Contribuição ao Estudo Farmacognóstico dos Frutos de *Pterodon pubescens* Bentham. Tese de Doutorado, Brasil, 1973, p. 56.
60. NINCI, M. Profilaxis y Tratamiento de Pediculosis com Cuasia Amarga. **Rev. Fac. Cienc. Med.** v. 49 n. 2, p. 27-31, 1991.

61. NJAR, V.C.O.; ALAO, T.O.; OKOGUN, J.J. & HOLLAND, H. L. 2-Methoxycanthin-6-one: A New Alkaloid from the Stem Wood of *Quassia amara*. **Planta medica**, v. 59, 1993, p.259-261.
62. NUNES, N. C. J. Caracterização de substâncias de Média e baixa Polaridade do Extrato Hexânico de *Simaba cedron* Planch por Cromatografia Gasosa de Alta Resolução Acoplada à Espectrometria de Massas. Tese de Mestrado, Instituto de Química Orgânica, UFRJ, Rio de Janeiro, 1999, p. 60-74.
63. OLIVEIRA FILHO OLIVEIRA FILHO, A.M.; PINCHIN, R.; FIGUEIREDO, M.J. & MULLER, C.A. - Blockage of Embrionic Development in *Panstrongylus megistus* by Juvenile Hormone Analogues. **Insect. Sci. Applications**, v.5, p. 127-130, 1984
64. OLIVEIRA FILHO, A. M.; COSTA, E.G.; SANTOS C. E. ; MELO, M. T. V.; SILVA, E. L. & IASUDA J. - A Juvenile Hormone Analogue Against *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti*. **Proceed. First Intern. Congr. Parasitol. & Trop. Med.**, p. 145. Kuala Lumpur, Malásia, 1994.
65. OLIVEIRA FILHO, A.M. – “A Resistência dos Insetos aos Inseticidas e Controle dos Vetores da Malária”, (Capítulo 12). In F.A.M. Mariconi – coord., “Insetos, e outros invasores de residências”, Editora FEALQ, Piracicaba, SP, 1999 (p.379-402).
66. OLIVEIRA FILHO, A.M. – A Resistência dos Insetos aos Inseticidas, a Situação Atual do *Aedes aegypti* e a Explosão de Dengue no Rio de Janeiro em 2002. **Vetores e Pragas**, v. 11, p.9-13, 2002.
67. PAULAITIS, E. M.; KRUKONIS, V. J.; KURNIK, R. K.; REID, R. C. Supercritical Fluid Extraction. **Review in Chemistry**, v.1, p.179-250, 1983.
68. PECKOLT, G. AND PECKOLT, T. História das Plantas Medicinais e Úteis do Brasil. 8ª Edição, Editora Modelo - Rio de Janeiro, 1914, p. 17-19.

69. Pesticide Manufacturing and Toxic Materials Control Encyclopedia, Edited Marshall Sittig, Noyes Data Corporation, New Jersey, USA, 1980, p. 810.
70. PINTO COELHO M. G.; MARQUES P.R.; GAYER, C. R.; VAZ, L.C.; NETO, J. F.; SABINO, K. C.. Subacute Toxicity Evaluation of a Hydroalcoholic Extract of *Pterodon pubescens* Seeds in Mice with Collagen-induced Arthritis. **J Ethnopharmacol**, v. 77 n. 2-3, p. 159-64, 2001
- 71..PEREIRA, J. F. G., Estudo Químico e Biológico de *Carapa guianensis* Aubl. Tese de Mestrado, UFRJ, Instituto de Química, Rio de Janeiro, 1998, 262 p.
72. PLOSKER, G. L. & BROGDEN, R. N. *Serenoa repens* (Permixon) A Review of its Pharmacology and Therapeutic Efficacy in Benign Prostatic Hyperplasia. **Drugs Aging**, v.9 n. 5, p. 379-395, 1996.
73. PRANCE, G. T., BALÉE, W., BOOM, B. M. & CARREIRO, R. L. Quantitative Ethnobotany and the Case of Conservation In Amazonia: In Ethnobotany Evolution of a Discipline. Edited by Richard Evans Schultz, Dioscorides press. Theodore R. Dudley, Ph.D., General editor, Portland, Oregon, USA, 1995.
74. PURI, H. S. Neem, The Divine Tree *Azadiracta indica*, Harwood Academic Publishers, 1999, 167p.
75. RAHUMAN, A. A.; GOPALAKRISHNAN, B.; GHOUSE, S.; ARUMUGAM, S. AND HIMALAYAN, B. Effect of *Feromonía limonia* on Mosquito Larvae. **Fitoterapia**, v. 71, p.553-555, 2000.
76. REEVES, E.L. & GARCIA, C. Mucilaginous Seeds of the Cruciferae Family as Potential Biological Control Agents for Mosquito Larvae. **Mosq. News**, v. 29, p. 601-607, 1969.

77. REIS, G. G. dos. Estudos sobre a Dormência de Sementes de Sucupira (*Pterodon pubescens* Benth.). Tese de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1976, 41p.
78. REUTTER, L. **Traité de Matière Medicale et de Chimie Végétal**, Librairie J. B. Ballière, Paris, 1923.
79. SARTI, S.J.; MASCARO, U. C. P.. E DOS SANTOS FILHO, D. Controle da Mosca-do-Chifre (*Haematobia irritans irritans*) por Preparado à Base de Óleo Essencial de *Pterodon emarginatus*. Libro de Resúmenes de Trabajos Científicos, Montevideo, Uruguay, 1993. p. 186.
80. SERTIE J. A; BARBOSA M. V., PATRICIO K. C., CAPUTO L. R., SARTI S. J., FERREIRA L. P e BASTOS J. K. Anti-inflammatory Activity of the Crude Extract from the Fruits of *Pterodon emarginatus* Vog. **J Ethnopharmacol**, v.64, n. 2, p.127-33, 1999.
81. SIMAS, N.K. análise Química e Biológica de Espécies Vegetais com Atividade Larvicida em *Aedes aegypti*. Tese de Doutorado, NPPN, UFRJ, Rio de Janeiro, 2003.
82. SUKUMAR, K.; PERICH, M. J. & BOOBAR, L. R. Botanical Derivatives in Mosquito Control: a Review. **J. Am. Mosq. Control Assoc**, v. 7, p. 210-217, 1991.
83. SUN, R., SIVIK, B., LARSSON, K. The Fractional Extraction of Lipids and Cholesterol from Dried Egg Yolk Using Supercritical Carbon Dioxide. **Fat Sci. Technol.**, Leinfelden-Echterdingen, v. 97, n. 6, p. 214-9, 1995.
84. TAYLOR, L. T. Supercritical Fluid Extraction. John Wiley & Sons Inc., Canada, p.181, 1996.
85. VALENTA, Z.; PAPADOPOULOS, S.; ORR, D. E. AND PODESVA, C. Quassin and Neoquassin. **Tetrahedron**, v.18, p.1433, 1962.

86. WAGNER, H.; HIKINO, N. AND FARNSWORTH, N.R., Economic and Medicinal Plant Research, 2, p. 1999
87. WARE, G. W. The Pesticide Book. Thomson Publications, Fresno, CA, 1994, p.340.
88. WHO, Insecticide Resistance and Vector Control. WHO Technical Reports Series. n. 443, 1970.
89. WHO, Problemas Técnicos de las Operaciones de Lucha Antivectorial. Primer Informe del Comité de Expertos de la OMS em Biología de los Vectores y Lucha Antivectorial. Serie de Informes Tecnicos. n. 603, 44 p., 1977.
90. WILKINSON, J.B.; MOORE R.J. Insect Repellents. *Harry's Cosmeticology*. 7^a Ed. London: Longman Scientific & Technical, 1987. p. 206-213,
91. WILLIAMS, C.A, HARBORNE, J. B. & CLIFFORD, H. T. Negatively Charged Flavones in Tricin as Chemosystematic Markers in the Palmae. **Phytochemistry** v.12, p.2417-2430, 1973.
92. ZANCAN, K. C. Obtenção de Extrato Fluido de Gengibre com Dióxido de Carbono Supercrítico e co-solventes. Tese de Mestrado, Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas SP, 1998.