

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

HELOISA HELENA GARCIA DA SILVA

Atividade larvicida e caracterização molecular dos princípios ativos de *Magonia pubescens* St.Hil. (Sapindaceae) e de *Copaifera reticulata* Ducke (Leguminosae), visando ao controle de *Aedes aegypti*.

GOIÂNIA
2004

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS {TEDE} NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG.

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei n 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: [] Dissertação [x] Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Autor (a) :	HELOISA HELENA GARCIA DASILVA		
E-mail:	garciaheloisa@yahoo.com.br		
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página?	[x] Sim	[] Não	
Vínculo empregatício do autor	Universidade Federal de Goiás		
Agência de fomento:		Sigla:	
País:	Brasil	UF:	CNPJ:
Título:	Atividade larvicida e caracterização molecular dos princípios ativos isolados de <i>Magonia pubescens</i> St. Hil. (Sapindaceae) e de <i>Copaifera reticulata</i> Ducke (Leguminosae), visando ao controle de <i>Aedes aegypti</i>		
Palavras-chave:	Larvicida- <i>Aedes aegypti</i> - Controle – Produtos botânicos		
Título em outra língua:	Larvicidal activity and molecular characterization of the active ingredients <i>Magonia pubescens</i> St.Hil. (Sapindaceae) and <i>Copaifera reticulata</i> Ducke (Leguminosae) aiming to control <i>Aedes aegypti</i>		
Palavras-chave em outra língua:	Larvicidal – <i>Aedes aegypti</i> – Control - Botanical products		
Area de concentração :	Parasitologia		
Data defesa: (02/12/2004)			
Programa de Pós-Graduação:	Medicina Tropical		
Orientador (a):	Ionizete Garcia da Silva		
E-mail:	profionizete@yahoo.com.br		

Necessita do CPF quando não constar no SisPG

Data: ____ / ____ / ____

Assinatura do (a) autor (a)

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento [x] SIM () NÃO

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

HELOISA HELENA GARCIA DA SILVA

Atividade larvicida e caracterização molecular dos princípios ativos de *Magonia pubescens* St.Hil. (Sapindaceae) e de *Copaifera reticulata* Ducke (Leguminosae), visando ao controle de *Aedes aegypti*.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade Federal de Goiás para obtenção do Título de Doutor em Medicina Tropical.

Orientador: Ionizete Garcia da Silva

GOIÂNIA
2004

Ficha catalográfica elaborada automaticamente
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob orientação do Sibi/UFG.

Silva, Heloisa Helena Garcia da

Atividade larvicida e caracterização molecular dos princípios ativos de *Magonia pubescens* St.Hil. (Sapindaceae) e de *Copaifera reticulata* Ducke (Leguminosae), visando ao controle de *Aedes aegypti* [manuscrito] / Heloisa Helena Garcia da Silva. - 2004.

79 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Ionizete Garcia da Silva.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) , Programa de Pós Graduação em Medicina Tropical, Goiânia, 2004.

Bibliografia. Anexos.

Inclui fotografias, abreviaturas, símbolos, lista de figuras.

1. Larvicidas. 2. *Aedes aegypti*. 3. Controle. 4. Produtos botânicos. I. Silva, Ionizete Garcia da, orient. II. Título.

**Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da
Universidade Federal de Goiás**

BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO

Aluno (a): Heloisa Helena Garcia da Silva

Orientador (a): Ionizete Garcia da Siva

Membros:

1.Edson Rodrigues Filho - UFSCAR

2.Regina Maria Geris dos Santos - UFBA

3.Maria do Rosário Rodrigues - UFG

4.Jose Clecildo Barreto Bezerra -UFG

5.Ionizete Garcia da Silva - UFG

Data:02/12/2004

Ao meu esposo,
Ionizete,
e aos meus filhos,
Fernando,
Rafael,
Larissa,
Lívia e
Marina,
dedico.

"Os que contemplam a beleza da Terra encontram reservas de energia que duram toda a vida. Há uma beleza simbólica, assim como real, na migração das aves, nas marés altas e baixas, no botão de flor pronto para a primavera. Há algo infinitamente regenerador nos versos repetidos pela natureza - a segurança de que a manhã surge após a noite e a primavera após o inverno."

Rachel Carson , Primavera Silenciosa, 1962.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho, e, em especial:

ao Dr. Ionizete Garcia da Silva, Professor Titular do Departamento de Microbiologia, Imunologia, Patologia e Parasitologia (DMIPP), do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), da Universidade Federal de Goiás (UFG), pela orientação, ajuda e estímulo constantes;

à Direção do IPTSP, ano 2002, pela reestruturação física do Laboratório de Bioatividade de Plantas,

à Coordenação de Pós-Graduação em Medicina Tropical e ao DMIPP pela oportunidade oferecida;

à Fundação de Apoio à Pesquisa (FUNAPE) e ao CNPq pelo apoio financeiro concedido;

ao Dr. Edson Rodrigues Filho, Professor do Departamento de Química e Chefe do Laboratório de Espectrometria de Massas da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), pela simpatia com que sempre nos recebeu e colocou o Laboratório de Produtos Naturais e o de Espectrometria de Massas à nossa disposição, e pela valiosa colaboração no estudo químico;

a Dra. Regina Maria Geris dos Santos, pós-doutoranda do Departamento de Química da UFSCar, pela inestimável colaboração, disponibilidade e desprendimento em nos atender e, sobretudo, pela amizade;

a Carmeci Natalina Elias, Técnica de Laboratório da Secretaria de Estado da Saúde de Goiás/ Fundação Nacional de Saúde-GO, pela grande ajuda e amizade em todos os momentos deste trabalho;

ao Prof. Jayrson Araújo de Oliveira, do Departamento de Morfologia e Histologia da UFG, pela colaboração na formatação do texto;

aos amigos Edson de Castro, Girlene Sena de Assis e Taísia Izabel Vieira, pelo apoio técnico durante o desenvolvimento deste trabalho;

ao grupo de alunos do Laboratório de Produtos Naturais da UFSCar, especialmente a Francinete Campos e Ana Paula Terezan, pelo convívio agradável e ajuda em pequenos procedimentos que agilizaram o trabalho, durante nossa estadia naquela instituição.

APRESENTAÇÃO

Os países tropicais têm vivido, na última década, um grave problema de saúde pública. Doença re-emergente, o dengue surge como uma das mais importantes doenças tropicais deste novo milênio. Além de causar um grande impacto social e econômico, pode, algumas vezes, variar de uma síndrome viral, benigna, até um quadro grave de doença hemorrágica.

No Brasil, as causas das altas densidades de populações do principal vetor do dengue, o *Aedes aegypti*, em áreas urbanas e periurbanas, são bastante complexas e de difícil solução. O controle químico do vetor, único elo vulnerável da cadeia de transmissão, tem sido associado a problemas como o aparecimento de resistência em novas gerações do mosquito e agressão ao meio ambiente e à saúde da população, uma vez que a maioria dos criadouros está no ambiente doméstico.

O panorama atual no Brasil, com epidemias anuais de dengue, exige avanços na busca de soluções novas e eficazes no controle de vetores. A nossa biodiversidade poderá ser, em parte, a solução desses graves problemas, pela quantidade de substâncias biologicamente ativas, encontradas principalmente em plantas, que têm estimulado a pesquisa de novos compostos que possam atuar como larvicidas no controle do *A. aegypti*.

Buscou-se, neste trabalho, a obtenção de frações e/ou substâncias puras com atividade larvicida sobre *A. aegypti*, que possam ser usadas *in natura* ou como modelos para produtos de síntese.

A conclusão deste projeto de Doutorado, apresentado no formato de três artigos científicos, tem dois aspectos importantes. A estruturação do Laboratório de Bioatividade de Plantas, ou seja, um laboratório de fitoquímica com enfoque biológico, no Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) da Universidade Federal de Goiás (UFG), e o início de uma valiosa colaboração com o Laboratório de Produtos Naturais (PN) do Departamento de Química (DQ) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). O Laboratório de Bioatividade de Plantas foi implantado no IPTSP, no ano de 2002, graças a financiamentos do CNPq, OPAS e FUNAPE e o espaço físico foi reestruturado com apoio do, então diretor, Prof. Dr. José Clecildo Barreto Bezerra. Esse laboratório foi o marco da implantação de uma nova linha de pesquisa dentro do IPTSP, e a conclusão deste trabalho a consolida em definitivo. Além disso, permitirá também a formação de novos pesquisadores. O trabalho integrado entre a UFG e a UFSCar possibilitou avanços expressivos na pesquisa, seguindo a nova tendência que enfatiza trabalhos em colaboração. Aliada a essa tendência é consenso que a pesquisa da atividade biológica dos constituintes químicos das plantas se traduz numa possível aplicação prática, o que foi o objetivo maior desta tese.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1. Dengue e <i>Aedes aegypti</i>	15
1.2. Produtos naturais como alternativa no controle de insetos	16
1.3. Metabólitos vegetais.....	18
1.4. Bioprospecção.....	21
2. OBJETIVOS	25
3. MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1. Obtenção das larvas	26
3.2. Bioensaios.....	27
3.3. Obtenção dos extratos	28
3.3.1. <i>Magonia pubescens</i>	28
3.3.1.1. Coleta, secagem e moagem.....	28
3.3.1.2. Extração	29
3.3.1.3. Fracionamento	29
3.3.1.4. Análise das frações bioativas	30
3.3.2. <i>Copaifera reticulata</i>	30
3.3.2.1. Coleta do óleo-resina	30
3.3.2.2. Obtenção dos extratos hexânico e metanólico.....	30
3.3.2.3. Fracionamento do extrato hexânico guiado por bioensaios	31
3.3.2.4. Fracionamento do extrato metanólico guiado por bioensaios	32
3.4. Análise Estatística	35
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
ARTIGO 1 – publicado na Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical Atividade larvicida de taninos isolados de <i>Magonia pubescens</i> St.Hil. (Sapindaceae) sobre <i>Aedes aegypti</i> (Diptera, Culicidae)	43
Resumo	43
Abstract	43
Material e métodos.....	44
Resultados e discussão	44
Referências bibliográficas	45
ARTIGO 2 – submetido à Revista Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.....	51
Larvicidal Activity of Oil-resin Fractions from the Brazilian Medicinal Plant <i>Copaifera reticulata</i> Ducke Against <i>Aedes aegypti</i> (Diptera, Culicidae)	51
MATERIALS AND METHODS.....	52
RESULTS AND DISCUSSION	54
REFERENCES.....	56
Artigo 3 – Submetido à Revista “Biochemical Systematics and Ecology”	62
Diterpenes from <i>Copaifera reticulata</i> Ducke with larvicidal activity against <i>Aedes aegypti</i>	62
1. Subject and source.....	62
2. Previous work.....	62
3. Present study	63
a) Isolation of Compounds	63
b) Bioassays.....	64
4. Ecological significance	65
REFERENCES.....	66
6. CONCLUSÕES	69
ANEXOS – Normas para publicação.....	70
ANEXO I - Artigo I	70
ANEXO II – Artigo II	74
ANEXO III – Artigo III	76

LISTA DE ABREVIÇÕES¹

AcOEt	Acetato de etila
a	Altura
BHC	Hexaclorociclohexano
CC	Cromatografia em Coluna
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CCDP	Cromatografia em Camada Delgada Preparativa
CDCl ₃	Clorofórmio Deuterado
CD ₃ OD	Metanol Deuterado
CG	Cromatografia Gasosa
CG/EM	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas
CL	Concentração letal
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CL ₅₀	Concentração letal que mata 50% das larvas
CL ₉₀	Concentração letal que mata 90% das larvas
CoA	Coenzima A
cm	Centímetro
Da	Dalton
DDT	Diclorofeniltricloreto
DMSO	Dimetilsulfóxido
EM	Espectrometria de Massas
ESI/APCI	Electrospray/ Atmospheric Pressure Chemical Ionization
EtOH	Etanol
g	Grama
GC/MS	Gas Chromatography Mass Spectrometry
h	Hora
Kg	Kilograma
MeOH	Metanol
mg	Miligrama
mL	Mililitro
MS	Mass Spectrometry
ppm	Partes por Milhão
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio-1
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13
TMS	Tetrametilsilano

SÍMBOLOS

φ - Diâmetro

¹ Algumas abreviações foram mantidas em inglês por já estarem estabelecidas na literatura e entre pesquisadores.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ciclo biossintético dos metabólitos secundários (Santos, 1999).....	20
Figura 2 – Obtenção de substâncias biologicamente ativas (Cechinel Filho & Yunes,1998)	24
Figura 3 – A - Alimentação de fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> em camundongos presos em tela de náilon. B – Alimentação de machos de <i>Aedes aegypti</i> em absorvente interno feminino embebido em água açucarada.....	27
Figura 4 – A – Copo de vidro, âmbar, com papel filtro para oviposição das fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> . B - Papel filtro com ovos de <i>Aedes aegypti</i>	28
Figura 5 – Fracionamento do extrato bruto etanólico das cascas do caule de <i>Magonia pubescens</i> , em coluna cromatográfica, segundo a técnica de gradiente de polaridade e identificação dos constituintes químicos.....	30
Figura 6 – Partição líquido-líquido do óleo in natura de <i>Copaifera reticulata</i> , com n-hexano:metanol (1:1)	32
Figura 7 – Fracionamento do extrato hexânico, segundo a técnica de gradiente de polaridade, do óleo in natura de <i>Copaifera reticulata</i> , e identificação dos constituintes químicos	33
Figura 8 – Fracionamento do extrato metanólico do óleo in natura de <i>Copaifera reticulata</i> , segundo a técnica de gradiente de polaridade, e identificação dos constituintes químicos	34
Figura 9 – Refracionamento da subfração metanólica CRM5 de <i>Copaifera reticulata</i> , segundo a técnica de gradiente de polaridade, e identificação dos constituintes químicos	35
Figura 10 – Perfil cromatográfico da subfração CRM5-7 em cromatografia em camada delgada, sugestivo de substância pura.....	36

RESUMO

O dengue é uma doença viral aguda de grande importância na saúde pública, e sua alta incidência nos países tropicais está intimamente relacionada à presença do principal vetor, o mosquito *Aedes aegypti*. Ao longo dos anos, as tentativas de controlar esse vetor têm sido baseadas na aplicação de inseticidas químicos sintéticos, os quais já começam a produzir efeitos indesejáveis. A modificação da suscetibilidade e o aparecimento de gerações de mosquitos resistentes aos produtos utilizados, além de sua rápida proliferação, estimularam estudos sobre a atividade de produtos naturais sobre as larvas de *A. aegypti*, como uma medida alternativa para o seu controle. Neste trabalho foram realizados estudos fitoquímicos e de atividade larvicida das plantas *Magonia pubescens* St. Hil. (Sapindaceae) e *Copaifera reticulata* Ducke (Leguminosae), com o objetivo de se isolarem frações e/ou substâncias puras com potencial fitoinseticida. Após coleta de cascas do caule de *M. pubescens* e óleo *in natura* de *C. reticulata*, obtiveram-se os extratos, que foram submetidos a procedimentos cromatográficos guiados por bioensaios, purificação e identificação estrutural. Para detecção da atividade larvicida foram utilizadas larvas de 3º estágio de *A. aegypti*, obtidas de colônia cíclica mantida por dez anos, a $28\pm 1^\circ\text{C}$, $80\pm 5\%$ de umidade relativa e fotofase de 12h. Foram utilizadas 20 larvas para cada concentração e os bioensaios foram realizados com 5 réplicas, em câmara climatizada similarmente à da criação. Para o controle utilizou-se o mesmo número de larvas em solução de dimetilsulfóxido e água destilada. As leituras de mortalidade foram feitas 24 e 48h após o início dos bioensaios. As frações, subfrações e substâncias puras com atividade larvicida, obtidas desses procedimentos, com as duas plantas, foram monitoradas quimicamente através de cromatografia em camada delgada e analisadas por ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono-13, e cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas. O princípio ativo identificado na *M. pubescens* foi um tanino catéquico ($\text{C}_{45}\text{H}_{36}\text{O}_{18}$ e massa molecular de 864.77 Da) que apresentou CL_{50} de 3,1 ppm; da *C. reticulata* foi isolado o ácido 3-acetoxilabda-8(17),13-dien-15-oico ($\text{C}_{22}\text{H}_{34}\text{O}_4$, e massa molecular de 362 Da) com CL_{50} de 0,8 ppm. Esses dois princípios ativos apresentaram concentrações letais com potencial de uso nas ações de controle do *A. aegypti*.

ABSTRACT

Dengue is an acute viral disease of great importance to the public health, and its high incidence in the tropical countries is intimately related to the presence of the main vector, the mosquito *Aedes aegypti*. Throughout the years, attempts to control the vector have been based on the application of synthetic chemical insecticides, which have already begun to produce undesirable effects. The modification of the susceptibility and the emergence of generations resistant mosquitoes besides fast proliferation stimulated studies about the activity of natural products on the larvae of *A. aegypti*, as an alternative measure for control. In this work, phytochemicals studies were accomplished by larvicidal activity of the plants *Magonia pubescens* St. Hil. (Sapindaceae) and *Copaifera reticulata* Ducke (Leguminosae), with the purpose of isolating fractions and/or pure substances with insecticide potential. After collection of peels of the *M. pubescens* stem and *C. reticulata* oil-resin in natura, extracts obtained were submitted to bioassays, guided-purification and structural identification. For the larvicidal activity assays, 3rd instar larvae of *A. aegypti* were used. They were obtained from cyclic colony maintained by ten years, at 28±1°C, 80±5% of relative humidity and 12 h photoperiod. Twenty larvae were used for each concentration and the bioassays were carried out in 5 replicate, in an acclimatized ambient similar to colony growth. Control assays were conducted using the same number of larvae in a dimethylsulphoxide and distilled water solution. The mortality of larvae was measured after 24 and 48 h. Fractions, subfractions and pure substances with larvicidal activity, obtained from those procedures, were monitored chemically through thin layer chromatography and analyzed by ¹H nuclear magnetic resonance and ¹³C, and gas chromatography coupled to mass spectrometry. The identified active substance in the *M. pubescens* was a tannin (C₄₅H₃₆O₁₈ and molecular mass of 864.77 Da) which presented LC₅₀ of 3.1 ppm; from the *C. reticulata* the acid 3-acetoxi-labda-8(17),13-dien-15-oic was isolated (C₂₂H₃₄O₄, and molecular mass of 362 Da) with LC₅₀ of 0.8 ppm. These two active substances presented lethal concentrations with potential use in the actions to control of the *A. aegypti*.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Dengue e *Aedes aegypti*

Entre os grandes desafios que afetam a saúde pública em nível mundial está o dengue, nas suas formas clássica e hemorrágica. Doença viral aguda, o dengue atualmente é endêmico em mais de 100 países, afetando 40% da população mundial (2,5 bilhões de pessoas), que vivem em regiões tropicais e subtropicais, em áreas urbanas e periurbanas (WHO 2002). Em algumas comunidades estudadas, o dengue chega a incapacitar 57.000 pessoas/milhão de habitantes/ano, índice maior que de algumas doenças transmissíveis, causando um grande impacto social (Meltzer et al. 1998).

No Brasil, até o ano de 2001 já havia transmissão do dengue em 24 das 27 unidades federadas (MS 2001). A re-emergência do dengue está diretamente associada à presença do vetor *Aedes aegypti* (Lin. 1762), mosquito capaz de transmitir os 4 sorotipos de vírus do dengue. Com hábitos sinantrópicos e antropofílicos, a fêmea desse mosquito, sugando uma pessoa virêmica, com pelo menos um dos 4 sorotipos do vírus, é capaz de transmití-lo imediatamente, quando interrompe a alimentação e troca de hospedeiro, ou após um período de incubação de 8 a 10 dias, no mosquito. Durante esse período, o vírus se multiplica e alcança as glândulas salivares. No momento de nova picada, pode transmitir a doença ao homem, inoculando o vírus junto com a saliva (OMS 1987). Outra importante forma de disseminação e manutenção do vírus na natureza é a transmissão transovariana, na qual a fêmea do *A. aegypti* passa a infecção viral aos seus descendentes (Rosen 1981; Rosen et al. 1983; Cordellier 1991).

A proliferação dessa espécie, principalmente nos países tropicais, foi favorecida por fatores como explosão demográfica, aquecimento global e movimentação humana (Tauil 2002). Além de sua considerável importância médica como vetor de dengue, o *A. aegypti* transmite também o vírus da febre amarela urbana na Ásia, África e Américas (Pinheiro & Corber 1997; WHO 2002).

Sem vacina disponível para o dengue, até o momento, e nem terapêutica específica, o caminho mais rápido e eficaz para diminuir a incidência da doença é o controle do vetor. A sua presença em todas as

unidades federadas, infestando cerca de 71,4% dos municípios brasileiros (MS 2001) e as epidemias anuais de dengue ocorridas no Brasil, nos últimos anos, mostram que esse controle é um desafio administrativo e público que persiste e se agrava ano após ano.

As tentativas para se alcançar êxito no controle desse vetor baseiam-se na aplicação de inseticidas químicos sintéticos que são substâncias utilizadas para matar ou repelir insetos, sendo que estudos visando sua descoberta, isolamento, síntese, toxicologia e impacto ambiental têm se desenvolvido no mundo inteiro nas últimas décadas. O uso de inseticidas químicos consome, anualmente, bilhões de dólares na tentativa de controlar insetos (Viegas Jr. 2003). Porém, a constante e indiscriminada aplicação de produtos químicos na tentativa de controlar o principal vetor do dengue levou ao surgimento de tolerância e/ou resistência do mosquito aos larvicidas e adulticidas de uso habitual nas atividades de controle (Tauil 2002).

O temephos, pertencente ao grupo dos organofosforados, é o único larvicida disponível no mercado e vem sendo usado há mais de 30 anos no controle de *A. aegypti* em todo o mundo (Brooks et al. 1996, Chippaux & Coustard 1992). Porém, diferentes níveis de resistência já foram detectados em diversos países (Schofield et al. 1984; Failloux et al. 1994; Mazzarri & Georghiou 1995; Carvalho & Silva 1999; Lima et al. 2003; Macoris et al. 2003; Braga et al. 2004).

Todos esses fatores têm levado à busca contínua de novos agentes inseticidas, seletivos, eficazes e ecologicamente seguros. Os produtos naturais enquadram-se nesse contexto, sendo, portanto, o objetivo principal deste trabalho.

1.2. Produtos naturais como alternativa no controle de insetos

A busca de substâncias naturais, de uso prático para o homem, é uma das atividades mais antigas da nossa civilização (Santos 2003). No Brasil, as plantas têm sido os organismos vivos mais investigados como fonte de produtos naturais (Brás-Filho 1994).

Até a década de 40, os inseticidas derivados de produtos naturais foram bastante utilizados, como a nicotina, usada sob a forma de lavagem de fumo,

extraída das folhas de *Nicotina tabacum*, e a piretrina, originalmente extraída das flores de várias espécies do gênero *Chrysanthemum* (Vieira & Andrei 1997). A partir da Segunda Guerra Mundial surgem os produtos sintéticos que foram desenvolvidos como subprodutos da pesquisa de agentes biocidas durante a guerra. Muito mais potentes e menos específicos que os naturais, estes produtos passaram a ser usados em larga escala (Vieira & Andrei 1997).

O DDT, inseticida eficiente e com alto poder residual, trouxe um otimismo exagerado e começou a ser empregado de maneira indiscriminada e em doses cada vez maiores. Em pouco tempo, porém, iniciou-se o declínio dessa fase. Observou-se que os inseticidas clorados (DDT, BHC) e fosforados (Parathion, Malathion) causavam efeitos indesejáveis aos ecossistemas e eram altamente tóxicos para o homem. Além disso, com sua enorme capacidade de adaptação, a natureza respondia com o surgimento de populações de insetos mais resistentes. Carson (1962), com seu livro *Silent Spring*, provocou no homem uma reflexão e a conscientização de que a natureza é vulnerável à intervenção humana, levando-o a um maior respeito aos mecanismos naturais de adaptação.

Aos poucos, o homem inicia a busca de inseticidas viáveis, seletivos, biodegradáveis, econômicos e de aplicabilidade em programas, integrando o controle de insetos com o baixo impacto ambiental, buscando dar maior segurança à população. Neste contexto, os extratos de plantas voltaram a despertar interesse, pois podem ser desenvolvidos até a obtenção de produtos que apresentam propriedades específicas como baixo peso molecular, certa solubilidade e volatilidade, sendo, na maioria das vezes, biodegradáveis, seletivos e não tóxicos. Estas características são compatíveis com o controle de mosquitos e preservação do meio ambiente (Park et al. 2002).

A grande variedade de substâncias presentes nas plantas estimula seu isolamento, identificação e verificação da atividade larvicida, pois só recentemente algumas substâncias químicas isoladas foram estudadas com essa finalidade (Siddiqui et al. 2000; Park et al. 2002; Carvalho et al. 2003; Viegas Jr. 2003, Simas et al. 2004, Siddiqui et al. 2004).

1.3. Metabólitos vegetais

Os organismos vivos produzem substâncias que permitem a sua adaptação ao meio ambiente, importantes na preservação das espécies e na manutenção das comunidades (Wittaker & Feeny 1971). Nas plantas, essas substâncias são sintetizadas e degradadas por inúmeras reações anabólicas e catabólicas, que compõem seu metabolismo. Os compostos resultantes desse metabolismo são separados em produtos do metabolismo primário (glicídios, protídios e lipídios) que, em geral, são macromoléculas amplamente produzidas pelos seres vivos (Harbone & Tomas-Barberam 1991), e os do metabolismo secundário, que são micromoléculas como os terpenóides, alcalóides, fenóis, glicosídeos etc (Fig. 1).

Os metabólitos secundários originam-se a partir do metabolismo da glicose, por duas vias principais: a do ácido chiquímico e a da acetil CoA (Fig. 1). O ácido chiquímico origina os aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano, que são os precursores da maioria dos metabólitos secundários aromáticos. Os derivados da acetil CoA podem seguir 3 rotas metabólicas distintas, como pode ser observado na Fig 1: do ácido cítrico, do mevalonato ou da condensação do acetato (Santos 1999). Essa complexa rede de reações que compõem o metabolismo das espécies vegetais é coordenada por uma série de enzimas e co-enzimas responsáveis pelos processos de síntese e degradação desse compostos, os quais estarão distribuídos em diferentes partes do vegetal.

Atualmente, sabe-se que essas substâncias são defesas de natureza química que as plantas possuem para se proteger de outras plantas, de insetos fitófagos, de períodos prolongados de seca e de raios ultra-violeta. As rotas metabólicas que levam à produção desses metabólitos secundários são ativadas durante alguns estágios particulares de crescimento ou em períodos de estresse (Mann 1987).

O modo de ação dos metabólitos secundários sobre insetos fitófagos se traduz em inibição do crescimento do inseto, redução da capacidade reprodutiva e supressão do apetite (fago-inibidores), podendo levá-lo à morte por inanição. Seu papel fundamental é de proteger a planta (Matos 1997).

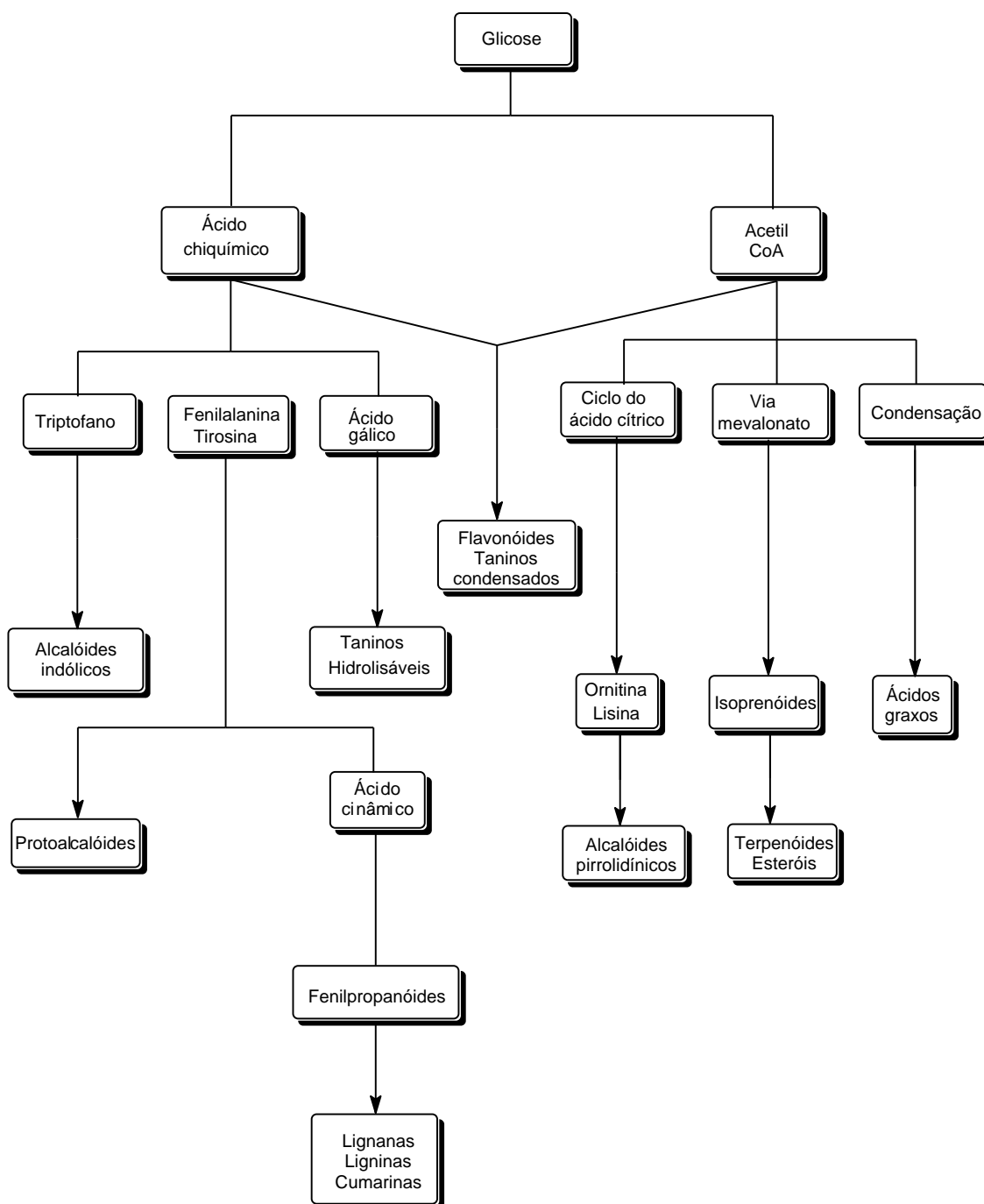


Figura 1 – Ciclo biossintético dos metabólitos secundários (Santos, 1999).

Um dos objetivos da química de produtos naturais é o esclarecimento desses metabólitos secundários, através de seu isolamento e elucidação de suas estruturas moleculares (Santos 1999). Para tanto, utilizam-se métodos de extração, separação, purificação e identificação, o que equivale ao estudo fitoquímico da planta. As classes mais conhecidas e importantes desses

metabólitos, que podem ser detectadas com a aplicação de testes analíticos padrões, são: ácidos graxos, taninos, alcalóides, terpenóides, esteróides, fenóis, cumarinas e flavonóides (Maciel et al. 2002). Segundo Di Stasi (1996) os alcalóides e terpenóides são as classes químicas com maiores potencialidades de fornecer compostos biologicamente ativos.

Os metabólitos secundários, por serem fatores de interação entre organismos, apresentam atividades biológicas interessantes, mas apesar do grande aumento do número de trabalhos nesta área, ainda são pouco representativos os que envolvem atividade biológica de princípios ativos, predominando aqueles com extratos vegetais brutos. A elucidação desses componentes químicos ativos presentes nas plantas e de suas aplicações em benefício do homem vem sendo um dos maiores desafios na área de estudos com produtos naturais (Maciel et al. 2002). A busca de aplicação prática para as moléculas isoladas de fontes naturais, representa um passo importante. O obstáculo a esse estudo reside na dificuldade em se realizar trabalhos multidisciplinares envolvendo fitoquímica e atividade biológica, apesar de vários pesquisadores se proporem a realizar este tipo de estudo (Pinto et al. 2002).

1.4. Bioprospecção

A análise de substâncias bioativas em plantas é muito complexa, pois, geralmente, os compostos presentes em menor proporção são os que apresentam melhores atividades biológicas (Cechinel Filho & Yunes 1998).

A primeira etapa da investigação fitoquímica é a coleta do material vegetal. Deve-se coletar entre 3-6kg de material, buscando, dessa forma, o isolamento de grandes quantidades das substâncias majoritárias, facilitando suas investigações biológicas (Maciel et al. 2002).

Em seguida deve-se proceder à secagem, que é realizada, preferencialmente, em estufa a 40°C, com ventilação forçada, para evitar a saturação com a umidade desprendida do material. Esta secagem tem por finalidade a retirada de água do material, impedindo as reações de hidrólise e de multiplicação microbiana. A circulação propicia a renovação constante do ar, permitindo uma secagem mais rápida (Falkenberg et al. 1999). É importante ter em mente que o período de tempo entre a coleta e a secagem deve ser o menor possível, para manutenção da integridade máxima dos princípios ativos, pois a partir do momento da coleta inicia-se um processo de degradação enzimática na planta, que leva à degradação dos princípios ativos (Falkenberg et al. 1999).

Para o preparo dos extratos, o material é submetido à moagem, que tem por finalidade reduzi-lo, mecanicamente, a fragmentos de pequenas dimensões, preparando-o para a extração. O aumento da área de contato entre o material sólido moído e o líquido extrator torna a operação mais eficiente (Falkenberg et al. 1999).

Para a extração existem várias metodologias, visando o isolamento dos constituintes químicos. Todas se baseiam na seletividade do solvente, que depende da sua polaridade. Praticamente todos os constituintes de interesse para análise fitoquímica apresentam alguma solubilidade em misturas etanólicas e metanólicas. A extração via percolação é o método mais utilizado, pois apresenta menor risco de reações químicas ou formação de artefatos decorrentes da ação entre solventes e altas temperaturas. Para uma única extração utiliza-se, geralmente, um solvente polar como MeOH ou EtOH. Para mais de uma extração usam-se três tipos de solvente: polar, de polaridade

moderada e apolar. Porém, devido aos protocolos internacionais, condenando o uso de solventes clorados, é mais indicada uma única extração com um solvente polar (Falkenberg et al. 1999; Maciel et al. 2002).

Após a extração, o extrato deve ser submetido a uma partição líquido-líquido, com solventes de diferentes polaridades ou a uma CC, a vácuo, com solventes de polaridades crescentes, visando a uma semi-purificação das substâncias através de suas polaridades (Cechinel Filho & Yunes 1998).

Todos os extratos e frações devem ser testados biologicamente e, os que apresentarem atividade de interesse, devem ser submetidos aos procedimentos cromatográficos (Fig. 2) que são os métodos mais usados atualmente para isolamento e purificação de compostos ativos. Podem ser empregadas a CC, CCD, CCDP, CG ou CLAE, levando-se em conta o tipo de extrato que se obteve e a infra-estrutura do laboratório. Todas as técnicas cromatográficas se baseiam na diferente solubilidade das principais classes químicas diante de solventes de diferentes polaridades (Maciel et al. 2002).

Para a identificação dos compostos orgânicos pode ser utilizada a RMN (^1H e ^{13}C), que determina a natureza e o ambiente químico de hidrogênios e carbonos. É a técnica mais importante para a investigação da estrutura molecular (Maciel et al. 2002) e geralmente é usada para substâncias puras. A EM fornece dados sobre o peso molecular e permite a identificação de fragmentos característicos da molécula. Para separar e quantificar substâncias componentes de misturas a CG é o método de escolha, podendo ser usada acoplada à EM (Maciel et al. 2002). Os dados obtidos nestas análises são comparados com aqueles constantes da biblioteca de espectros de massas (NIST- National Institute of Standards and Technology data Collection), que, geralmente, é instalada no computador (Simões & Spitzer 1999).

Após o estudo seletivo de prospecção em mais de 20 plantas, duas apresentaram potencial que preenchem os objetivos deste trabalho. A *Magonia pubescens* St. Hil. (Sapindaceae), característica do Cerrado brasileiro (Laboriau 1973; Lorenzi 1992), sem uso medicinal, e a *Copaifera reticulata* Ducke (Leguminosae), espécie encontrada na região Amazônica, nos estados do Pará e Amazonas (Corrêa 1984), produtora de um óleo-resina bastante utilizado na medicina popular (Paiva et al. 2002; Basile et al. 1988; Cascón & Gilbert 2000).

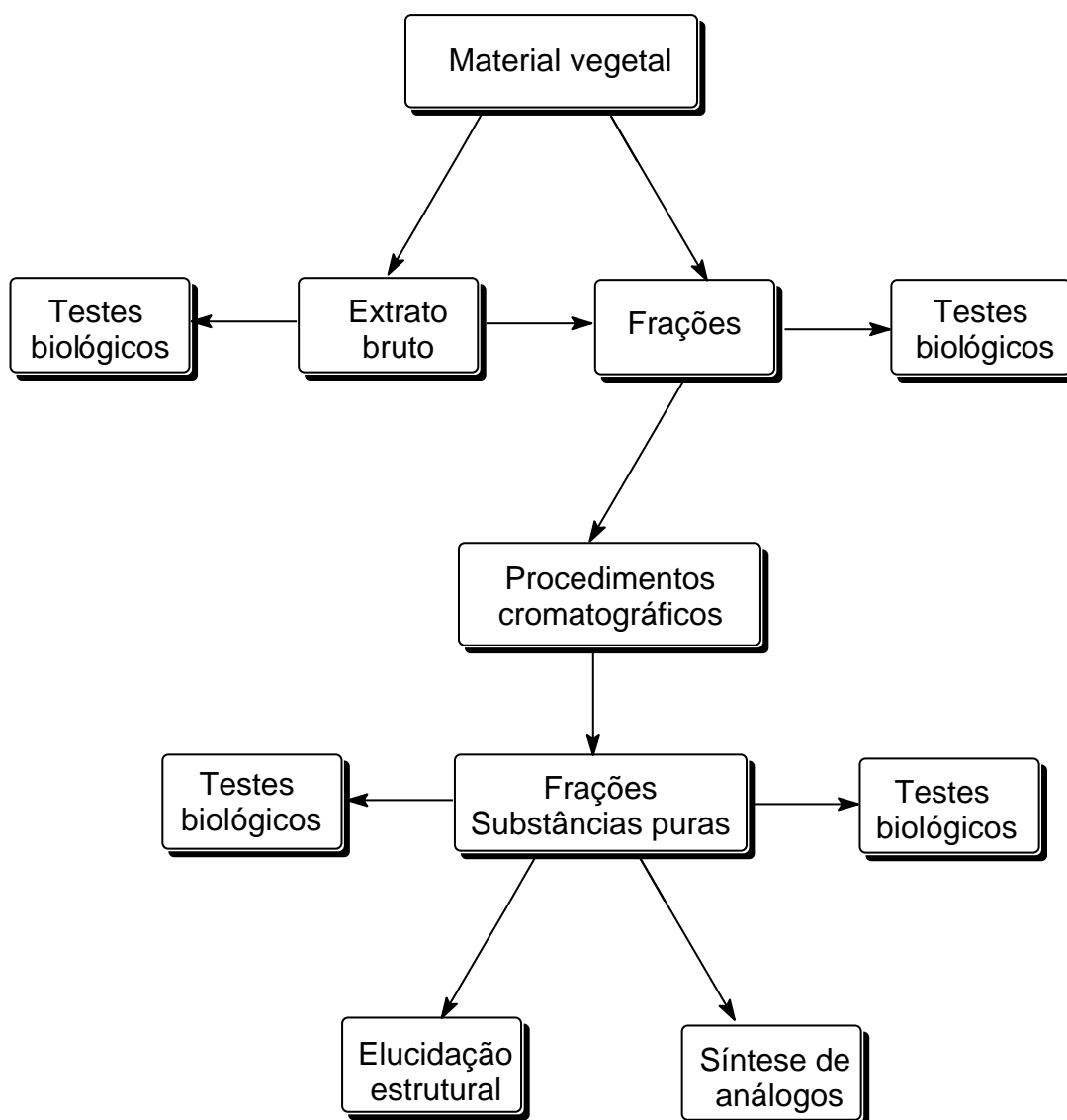


Figura 2 – Obtenção de substâncias biologicamente ativas (Cechinel Filho & Yunes,1998).

A *M. pubescens*, conhecida popularmente como tingui, apresenta grande densidade em áreas de terreno fraco e seu caule tem sido aproveitado como postes para colocação de arame e também na construção civil. A possibilidade de utilização dessa planta como larvicida para o *A. aegypti* e *A. albopictus* aparece com os primeiros resultados do potencial do extrato bruto etanólico (e.b.e.) da casca do caule (Silva et al. 1996; Guimarães et al. 2001). Posteriormente, Silva et al. (2003) realizaram testes toxicológicos desse e.b.e. em ratos, coelhos e cobaias, e de acordo com as normas preconizadas pelo

Ministério da Saúde (MS 1996) para produtos de origem vegetal, o e.b.e. foi considerado como atóxico. Este resultado possibilitou a realização de bioensaios em diferentes criadouros artificiais, similares àqueles em que *A. aegypti* se cria. Além disso, a avaliação da atividade larvicida, sob variáveis de campo, indicou o potencial dessa planta, abrindo perspectivas de uso no controle desse mosquito, bem como da necessidade de estudos complementares para identificação dos princípios ativos, visando diminuir as concentrações letais e possibilitar a investigação de novas formulações (Silva et al. 2003).

A *C. reticulata*, juntamente com as outras espécies do mesmo gênero, são conhecidas popularmente no Brasil como “copaibeiras” ou “pau-d’óleo” por exudarem do seu tronco um óleo-resina. Este é amplamente usado na medicina popular, desde o século XVI, por indígenas, que o aplicavam no cordão umbilical dos recém-nascidos para evitar infecções (Salvador 1975). Atualmente sua maior utilização tem sido como agente cicatrizante (Paiva et al. 2002), anti-séptico e antiinflamatório (Basile et al.1988; Cascón & Gilbert 2000).

Mesmo com o amplo uso, os estudos farmacológicos e químicos dos óleos de copaíba são reduzidos. A maioria não identifica a espécie botânica, nem informa a época e o local de coleta (Maciel et al. 2002). Outros analisam os óleos comerciais, que são encontrados à venda em feiras livres, mercados populares e farmácias de produtos naturais de todo o país, na maioria das vezes adulterados, pois não são submetidos a nenhum controle de qualidade (Veiga Jr. et al. 1997; Vasconcelos & Godinho 2002). A maioria dos estudos químicos realizados com óleos de copaíba visa sua aplicação comercial na indústria de perfumes, cosméticos, tintas e vernizes (Veiga Jr. et al. 1997).

2. OBJETIVOS

Gerais:

- buscar alternativas naturais, de baixa toxicidade para vertebrados e, basicamente, sem impacto ambiental, que possam ser utilizadas no controle de *A. aegypti*

Específicos:

- obter frações e isolar substâncias puras das plantas *M. pubescens* e *C. reticulata*

- verificar a atividade larvicida dos extratos, frações e substâncias puras sobre *A. aegypti*

- determinar as estruturas moleculares das substâncias através de técnicas cromatográficas e espectrométricas

- implantar nova linha de pesquisa no IPTSP e iniciar colaboração com grupos de pesquisa em Química de Produtos Naturais

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Obtenção das larvas

As larvas foram obtidas de ovos provenientes de fêmeas, de uma criação cíclica de *A. aegypti*, mantida no Laboratório de Biologia e Fisiologia de Insetos, IPTSP/UFG, há 10 anos, em câmara climatizada a $28 \pm 1^\circ\text{C}$, $80 \pm 5\%$ de umidade relativa e fotofase de 12 h (Silva et al. 1998).

Para manutenção desta criação, as fêmeas alimentam-se em camundongos, imobilizados em uma tela de náilon (Silva et al. 1998), e os machos em algodão, do tipo o.b. (absorvente interno feminino) (Figs.3A,B), embebido em água açucarada. No interior das gaiolas de criação, coloca-se um copo de vidro, âmbar, com água e um papel filtro, do tipo coador de café, onde as fêmeas realizam suas posturas (Figs. 4A,B). Diariamente, procede-se à coleta dos ovos que são colocados para secar, e, em seguida, acondicionados em sacos plásticos e mantidos no interior da câmara, constituindo uma “ovoteca”.

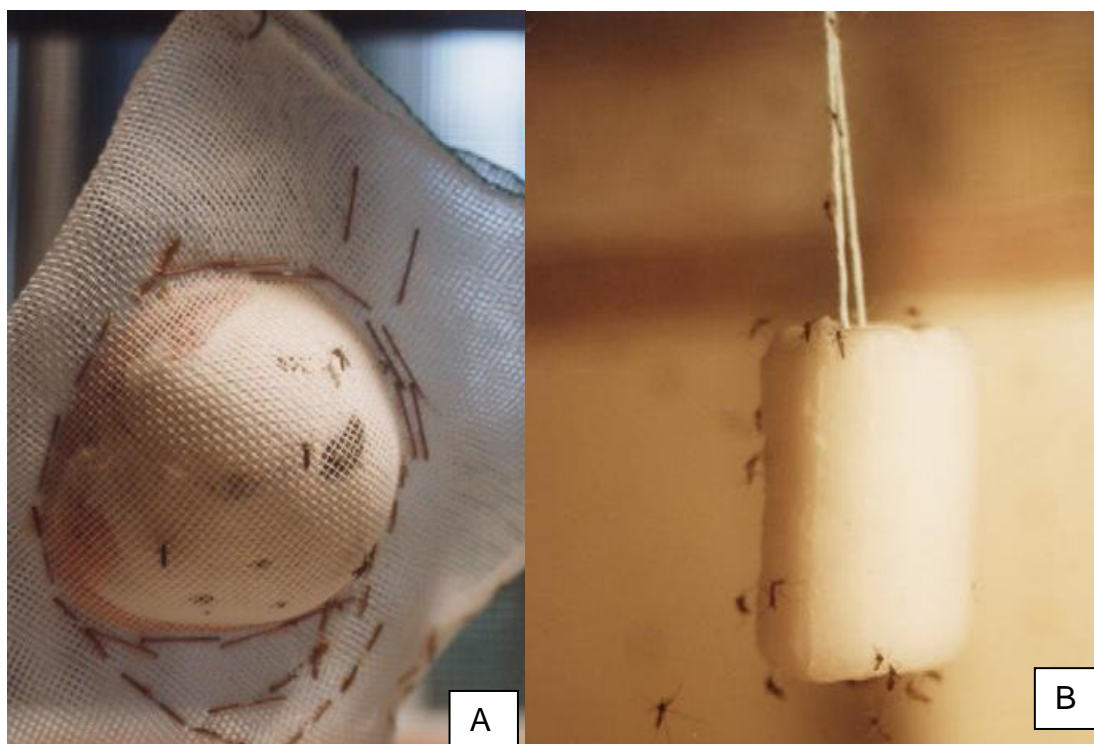


Figura 3 – A - Alimentação de fêmeas de *Aedes aegypti* em camundongos presos em tela de náilon. B – Alimentação de machos de *Aedes aegypti* em absorvente interno feminino embebido em água açucarada.



Figura 4 – A – Copo de vidro, âmbar, com papel filtro para oviposição das fêmeas de *Aedes aegypti*. B - Papel filtro com ovos de *Aedes aegypti*.

3.2. Bioensaios

Para realização dos bioensaios, foram retiradas da “ovoteca” tiras de papel com ovos, que foram colocados para incubar em bacias, contendo água da rede pública de abastecimento. Após a eclosão, as larvas foram alimentadas com ração para gatos, colocada diretamente nas bacias. Os ensaios foram realizados utilizando-se larvas de 3º estágio, por serem as mais

tolerantes em relação aos demais estádios (Silva et al. 2003).

As frações, subfrações ou substâncias puras a serem testadas foram primeiramente pesadas e pré-solubilizadas em DMSO. A quantidade de solvente utilizada para o preparo da solução foi previamente determinada por ensaios de tolerância das larvas ao solvente. Observou-se tolerância até a proporção de 0,8 mL de DMSO para 24,2 mL de água.

Para cada uma das amostras a serem testadas preparou-se uma solução-mãe, acrescentando-se água, num volume suficiente para obter as concentrações de 1000, 500 ou 100 ppm, para extrato bruto, fração e subfração/substância pura, respectivamente. A partir destas soluções, a série de diluições foi preparada para se obterem concentrações menores.

Os bioensaios foram realizados em copos de polietileno, descartáveis, com capacidade para 30 mL. Nestes, eram colocados 25 mL de cada uma das soluções, e, em seguida, 20 larvas de 3º estágio. Todos os bioensaios foram realizados em quintuplicata, em sala climatizada similarmente à câmara de criação. As leituras da mortalidade foram feitas após 24 e 48 h de exposição das larvas às soluções. Essas foram consideradas mortas quando havia ausência total de movimentos, mesmo quando expostas a um estímulo, e escurecimento do corpo e cápsula cefálica. Todos os experimentos foram acompanhados de uma série controle, contendo o mesmo número de larvas e o mesmo volume de DMSO e água destilada.

3.3. Obtenção dos extratos

3.3.1. *Magonia pubescens*

3.3.1.1. Coleta, secagem e moagem

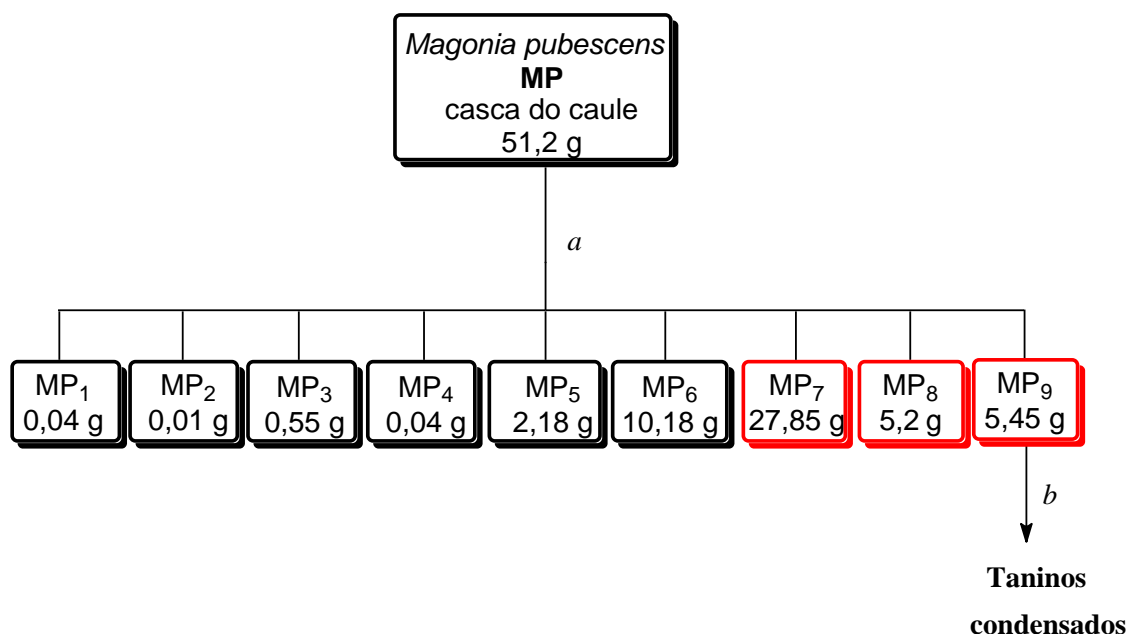
As cascas do caule de *M. pubescens* foram coletadas na região de Alto Paraíso, Goiás, no mês de novembro de 2001. Este material foi trazido ao Laboratório de Bioatividade de Plantas, IPTSP/UFG, seco em estufa de ventilação forçada a 40°C, e, em seguida, moído até baixa granulometria, em moinho de facas.

3.3.1.2. Extração

Uma amostra de 1,4 kg do pó foi submetida à percolação com etanol, por 72 h, por duas vezes consecutivas, a temperatura ambiente, e o produto foi filtrado e concentrado em evaporador rotativo, sob vácuo, obtendo-se 60,2 g de extrato bruto.

3.3.1.3. Fracionamento

Cerca de 51,2 g do extrato bruto etanólico, com aspecto de pó avermelhado, brilhante, foi submetido à CC, utilizando-se como fase estacionária a sílica gel (70-230 mesh; $\varnothing = 7,5$ cm; $a = 20$ cm), e como fase móvel os solventes *n*-hexano, diclorometano e metanol, segundo a técnica de gradiente de polaridade (Fig. 5). As amostras foram recolhidas, concentradas em rotaevaporador e secas em capela de exaustão, a temperatura ambiente. O fracionamento deu origem a nove frações, as quais foram codificadas como MP₁ a MP₉ (Fig.5) e submetidas aos ensaios larvicidas .



a) CC, sílica gel, eluentes: *n*-hexano, diclorometano, metanol, gradiente

b) RMN ¹H, EM

Figura 5 – Fracionamento do extrato bruto etanólico das cascas do caule de *Magonia pubescens*, em coluna cromatográfica, segundo a técnica de gradiente de polaridade e identificação dos constituintes químicos.

3.3.1.4. Análise das frações bioativas

Após os ensaios, as frações bioativas foram monitoradas por CCD, utilizando-se a vanilina como revelador. Além disso, essas amostras foram analisadas por RMN ^1H em um espectrômetro Bruker ARX-200, utilizando como solvente CDCl_3 ou CD_3OD , e TMS como padrão interno de referência. A análise das frações por EM foi realizada em um espectrômetro QuattroLC – Micromass, utilizando como fonte de ionização ESI/APCI nos modos negativo e positivo.

3.3.2. *Copaifera reticulata*

3.3.2.1. Coleta do óleo-resina

O óleo-resina foi coletado no município de Jacundá, PA, Brasil, no mês de outubro de 2001.

Utilizou-se para a coleta a técnica de incisão, com trado, a uma altura de 70 cm do tronco da árvore. Terminada a coleta o orifício foi vedado com argila para impedir a infestação da árvore por fungos ou cupins. O óleo foi acondicionado em frasco de cor âmbar e trazido ao laboratório, onde foi filtrado em tela de náilon de malha fina e armazenado em outros frascos similares previamente pesados.

3.3.2.2. Obtenção dos extratos hexânico e metanólico

Uma amostra de 186,56 g do óleo *in natura* de *C. reticulata* foi submetida à partição líquido-líquido, com *n*-hexano-metanol (1:1) por três vezes. Após a evaporação de cada um dos solventes, utilizando um evaporador rotacional, sob vácuo, foram obtidos 163,30 g de extrato hexânico (CRH) e 22,88 g de extrato metanólico (CRM) (Fig. 6).

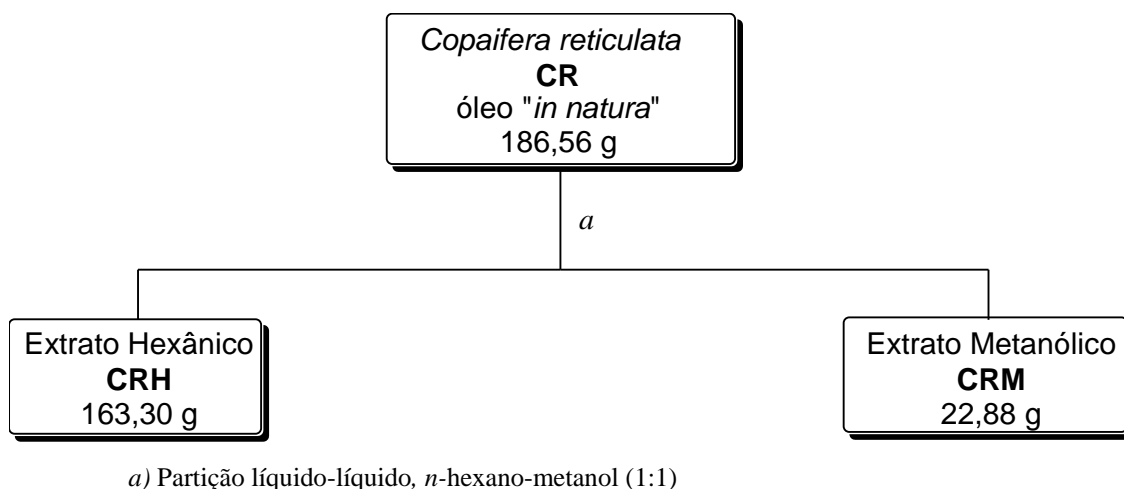


Figura 6 – Partição líquido-líquido do óleo *in natura* de *Copaifera reticulata*, com *n*-hexano:metanol (1:1).

3.3.2.3. Fracionamento do extrato hexânico guiado por bioensaios

O extrato hexânico foi submetido à CC, a vácuo, empacotada com sílica gel (70-230 mesh, Ø=7,5 cm, a= 20 cm), utilizando-se *n*-hexano, diclorometano e metanol como fase móvel. Foram obtidas 8 frações (Fig. 7) que foram analisadas quanto à atividade larvicida. As frações ativas CRH₁, CRH₄ e CRH₅ foram monitoradas por CCD, que revelou várias manchas numa mesma fração. Estas frações foram analisadas por CG/EM, que mostrou serem constituídas de substâncias de estruturas moleculares muito parecidas e de difícil separação, os monoterpenos e sesquiterpenos.

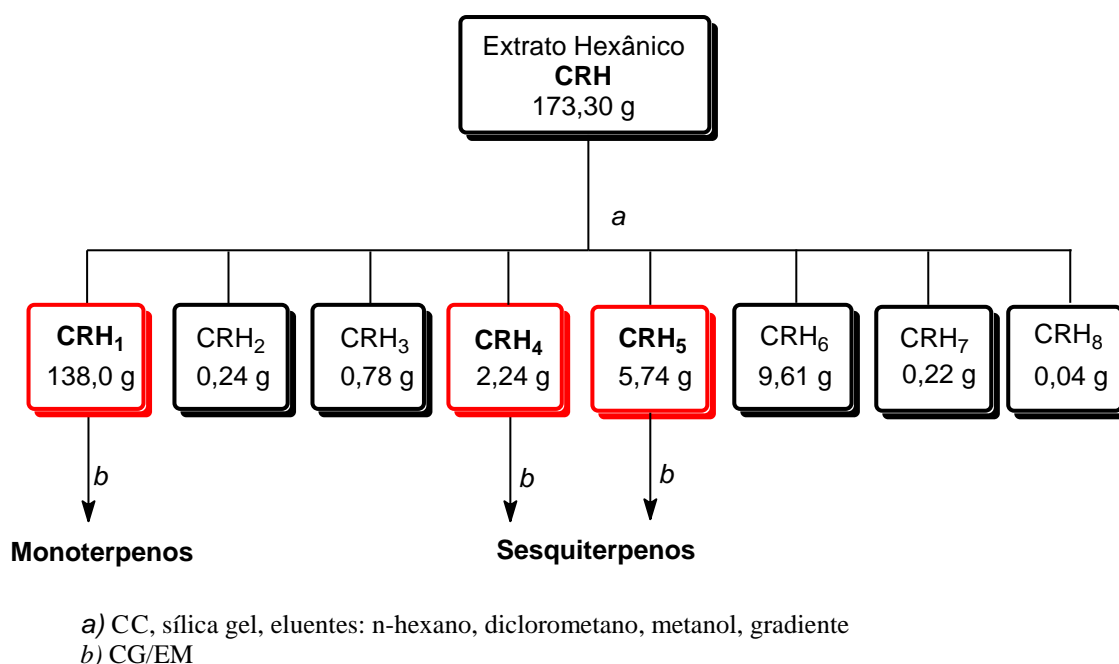
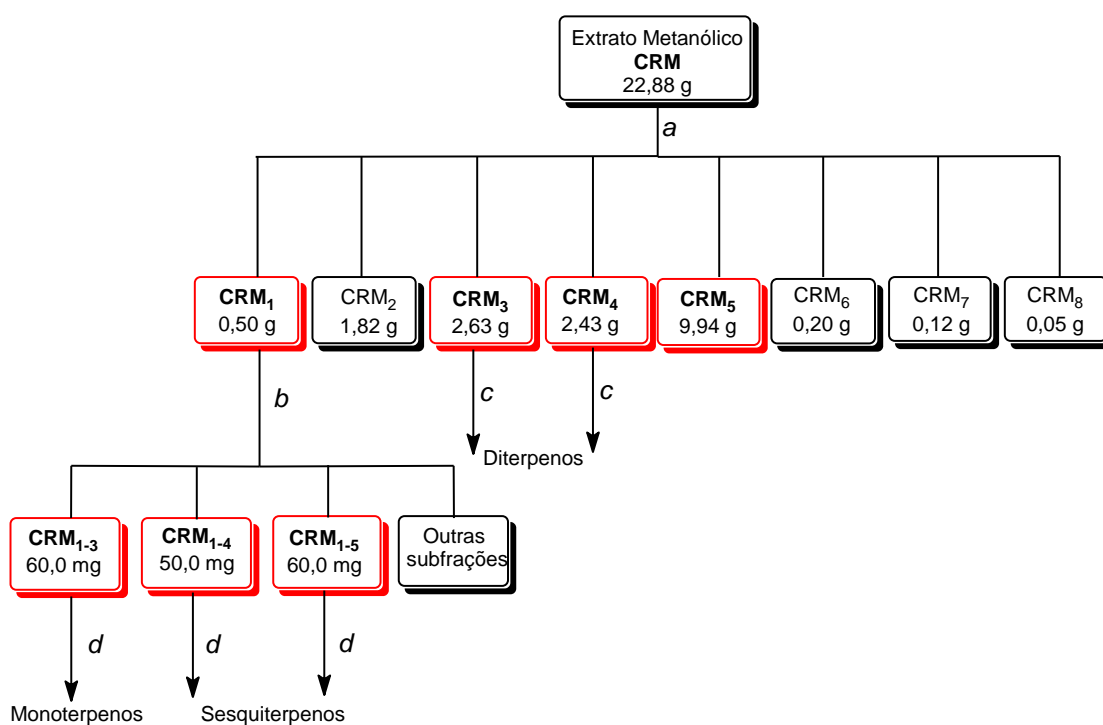


Figura 7 – Fracionamento do extrato hexânico, segundo a técnica de gradiente de polaridade, do óleo *in natura* de *Copaifera reticulata*, e identificação dos constituintes químicos.

3.3.2.4. Fracionamento do extrato metanólico guiado por bioensaios

O extrato metanólico foi cromatografado em CC, empacotada com sílica gel (70-230 mesh, Ø= 7,5 cm, a=20 cm), utilizando-se *n*-hexano, diclorometano e metanol como eluentes, seguindo a técnica de gradiente. Foram obtidas 8 frações (Fig. 8), que foram concentradas em evaporador rotacional, sob vácuo. Após serem avaliadas quanto à atividade larvicida as frações ativas foram monitoradas pela CCD usando-se a vanilina como revelador e depois analisadas por RMN ¹H.

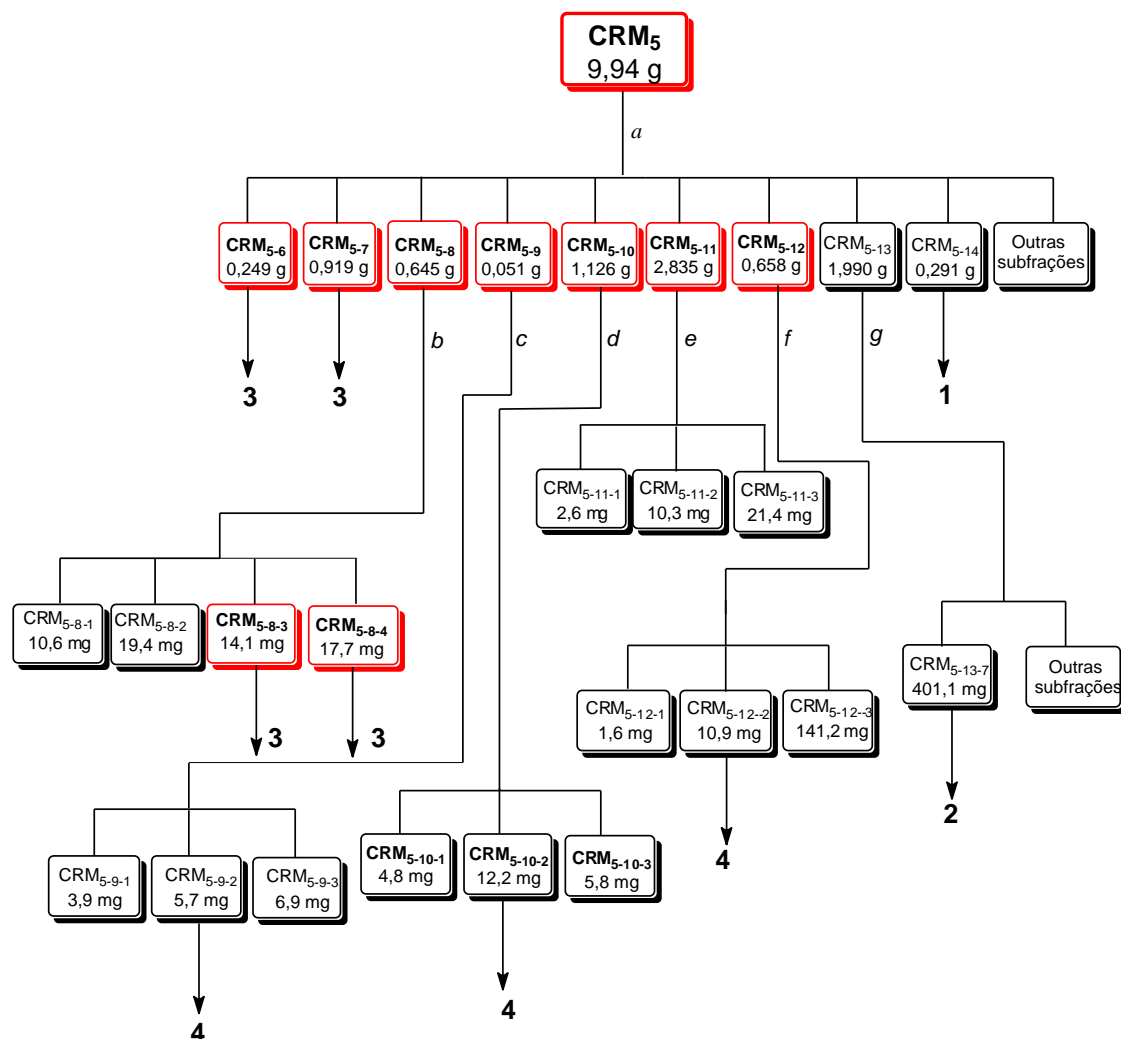
A fração CRM₁ (260,0 mg), eluída com *n*-hexano, apresentou a melhor atividade larvicida e foi recromatografada em CC de sílica flash (230-400 mesh), usando *n*-hexano, acetato de etila e metanol, como fase móvel, em gradiente de polaridade. Foram obtidas 86 subfrações que foram monitoradas por CCD e as que se mostraram semelhantes foram agrupadas, totalizando 9 subfrações, que foram submetidas aos bioensaios. As mais ativas, CRM₁₋₃, CRM₁₋₄ e CRM₁₋₅, foram analisadas por RMN ¹H, que revelou a presença majoritária de monoterpenos e sesquiterpenos (Fig. 8).



- a) CC, sílica comum, eluentes: hexano, diclorometano e metanol, gradiente
 b) CC, sílica flash; eluentes: hexano, acetato de etila, metanol, gradiente
 c) CCD e RMN ¹H
 d) CCD e RMN ¹H

Figura 8 – Fracionamento do extrato metanólico do óleo *in natura* de *Copaifera reticulata*, segundo a técnica de gradiente de polaridade, e identificação dos constituintes químicos.

A fração CRM₅ (994,0 mg) eluída da coluna com diclorometano:metanol (9:1), apresentou atividade larvicida e foi também recromatografada em CC de sílica flash (230-400 mesh), com *n*-hexano, acetato de etila e metanol como fase móvel, em gradiente de polaridade (Fig. 9). Este procedimento resultou em 78 subfrações que foram monitoradas por CCD, sendo que as semelhantes foram agrupadas, finalizando 18 subfrações. Destas, as subfrações CRM₅₋₆, CRM₅₋₇, CRM₅₋₈, CRM₅₋₉, CRM₅₋₁₀, CRM₅₋₁₁ e CRM₅₋₁₂ apresentaram atividade larvicida e foram analisadas por CCD. Após análise do perfil cromatográfico em CCD (Fig.10), a subfração CRM₅₋₇ foi analisada por RMN ¹H e ¹³C, sendo identificado um diterpeno labdano. As subfrações ativas CRM₅₋₈ a CRM₅₋₁₂ foram recromatografadas por CCDP e as subfrações originadas de cada uma delas foram também submetidas aos bioensaios.



a) - CC, sílica flash; eluentes: hexano, acetato de etila, metanol, gradiente
 b) - CCDP, hexano:acetato de etila
 c) - CCDP, hexano:acetato de etila

d) -CCDP, hexano:acetato de etila
 e)- CCDP, hexano:acetato de etila

f) - CCDP, hexano:acetato
 g)- CC, hexano, acetato, metanol

1,2,3 e 4 - diterpenos

Figura 9 – Refracionamento da subfração metanólica CRM₅ de *Copaifera reticulata*, segundo a técnica de gradiente de polaridade, e identificação dos constituintes químicos.

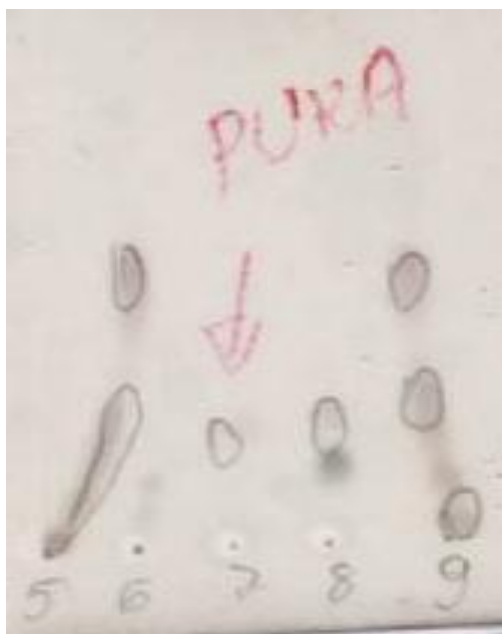


Figura 10 – Perfil cromatográfico da subfração CRM₅₋₇ em cromatografia em camada delgada, sugestivo de substância pura.

3.4. Análise Estatística

Os dados obtidos da mortalidade x concentração (ppm) foram analisados pelo programa SAEG (Sistema de Análises Estatísticas), em gráfico de Probit, para determinar as concentrações letais (CL₅₀ e 90) e os respectivos intervalos de confiança (IC).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados deste trabalho são apresentados nos artigos 1, 2 e 3.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Basile AC, Sertie JAA, Freitas PCD, Zanini AC 1988. Anti-inflammatory activity of oleoresin from Brazilian *Copaifera*. *J Ethnopharmacol* 22: 101-109.
- Braga IA, Lima JBP, Soares SS, Valle D 2004. *Aedes aegypti* resistance to temephos during 2001 in several municipalities in the states of Rio de Janeiro, Sergipe and Alagoas, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99: 99-203.
- Brás-Filho R 1994. Química de produtos naturais: Importância, Interdisciplinaridade, Dificuldades e Perspectivas. A peregrinação de um pacatubano. *Quím Nova* 17 (5): 405-445.
- Brooks GD, Schoofh F, Smith EA 1996. Evaluation of five formulations of Abate against *Aedes aegypti*, Savannah, Georgia. *Mosq News* 26: 580-582.
- Carson R. *Silent Spring* 1962. Fawcett Publications, Inc., Greenwich, Conn.304 pp.
- Carvalho LAF & Silva IG 1999. Atividade larvicida do temephos a 1% sobre o *Aedes aegypti* (Lin.,1762) em diferentes criadouros artificiais. *Rev Patol Trop* 28: 211-232.
- Carvalho AFU, Melo VMM, Craveiro AA, Machado MIL, Bantim MB, Rabelo EF 2003. Larvicidal activity of the essential oil from *Lippia sidoides* cham. against *Aedes aegypti* Linn. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98: 569-571.
- Cascón V & Gilbert B 2000. Characterization of the chemical composition of oleoresins of *Copaifera guianensis* Desf., *Copaifera duckei* Dwyer and *Copaifera multijuga* Hayne. *Phytochemistry* 55: 773-778.
- Cechinel Filho V & Yunes RA 1998. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. *Quím Nova* 21: 99-

105.

- Chippaux JP & Coustard JM 1992. Sensitivity and accuracy of a bio-assay for the determination of the concentration of residual pesticide in natural water bodies. *Acta Trop* 50: 267-270.
- Cordellier R 1991. The epidemiology of yellow fever in Western Africa. *Bull World Health Organ* 69: 73-84.
- Corrêa MP 1984. *Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas*, Vol. V, Ministério da Agricultura; Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, Brasília, 687 pp.
- Di Stasi LC 1996. *Plantas Mediciniais: arte e ciência. Um guia de estudo interdisciplinar*. São Paulo, Editora da Universidade Estadual Paulista. 230 pp.
- Failloux AB, Ung A, Raymond M, Pasteur N 1994. Insecticide susceptibility in mosquitoes (Diptera: Culicidae) from French Polynesia. *J Med Entomol* 31: 639-644.
- Falkenberg MB, Santos RI, Simões CMO 1999. Introdução à análise fitoquímica. In: *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5° ed., Ed. UFRGS, p.229-245.
- Guimarães VP, Silva IG, Silva HHG, Rocha C 2001. Atividade larvicida do extrato bruto etanólico de *Magonia pubescens* St. Hil. sobre *Aedes albopictus* (Skuse, 1894) (Diptera, Culicidae). *Rev Patol Trop* 34: 159-165.
- Harbone JB & Tomas-Barberan FA 1991. *Ecological chemistry and biochemistry of plant terpenoids*. 1st ed. Oxford, Clarendon Press.
- Laboriau MLS 1973. A semente de *Magonia pubescens* St. Hil. - Morfologia e germinação. *An Acad Bras Ciênc* 45: 501-536.

- Lima JB, Da-Cunha MP, Da Silva RC, Galardo AK, Soares SS, Braga IA, Ramos RP, Valle D 2003. Resistance of *Aedes aegypti* to organophosphates in several municipalities in the State of Rio de Janeiro and Espirito Santo, Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 68: 329-333.
- Lorenzi H 1992. *Árvores Brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. Plantarum, Nova Odessa, SP.
- Maciel MAM, Pinto AC, Veiga Jr VF, Grynberg NF, Echevarria A 2002. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Quím Nova* 25: 429-438.
- Macoris ML, Andrighetti MTM, Takaku L, Glasser CM, Garbeloto VC, Bracco JE 2003. Resistance of *Aedes aegypti* from the state of São Paulo, Brazil, to organophosphates insecticides. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98: 703-708.
- Mann J 1987. *Secondary metabolism*. 2° ed. Oxford: Clarendon Press. 312 pp.
- Matos FJA 1997. *Introdução à Fitoquímica Experimental*. Edições UFC, Fortaleza, CE, 43 pp.
- Mazzarri MB & Georghiou GP 1995. Characterization of resistance to organophosphate, carbamate and pyrethroid insecticides in field populations of *Aedes aegypti* from Venezuela. *J Am Mosq Control Assoc* 11: 315-322.
- Meltzer MI, Rigau-Perez JG, Clark GG 1998. Using disability-adjusted life years to assess the economic impact of dengue in Puerto Rico:1984-1994. *Am J Trop Med Hyg* 59: 265-271.
- MS - Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária, 1996. Portaria n° 106 de 24 de junho, Brasília, Df.
- MS - Ministério da Saúde. Boletim Eletrônico Epidemiológico, 2001. Dengue:

Situação epidemiológica, riscos e medidas de controle. www.funasa.gov.br .

OMS - Organização Mundial de Saúde 1987. Dengue hemorrágico: diagnóstico, tratamento e controle. Genebra. 79 pp.

Paiva LA, Alencar-Cunha KM, Santos FA, Gramosa NV, Silveira ER, Rao VS 2002. Investigation on the wound healing activity of oleo-resin from *Copaifera langsdorffii* in rats. *Phytother Res* 16: 737-739.

Park IK, Lee SG, Shin SC, Park JD, Ahn YJ 2002. Larvicidal activity of isobutylamides identified in *Piper nigrum* fruits against three mosquito species. *J Agric Food Chem* 50: 1866-1870.

Pinheiro FP & Corber SJ 1997. Global situation of dengue and dengue haemorrhagic and its emergence in the Americas. *World Health Stat Q* 50: 161-169.

Pinto AC, Silva DHS, Bolzani VS 2002. Produtos naturais: Atualidades, desafios e perspectivas. *Quím Nova* 25: 45-61.

Rosen L 1981. Transovarial transmission of arboviruses by mosquitoes. *Med Trop Mars* 41: 23-29.

Rosen L, Shroyer DA, Tesh RB, Freier JE, Lien JC 1983. Transovarial transmission of dengue viruses by mosquitoes: *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. *Am J Trop Med Hyg* 32: 1108-1119.

Salvador V 1975. *História do Brasil: 1500-1627*, 6 ed; Melhoramentos São Paulo, p. 65.

Santos RI 1999. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5° ed., Ed. UFRGS, p.403-434.

- Santos RMG 2003. *Metabolismo secundário dos fungos Penicillium sp e Fusarium moniliforme isolados como endofíticos de Melia azedarach (Meliaceae)*. Tese de doutorado. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 480 pp.
- Schofield CJ, Hemingway J, Balderrama S 1984. Insecticide resistance in Bolivian *Aedes aegypti*. *Bol Cient CENETROP* 10: 22-28.
- Siddiqui BS, Afshan F, Ghiasuddin SF, Navqi SNH, Tariq RM 2000. Two insecticidal tetranortriterpenoids from *Azadirachta indica*. *Phytochemistry* 53: 371-376.
- Siddiqui BS, Gluzar T, Begun S, Afshan F 2004. Piptigrine, a new insecticidal amide from *Piper nigrum* Linn. *Nat Prod Res* 18: 473-474.
- Silva HHG, Silva IG, Lira KS 1998. Metodologia de criação, manutenção de adultos e estocagem de ovos de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) em laboratório. *Rev Patol Trop* 27: 51-63.
- Silva IG, Guimarães VP, Lima CG, Silva HHG, Elias CN, Mady CM, Silva VVM, Nery AP, Rocha KR, Rocha C, Isac E 2003. Efeito larvicida e toxicológico do extrato bruto etanólico da casca do caule de *Magonia pubescens* sobre o *Aedes aegypti* em criadouros artificiais. *Rev Patol Trop* 32: 73-86.
- Silva IG, Santos AH, Ferri PH, Alves RBN, Melo RL, Peixoto L, Silva HHG, Elias CN, Isac E, Lira KS, Camargo MF 1996. Atividade larvicida do extrato bruto etanólico de *Magonia pubescens* St.Hil. (tingui-do-cerrado) sobre o *Aedes aegypti* (Lin.) em laboratório. *Rev Patol Trop* 25: 51-59.
- Simas NK, Lima EC, Conceição SR, Kuster RM, Oliveira Filho AM 2004. Produtos naturais para o controle da transmissão da dengue - Atividade larvicida de *Myroxylon balsamum* (óleo vermelho) e de terpenóides e fenilpropanóides. *Quím Nova* 27: 46-49.

- Simões CMO & Spitzer V 1999. Óleos voláteis. In: *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5° ed., Ed. UFRGS, p. 467-495.
- Tauil PL 2002. Aspectos críticos no controle do dengue no Brasil. *Cad Saúde Pública* 18: 867-871.
- Vasconcelos AFF & Godinho OES 2002. Uso de métodos analíticos convencionados no estudo da autenticidade do óleo de copaíba. *Quím Nova* 25: 1057-1060.
- Veiga Jr V, Patitucci ML, Pinto AC 1997. Controle de autenticidade de óleos de copaíba comerciais por cromatografia gasosa de alta resolução. *Quím Nova* 20: 612-615.
- Viegas Jr C 2003. Terpenes with insecticidal activity: an alternative to chemical control of insects. *Quím Nova* 26: 390-400.
- Vieira PC & Andrei CC 1997. Inseticidas de origem vegetal. In: *Produtos naturais ativos em insetos: isolamento, Identificação, purificação e síntese*. Ed UFSCar, p.135-159.
- WHO - 2002. Dengue/Dengue Hemorrhagic Fever Prevention and Control. New Delhi, WHO Regional Office for South-East Asia; 33p.
- Wittaker RH & Feeny PP 1971. Allelochemicals: Chemical interactions between species. *Science* 171: 757- 763.

ARTIGO 1 – Publicado na Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical

Atividade larvicida de taninos isolados de *Magonia pubescens* St. Hil.
(Sapindaceae) sobre *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae)

Rev. Soc. Bras. Med. Trop. v.37 n.5 Uberaba set./out. 2004

Heloísa Helena Garcia da Silva^I; Ionizete Garcia da Silva^I; Regina Maria Geris dos Santos^{II}; Edson Rodrigues Filho^{II}; Carmeci Natalina Elias^I

^ILaboratório de Biologia e Fisiologia de Insetos e Xenodiagnóstico do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO
^{II}Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP

[Endereço para correspondência](#)

versão On-line ISSN 1678-9849

RESUMO

Apresenta-se, pela primeira vez, o estudo fitoquímico das frações larvicidas, isoladas da *Magonia pubescens*, monitorado pelo estudo de eficácia sobre larvas de 3º estágio de *Aedes aegypti*, na busca de alternativas para o controle desse mosquito e obtenção de estruturas químicas passíveis de aprimoramento da atividade pela via sintética de outros derivados. As frações bioativas foram monitoradas quimicamente através de cromatografia de camada delgada, utilizando como revelador uma solução ácida de vanilina, e analisadas por ressonância magnética nuclear de hidrogênio e espectrometria de massas. Os bioensaios com as frações foram realizados em quintuplicata, à temperatura de 28±1°C, 80±5% de umidade relativa e fotofase de 12 horas. As concentrações letais encontradas da fração MP-9, que apresentou o maior potencial larvicida, CL₅₀ e CL₉₀, foram de 3,1 e 36,6ppm, respectivamente. Todos os experimentos foram acompanhados por uma série controle, contendo o mesmo número de larvas.

Palavras-chaves: Taninos. Larvicida. *Magonia pubescens*. *Aedes aegypti*

ABSTRACT

Phytochemical study of the larvicidal fractions which were carried out for the first time, isolated of the *Magonia pubescens*, monitored by the study of efficacy against the 3rd larval instar of *Aedes aegypti*, in the search of alternatives for the control of that mosquito and to obtain structures susceptible to chemical improving of the activity for the synthetic via of other deriveds. The fractions with biological activity were monitored chemically through chromatography of thin layer, using as revealing a solution acid of vanillin, analyzed by nuclear magnetic resonance of hydrogen and spectrometry of masses. The bioassays with the fractions were accomplished with five replications, controlled at the temperature of 28±1°C, 80±5% of relative humidity and 12 h light. The found lethal concentrations of the fraction that it presented the largest potential larvicidal, MP-9, LC₅₀ and LC₉₀, were of 3,1 and 36,6ppm, respectively. All the experiments were accompanied by a control series, containing the same number of larvae.

Key-words: Tannins. Larvicidal. *Magonia pubescens*. *Aedes aegypti*.

Aedes aegypti (Lin,1762) é atualmente o mosquito que apresenta a maior dispersão em áreas urbanas no mundo. A importância médica dessa espécie está na sua capacidade vetorial dos quatro sorotipos do vírus da dengue e do vírus amarelo. As altas densidades estão relacionadas ao comportamento sinantrópico e ao hábito antropofílico dessa espécie. Além disso, sua atividade hematofágica diurna e a complexidade dos centros urbanos têm maximizado os problemas do combate por aplicações espaciais de inseticidas²⁷. Contudo, a perspectiva de controle desse vetor, na atualidade, esbarra na sua grande capacidade adaptativa a condições adversas, como o desenvolvimento em águas poluídas²⁶, e a quiescência dos ovos em ambientes inóspitos²⁴.

Uma das estratégias para combater a dengue é a eliminação do vetor através de produtos inseticidas. Como consequência do uso continuado desses produtos surgiram as populações resistentes^{3 13} de *A. aegypti*. Além disso, efeitos indesejáveis desses inseticidas como a permanência por longos períodos de tempo no meio ambiente, afetando os ecossistemas, estimularam a pesquisa de produtos naturais. Alguns estudos apontam compostos de origem botânica com atividade larvicida e potencial para uso no controle^{5 7 10 15 16 19 23 28 29 33} de vetores.

A *Magonia pubescens* St. Hil. (Sapindaceae) é uma planta característica do Cerrado brasileiro^{11 12}, apresenta grande densidade em áreas de terreno fraco e tem sido aproveitada na construção civil.

Estudos anteriores com extratos brutos etanólicos da *M. pubescens* mostraram atividade larvicida para *A. aegypti* e *A. albopictus*. Mesmo sabendo que as plantas constituem uma fonte incomparável de compostos químicos inovadores, trabalhos envolvendo atividade biológica ou toxicológica de princípios ativos puros^{18 23 33} são em números inexpressivos, sendo a maioria das publicações referentes à atividade de extratos brutos^{7 9 10 28 29 32} ou frações^{6 15 28 31}. Na bibliografia pertinente, não foram encontrados registros envolvendo os estudos sobre os componentes químicos da *M. pubescens*. Como existe atualmente uma exigência de que produtos de origem natural sejam quimicamente estudados⁴, para evidenciar sua eficácia e segurança de seu uso, este trabalho apresenta pela primeira vez, o estudo fitoquímico da *M. pubescens*, monitorado pelo estudo de eficácia sobre larvas de *A. aegypti*, na busca de alternativas para o controle desse mosquito e obtenção de estruturas químicas passíveis de aprimoramento da atividade pela via sintética de outros derivados.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal. As cascas do caule de *M. pubescens* foram coletadas na região de Alto Paraíso – Chapada dos Veadeiros – Goiás, no mês de novembro de 2001, e trazidas ao Laboratório de Bioatividade de Plantas, IPTSP/UFG.

Extração e fracionamento. As cascas foram secas em estufa de ventilação forçada, a 40°C, e moídas até baixa granulometria. Em seguida, 1,4kg do pó foi extraído por percolação com etanol (72 horas), por duas vezes consecutivas, à temperatura ambiente, e o extrato bruto foi filtrado e concentrado em evaporador rotativo (60,2g). Após os resultados de atividade larvicida do extrato bruto etanólico (e.b.e.)^{28 30}, sobre *A. aegypti*, cerca de 51,2g deste material foi submetido à cromatografia em coluna utilizando como fase móvel os solventes *n*-hexano, diclorometano e metanol, seguindo a técnica de gradiente de polaridade. Foram obtidas nove frações, as quais foram codificadas como MP-1 a MP-9.

Bioensaios. Para a detecção da atividade larvicida nas frações foram utilizadas larvas de 3º estágio de *A. aegypti*, criadas de acordo com metodologia já definida²⁵. Uma solução-mãe foi preparada com uma determinada quantidade da fração de interesse, pré-solubilizada em dimetilsulfóxido (DMSO) e dissolvida em água, numa quantidade suficiente para obter a concentração de 1000ppm. A partir desta solução, a série de diluições foi preparada para obter soluções de concentrações desejadas. Em 25mL de cada uma dessas soluções foram adicionadas 20 larvas. Os bioensaios foram realizados em quintuplicata, a 28±1°C, 80±5% de umidade relativa e fotofase de 12h. Todos os experimentos foram acompanhados de uma série controle, contendo o mesmo número de larvas em DMSO e água destilada. Os dados obtidos da mortalidade x concentração (ppm) foram analisados pelo programa SAEG (Sistema de Análises estatísticas), em gráfico de Probit, para determinar as concentrações letais (CL₅₀ e ₉₀) e os respectivos intervalos de confiança.

Análise das frações bioativas. As frações bioativas foram monitoradas quimicamente através de cromatografia de camada delgada (CCD), utilizando como revelador uma solução ácida de vanilina. Além disso, essas amostras foram analisadas por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹H) em um espectrômetro Bruker ARX-200, utilizando como solvente clorofórmio deuterado (CDCl₃) ou metanol deuterado (CD₃OD), e tetrametilsilano (TMS) como padrão interno de referência. A análise das frações por espectrometria de massas foi realizada em um espectrômetro QuattroLC – Micromass, utilizando como fonte de ionização ESI/APCI nos modos negativo e positivo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das nove frações obtidas a partir do e.b.e. da *M. pubescens* apenas as frações MP-7, MP-8 e MP-9 apresentaram atividade tóxica sobre larvas de 3º estágio de *A. aegypti* (Tabela 1). Com a partição dos extratos e separação cromatográfica foi possível obter concentrações letais extremamente baixas em relação aos estudos anteriormente feitos com o e.b.e.²⁸. Contudo, este apresentou a vantagem de ser hidrossolúvel, simplificando o preparo da solução para uso.

Tabela 1 - Atividade larvicida das frações ativas de Magonia pubescens sobre larvas de terceiro estágio de Aedes aegypti.

Frações	CL ₅₀ (IC 95%) ppm	CL ₉₀ (IC 95%) ppm
MP ₇	67,1 (60,9 - 71,1)	95,5 (90,7 - 104,1)
MP ₈	39,7 (22,5 - 26,4)	380,7 (250,6 - 477,3)
MP ₉	3,1 (0,08 - 6,79)	36,6 (25,9 - 89,1)

IC 95% - Intervalo de confiança a 95% de probabilidade.

Obs.: não houve morte no grupo controle

Estudos que já evidenciaram potencialidade de uso de frações botânicas para o controle de *A. aegypti*, apontam CL₅₀ variando de 0,1 a 49ppm^{16 23 31 33}, o que permite considerar que a MP-9 apresentou resultado coerente com a literatura.

As análises por CCD das frações MP-7 (diclorometano:metanol, 6:4), MP-8 (diclorometano:metanol, 4:6) e MP-9 (metanol) revelaram manchas avermelhadas após revelação com a vanilina, sugerindo a presença de derivados fenólicos, mais precisamente, taninos. A formação de coloração vermelha, resultante da complexação do agente revelador vanilina com os taninos, é um método fácil e rápido para diagnosticar a presença dessas substâncias em extratos e frações, embora ainda não conclusivo para a identificação da classe a qual os taninos pertencem²².

Adicionalmente, essas frações também foram submetidas a análises de prospecção para definir a classe de taninos¹⁴ presentes, utilizando-se a solução de cloreto férrico. Na presença dessa solução, os taninos hidrolisáveis produzem uma forte coloração azul, enquanto que os taninos condensados ou catéquicos exibem uma forte coloração verde³⁴. Nossos testes químicos indicaram a presença de taninos catéquicos na fração MP-9. Os dados de RMN para essa fração corroboraram os testes químicos. Os espectros de RMN ¹H para MP-9 contêm vários multipletos com deslocamentos químicos para hidrogênios aromáticos entre 6,00 e 8,00ppm, os quais caracterizam os grupos catequinas nestes taninos. Neste mesmo espectro foram também observados sinais para uma série de hidrogênios carbinólicos (δ

3,00 a 4,50) correspondendo a hidrogênios H-2 e H-3, bem como a hidrogênios de unidades de carboidratos indicando que parte das catequinas podem estar ocorrendo na forma de glicosídeos. Os espectros de massas obtidos por electrospray nos modos positivos e negativos, mostraram que a fração MP-9 é composta de uma mistura bastante complexa de substâncias. No entanto, uma das substâncias apresentou $[M+H]^+$ a m/z 865 e $[M-H]^-$ a m/z 863. Assim, a partir das análises por espectrometria de massas, uma das substâncias pode ser identificada como uma proantocianidina na forma trimérica (massa molecular = 864Da). A estrutura molecular para essa substância, que foi a fração mais promissora da *M. pubescens*, é mostrada na [Figura 1](#).

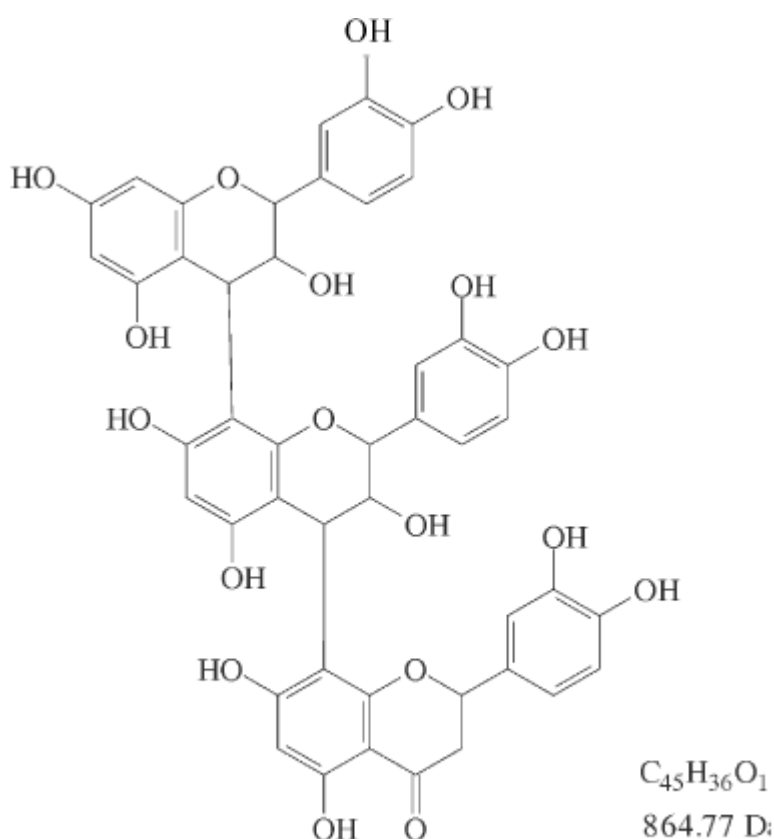


Figura 1 - Estrutura molecular do tanino catéuico identificado na fração larvívica MP-9, obtida de Magonia pubescens.

As proantocianidinas são largamente distribuídas na natureza, em plantas altas, particularmente coníferas, e são também encontradas em muitos produtos alimentícios⁸ como chás, cacau e sorgo.

Taninos são substâncias fenólicas, solúveis em água, com massa molecular entre 500 e 3000Da. Muitas vezes, são os princípios ativos de plantas empregadas na medicina tradicional para o tratamento de diversas moléstias orgânicas, por apresentarem atividades biológicas como a ação bactericida²¹, fungicida, moluscicida e inibição enzimática³⁴. Os taninos condensados são oligômeros e polímeros formados pela policondensação de duas ou mais unidades flavanoídicas e possuem grande importância biológica por suas fortes interações com íons metálicos e macromoléculas como os polissacarídeos, além de apresentar a habilidade para formar complexos solúveis³⁴ com alcalóides, gelatinas e diversas proteínas. Essa habilidade que os taninos exibem para interagir com proteínas torna essa classe de substâncias bastante tóxica³⁴ a insetos, fungos e bactérias. Estudos realizados²⁰ através de cortes histológicos, mostraram o efeito tóxico do ácido tânico, um tanino natural hidrolisável, sobre o epitélio do intestino médio de larvas de dípteros. Outros autores¹⁷, após avaliarem os efeitos tóxicos de taninos sobre a fauna associada aos culicíneos, sugeriram que os taninos vegetais podem ser úteis como complemento em programas de controle de espécies de mosquitos associados à atividade humana. Mais especificamente sobre a *M. pubescens* e anteriores à partição, fracionamento e identificação do tanino catéquico, estudos^{1 2 28} foram realizados com o extrato, evidenciando os mecanismos de ação e as alterações morfológicas que provocaram as mortes nas larvas de *A. aegypti*, sendo similares àquelas registradas pelo ácido tânico²⁸. Além disso, estudos toxicológicos²⁸ do e.b.e. realizados em coelhos, ratos e cobaios mostraram-se atóxicos de acordo com as normas para produtos vegetais. Testes de campo evidenciaram sua degradação e atoxicidade a partir da quarta semana²⁸. Mesmo com essas informações favoráveis, estudos toxicológicos adicionais com o tanino catéquico serão feitos para avaliar seu impacto, principalmente em espécies não alvo, e de formulações que dêem estabilidade e praticidade no uso desse fitoinseticida potencial.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Arruda W, Oliveira GMC, Silva IG. Alterações morfológicas observadas em larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) submetidas à ação do extrato bruto etanólico da casca do caule da *Magonia pubescens*. Entomologia y Vectores 10:47-60, 2003a. [[Links](#)]
2. Arruda W, Oliveira GMC, Silva IG. Toxicidade do extrato etanólico de *Magonia pubescens* sobre larvas de *Aedes aegypti*. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 36:17-25, 2003b. [[Links](#)]

3. Carvalho LAF, Silva IG. Avaliação longitudinal da atividade do temephós a 1% sobre o *Aedes aegypti* (Lin,1762). *Entomologia y Vectores* 7:191-201, 2000. [[Links](#)]
4. Cascón V, Gilbert B. Characterization of the chemical composition of oleoresins of *Copaifera guianensis* Desf., *Copaifera duckei* Dwyer and *Copaifera multijuga* Hayne. *Phytochemistry* 55: 773-778, 2000. [[Links](#)]
5. Choochote W, Kananapothi D, Panthong A, Taesotikul T, Jitpadi A, Chaithong U, Pitasawat B. Larvicidal, adulticidal and repellents effects of *Kaempferia galanga*. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine Public Health* 30:470-476, 1999. [[Links](#)]
6. Ciccía G, Coussio J, Mongelli E. Insecticidal activity against *Aedes aegypti* larvae of some medicinal South American plants. *Journal Ethnopharmacology* 72:185-189, 2000. [[Links](#)]
7. Consoli RAGB, Mendes NM, Pereira JP, Santos BS, Lamounier MLA. Influência de diversos derivados de vegetais na sobrevida das larvas de *Aedes fluviatillis* em laboratório. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 83:87-93,1988. [[Links](#)]
8. De Bruyne T, Pieters L, Deelstra H, Vlietinck A. Condensed vegetable tannins: Biodiversity in structure and biological activities. *Biochemical Systematics and Ecology* 27:445-449, 1999. [[Links](#)]
9. Dharmashktu NS, Prabhakaran PK, Menon PK. Laboratory study on the mosquito larvicidal properties of leaf and seed extract of the plant *Agave americana*. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 90:79-82,1987. [[Links](#)]
10. Guimarães VP, Silva IG, Silva HHG, Rocha C. Atividade larvicida do extrato bruto etanólico de *Magonia pubescens* St. Hil. sobre *Aedes albopictus* (Skuse,1894) (Diptera, Culicidae). *Revista de Patologia Tropical* 34:159-165, 2001. [[Links](#)]
11. Lorenzi H. Árvores Brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. *Plantarum, Nova Odessa, SP*, 1992. [[Links](#)]
12. Laboriau MLS. A semente de *Magonia pubescens* St. Hil. - Morfologia e germinação. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 45: 501-536, 1973. [[Links](#)]
13. Macoris MLG, Camargo MF, Silva IG, Takaku L, Andrighetti MT. Modificação da suscetibilidade de *Aedes aegypti* ao Temephós. *Revista de Patologia Tropical* 24:31-40, 1995. [[Links](#)]
14. Matos FJA. Introdução à Fitoquímica Experimental. Edições da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, p.43, 1997. [[Links](#)]
15. Monzon RB, Alviór JP, Luczon LL, Morales AS, Mutuc FE. Larvicidal potential of five Philippine plants against *Aedes aegypti* (Linnaeus) and *Culex quinquefasciatus* (Say). *Southeast Asian Journal Tropical Medicine Public Health* 25:755-759,1994. [[Links](#)]
16. Park IK, Lee SG, Shin SC, Park JD, Ahn YJ. Larvicidal activity of isobutylamides identified in *Piper nigrum* fruits against three mosquito species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50:1866-1870, 2002. [[Links](#)]

17. Pautou MP, Rey D, David JP, Meyran JC. Toxicity of vegetable tannins on crustacea associated with Alpine mosquito breeding sites. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 47:323-332, 2000. [[Links](#)]
18. Pinto AC, Silva DHS, Bolzani VS, Lopes NP, Epifanio RA. Produtos naturais: atualidades, desafios e perspectivas. *Química Nova* 25:45-61, 2002. [[Links](#)]
19. Pizarro AP, Oliveira-Filho AM, Parente JP, Melo MT, Santos CE, Lima PR. Aproveitamento do resíduo da indústria do sisal no controle de larvas de mosquitos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 32:23-29, 1999. [[Links](#)]
20. Rey D, Pautou MP, Meyran JC. Histopathological effects of tannic acid on the midgut epithelium of some aquatic diptera larvae. *Journal of Invertebrate Pathology* 73:173-181, 1999. [[Links](#)]
21. Scalbert A. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry* 30: 3875-3883, 1991. [[Links](#)]
22. Schofield P, Mbugua DM, Pell NA. Analysis of condensed tannins: a review. *Animal Feed Science and Technology* 91:21-40, 2001. [[Links](#)]
23. Siddiqui BS, Asfhan F, Ghiasuddin FS, Navqi SN, Tariq RM. Two inseticidal tetranortriterpenoids from *Azadirachta indica*. *Phytochemistry* 53:371-376, 2000. [[Links](#)]
24. Silva HHG, Silva IG. Influência do período de quiescência dos ovos sobre o ciclo evolutivo de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae) em condições de laboratório. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 32:349-355, 1999. [[Links](#)]
25. Silva HHG, Silva IG, Lira KS. Metodologia de criação, manutenção de adultos e estocagem de ovos de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) em laboratório. *Revista de Patologia Tropical* 27:51-63, 1998. [[Links](#)]
26. Silva HHG, Silva IG, Oliveira CLNS, Elias CN. Adaptação do *Aedes aegypti* (Linnaeus,1762) em criadouros artificiais com água poluída. *Entomologia y Vectores* 6:383-391, 1999. [[Links](#)]
27. Silva HHG, Silva IG, Souza SS, Guimarães VP, Elias CN, Pimenta JF. Estudo comparativo de eficiência das técnicas de ultra baixo volume (UBV) e termonebulização (FOG) no controle de *Aedes aegypti*. *Informe Epidemiológico do Sistema Único de Saúde* 10:45-46, 2001. [[Links](#)]
28. Silva IG, Guimarães VP, Lima CG, Silva HHG, Elias CN, Mady CM, Silva VVM, Nery AP, Rocha KR, Rocha C, Isac E. Efeito larvicida e toxicológico do extrato bruto etanólico da casca do caule de *Magonia pubescens* sobre *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) em criadouros artificiais. *Revista de Patologia Tropical* 32:73-86, 2003. [[Links](#)]
29. Silva IG, Santos AH, Ferri PH, Alves RBN, Melo RQ, Peixoto L, Silva HHG, Elias CN, Isac E, Lira KS, Camargo MF. Ação larvicida do extrato bruto etanólico de *Magonia pubescens* St.Hil. (tingui-do-cerrado), sobre o *Aedes aegypti* (Lin.) em laboratório. *Revista de Patologia Tropical* 25:51-59, 1996. [[Links](#)]
30. Silva IG, Silva HHG, Guimarães VP, Lima GC, Pereira AL, Filho ER, Rocha C. Prospecção da atividade inseticida de plantas do Cerrado, visando ao combate de *Aedes aegypti*. *Informe Epidemiológico do SUS* 10:51-52, 2001. [[Links](#)]

31. Simas NK, Lima EC, Conceição SR, Kuster RM, Oliveira F^o AM. Produtos naturais para o controle da transmissão de dengue – atividade de *Myroxylon balsamum* (óleo vermelho) e de terpenóides e fenilpropanóides. Química Nova 27:46-49, 2004 [[Links](#)]
32. Sivagnaname N, Kalyanasundaram M. Laboratory evaluation of methanolic extract of *Atlantia monophyla* (Family: Rutaceae) against immature stages of mosquitoes and non-target organisms. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 99:115-118, 2004. [[Links](#)]
33. Slimestad R, Marston A, Mavi A, Hostettmann K. Larvicidal constituents of *Melantheria albinervia*. Planta Medica 61:562-563, 1995. [[Links](#)]
34. Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001. [[Links](#)]

 **Endereço para correspondência**

Dr. Ionizete Garcia da Silva
Dept^o Microbiologia, Imunologia, Parasitologia e Patologia/IPTSP/UFG
Caixa Postal 131, 74001-970 Goiânia, GO
Tel: 55 62 209-6128; Fax:55 62 261-2077
e-mail: ionizete@iptsp.ufg.br

Recebido para publicação em 31/5/2004

Aceito em 11/6/2004

Apoio Financeiro: CNPq, FAPESP, CAPES, OPAS, FUNAPE

Todo o conteúdo deste site www.scielo.br, exceto quando identificado, utiliza uma Licença de Atribuição Creative Commons.

Caixa Postal 118
38001-970 Uberaba MG Brazil
Tel.: +55 34 3318-5287

ARTIGO 2 – submetido à Revista Memórias do Instituto Oswaldo Cruz

Larvicidal Activity of Oil-resin Fractions from the Brazilian Medicinal Plant *Copaifera reticulata* Ducke Against *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae)

Heloísa Helena Garcia da Silva, Ionizete Garcia da Silva[†], Regina Maria Geris dos Santos*, Edson Rodrigues Filho^{}, Cleonice Rocha^{***}**

Departamento de Microbiologia, Imunologia, Patologia e Parasitologia, IPTSP, UFG, Caixa Postal 131, 74001-970, Goiânia, GO, Brasil *Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Campus Ondina, Rua Barão de Jeremoabo, s/n, 40170-290, Salvador, BA, Brasil **Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, Rodovia Washington Luís, km 235, 13565-905, São Carlos, SP, Brasil ***Núcleo de Pesquisa em Química, Universidade Católica de Goiás, Av. Universitária, 1440, 74605-010, Goiânia, GO, Brasil

*Fractions from oil-resin of *Copaifera reticulata* (Leguminosae) were evaluated for larvicidal activity, monitored by the study of efficacy against of 3rd larval instar of *Aedes aegypti*, in the search of alternatives methods for the control of this mosquito. The fractions having larvicidal activity were chemically analyzed by thin-layer chromatography, ¹H and ¹³C nuclear magnetic resonance, and mass spectrometry. Bioassays of these fractions were accomplished using five replications, under controlled temperature (28±1°C), relative humidity (80±5%) and light (12 h). Fractions that presented the largest larvicidal potential, CRM₁₋₄, CRM₅₋₇, showed LC₅₀ values of 0,2 and 0,8 ppm, respectively.*

Key words: *Copaifera reticulata* - *Aedes aegypti* – terpenes – larvicidal activity

Aedes aegypti (Lin.) is a mosquito disseminated the entire world long, being of medical importance because it is the vector of dengue and yellow fever in Asia, Africa and Americas (Maillard et al. 1993; Pinheiro & Corber

1997). According the World Healthy Organization (WHO 2003), around 2.5 billions people are exposed to dengue transmission risk, in the urban environmental of the Cosmotropical area. This problem can be maximized due to adaptation of the mosquito to polluted water (Silva et al. 1999), whose control can become a big challenge in the close future.

Until now there is no available vaccine to prevent dengue. Its control has been made by antivectionals actions using synthetics insecticides. However, with the continuous use of these products *A. aegypti* has become resistant to many of these chemicals (Failloux et al. 1994, Carvalho & Silva 1999, Lima et al. 2003, Macoris et al. 2003, Braga et al. 2004). This factor, allied to growth of environmental concerns about the ecological damage produced by synthetics insecticides, has motivated scientific researches to find actives products from botanic origins that present lowers environmental impact. Although there is a large variety of compounds present in plants, only few species has been investigated with this purpose (Monzon et al. 1994, Perich et al. 1995, Slimestad et al. 1995, Choochote et al. 1999, Silva et al. 1996, Ciccia et al. 2000, Siddiqui et al. 2000, Park et al. 2002, Cheng et al. 2003, Silva et al. 2004).

Copaifera reticulata Ducke (Leguminosae-Caesalpinoideae) is a plant found in tropical region of the Latin America, with large distribution in the Brazilian Amazon forest, in the states of Pará and Amazonas (Corrêa 1984). It is also known as “copaibeira” and “pau-d’oleo”, and is the principal source of the oil-resin. In addition, the poor people from this region has used the oil-resin as a primary therapeutic source for several ethno-pharmacological indications (Corrêa 1984, Basile et al. 1988, Cascón & Gilbert 2000, Veiga Jr & Pinto 2002).

Therefore the study of *C.reticulata* has great potential to find bioactive compounds. The present paper describes the activity and chemical composition of fractions derived from *C.reticulata* against third instar *A.aegypti* larvae.

MATERIALS AND METHODS

Plant material – Crude oil from *C. reticulata* Ducke was obtained as exudates from direct perforation of its trunk in Jacundá, Pará, Brazil (October 2001). The trunk was perforated at 70 cm from soil. The oil-resin exudates from this hole was collected and filtered in a nylon fabric, and finally stored in amber flasks until use. The plant wound was covered with clay.

Extraction and separation – An oil sample (186.5 g) was subjected to liquid-liquid partition with *n*-hexane and methanol (1:1) resulting in two extracts, hexanic (162.3 g) and methanolic (22.8 g). The extracts were subsequently chromatographed on silica gel CC (70-230 mesh) using *n*-hexane, dichloromethane and methanol, according the gradient polarity elution technique. The fractions from hexanic extract were named CRH₁ to CRH₈, and the fractions from methanolic extract were named CRM₁ to CRM₈. The active fractions were rechromatographed on a silica flash CC (230-400 mesh), eluted with *n*-hexane, ethyl acetate and methanol gradient as mobile phase. The fractions were analyzed by thin layer chromatography (TLC) using sulphuric acid solution of vanillin as revealing reagent. Fractions with similar TLC patterns (r.f.) were joined for subsequent bioassays.

Analyses of bioactive subfractions – The bioactive subfractions were monitored by TLC and analyzed by ¹H nuclear magnetic resonance (¹H NMR) in a Bruker ARX-200 spectrometer, using deuterated chloroform (CDCl₃) as solvent and tetramethylsilane (TMS) as internal standard. The nonpolar fractions (from hexanic extract), were analysed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS), using electronic impact as ionization method.

Bioassays – For the larvicidal activity assays, 3rd instar larvae of *A. aegypti* were used. They were obtained from cyclic colony, maintained at 28±1°C, 80±5% of relative humidity and 12h photoperiod (Silva et al. 1998). Each fraction containing test compounds was weighted, dissolved previously in dimethylsulphoxide (DMSO), and the volume filled up with distilled water to obtain a stock solution (500 ppm). From this solution, a series of dilutions was prepared to get desired concentrations. The bioassays were carried out in 5 replicate in an acclimatized ambient similar to colony growth. Twenty 3rd instar larvae of *A.aegypti* were placed on the test solution. Control assays were conducted using the same number of larvae in a DMSO-distillated water

solution. The mortality of larvae was measured after 24 and 48 h through observation of total absence of movement as well as the body and cephalic capsule darkness. The lethal concentrations and their respective confidence intervals were calculated by data interpolation, by Probit analyses using the Statistic Analyses System (SAEG).

RESULTS AND DISCUSSION

The liquid-liquid partition of 186.5g of the *C. reticulata* oil-resin resulted in 162.3g of hexanic extract and 22.8g of methanolic extract; both showed larvicidal activity against *A. aegypti*. The bioassay-guided fractionation of these extracts afforded eight fractions for each one. Two hexanic (CRH₁, CRH₅) and two methanolic (CRM₁, CRM₅) fractions presented the highest toxicity against *A. aegypti* larvae. The lethal concentrations (LC), with their respective confidence intervals, is found in Table I.

Fractions CRH₁, CRH₄ e CRH₅ were monitored by TLC and analyzed by GC-MS and ¹H NMR. The NMR spectra showed hydrogen signals linked to many saturated aliphatic carbons and few unsaturated carbons suggesting the presence of terpenoids compounds. In spite of few spots have been appeared in TLC, the GC-MS data showed that these fractions have a great number of substances having similar molecular structures. The GC/MS spectra obtained for individual compounds, separated by gas chromatography (GC), were compared with spectroscopic data stored in a library (NIST) and this indicated the presence of monoterpenes belong mainly to pinanes and paramenthanes groups, as well as sesquiterpenes from cariofilenes, bisabolanenes, cardinanes, and copaenenes groups.

The chemical analyses of the bioactive fractions against of *A. aegypti* larvae, showed the monoterpenes, sesquiterpenes, and diterpenes as major compounds. The CRH₁ fraction, rich in monoterpenes, and CRM₁ fraction, rich in monoterpenes, sesquiterpenes and diterpenes, were the fractions that showed the biggest larvicidal potential against *A. aegypti*. The LC₅₀ values obtained for both fractions were respectively, 0.8 and 2.3 ppm, and the LC₉₀ values were 8.1 and 8.8 ppm (Table I). It can be seen that there are differences

between LC_{50} and similarities between LC_{90} for these two fractions when the larvicidal potential were compared.

The oil-resin *in nature* demonstrated a bigger activity when compared with some of their fractions, and this fact can be explained by a possible synergistic effect between oil constituent with different classes of compounds or different structures, but contributing for the same activity. However, the hexanic extract fractionation resulted in a fraction (CRH₁) which is rich in monoterpenes and was 4 times more active than the oil-resin.

Larvicidal activity of fractions derived from methanolic extract was also compared with the oil-resin (Tabel I). Fraction CRM₁ showed LC_{50} 11 times more toxic than oil-resin. Fraction CRM₅ also showed activity against the larvae, but having LC_{50} value of 10.5 ppm, which is less effective, but compared with the oil-resin activity (8.9 ppm). Thus, these two fractions were selected to perform chromatographic procedures for purification. The resulting subfractions were evaluated against *A.aegypti* larvae and the results are showed in Table II. The subfraction CRM₁₋₄ exhibited a great activity (LC_{50} of 0.2 ppm). ¹H NMR spectrum revealed the presence of sesquiterpenoid compounds.

Although fraction CRM₅ show a LC_{50} close to the oil-resin, its fractionation resulted in more active subfractions, CRM₅₋₇, CRM₅₋₈, CRM₅₋₁₁ and CRM₅₋₁₂ having LC_{50} values of 0.8; 7.9, 6.2 and 7.3 ppm, respectively. The analysis of these subfractions by TLC and NMR (¹H e ¹³C) indicated the presence of clerodanes, and labdanes diterpenes as major compounds. Many of the labdanes diterpenes detected in the CRM₅₋₃ and CRM₅₋₄ fractions have furanoid side chain as partial structure.

Two subfractions derived from methanolic extract of oil-resin obtained from *C.reticulata*, CRM₁₋₄ and CRM₅₋₇, exhibited a great LC_{50} (4 and 13 times more toxic than oil-resin, respectively). Terpenoids are well reported as candidates for insecticidal compounds that could be an effective alternative for insects control with a lower impact in human health, household animals and the environment (Viegas Jr. 2003). The larvicidal potential of CRM₁₋₄ (LC_{50} = 0.2 ppm) and CRM₅₋₇ (LC_{50} = 0.8 ppm) against *A. aegypti* can be better evaluated by comparison with studies using the same mosquito but others terpenes. The sesquiterpenes *E*-nerolidol, farnesol, and nerolidol, the first one isolated from *Myroxilon balsamum* and the other two obtained from commercial shops,

showed LC₅₀ values of 6.0, 13.0 and 17.0 ppm, respectively (Simas et al. 2004). The monoterpene isolated from oil produced by *Tagetes minuta* showed active at concentrations upper 40.0 ppm (Green et al. 1991), and the diterpene isolated from *Melantheria albinervia* showed LC₁₀₀ 62.5 ppm (Slimestad et al. 1995). In addition, a triterpene isolated from *Azadirachta indica* showed LC₅₀ of 21.0 ppm (Siddiqui et al. 2000). All of these concentrations were much bigger than those observed for fractions of *C. reticulata* oil-resin.

The results described in the present paper suggest that oil-resin fractions of *C. reticulata* are promising as larvicide against *A. aegypti*. These results could encourage the search for new larvicidal natural compounds. Further investigations on the larvicidal mode-of-action, effects of subfractions on non-target organisms and the environmental, as well as formulations for improving the larvicidal potency and stability are needed for their practical use as a naturally occurring mosquito larval control agent.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to the Brazilian institutions FAPESP, CNPq, CAPES, FINEP and FUNAPE for their financial support.

REFERENCES

- Basile AC, Sertie JAA, Freitas PCD, Zanini AC 1988. Anti-inflammatory activity of oleoresin from Brazilian *Copaifera*. *J Ethnopharmacol* 22: 101-109.
- Braga IA, Lima JBP, Soares SS, Valle D 2004. *Aedes aegypti* resistance to temephos during 2001 in several municipalities in the states of Rio de Janeiro, Sergipe and Alagoas, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99: 99-203.
- Carvalho LAF & Silva IG 1999. Atividade larvicida do temephos a 1% sobre o *Aedes aegypti* (Lin.,1762) em diferentes criadouros artificiais. *Rev Patol Trop* 28: 211-232.
- Cascón V & Gilbert B 2000. Characterization of the chemical composition of oleoresins of *Copaifera guianensis* Desf., *Copaifera duckei* Dwyer and

- Copaifera multijuga* Hayne. *Phytochemistry* 55: 773-778.
- Cheng SS, Chang HT, Ghang ST, Tsai KH, Chen WJ 2003. Bioactivity of selected plant essential oils against the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* larvae. *Bioresour Technol* 89: 99-102.
- Choochote W, Kanjanapothi D, Panthong A, Taesotikul T, Jitpakdi A, Chaitong U, Pitasawat B 1999. Larvicidal, adulticidal and repellents effects of *Kaempferia galanga*. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 30: 470-476.
- Ciccia G, Coussio J, Mongelli E 2000. Insecticidal activity against *Aedes aegypti* larvae of some medicinal South American plants. *J Ethnopharmacol* 72: 185-189.
- Corrêa MP 1984. *Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas*, Vol. V, Ministério da Agricultura; Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, Brasília, 687 pp.
- Failloux AB, Ung A, Raymond M, Pasteur N 1994. Insecticide susceptibility in mosquitoes (Diptera: Culicidae) from French Polynesia. *J Med Entomol* 31: 639-644.
- Green MM, Singer JM, Sutherland DJ, Hibben CR 1991. Larvicidal activity of *Tagetes minuta* (Marigold) toward *Aedes aegypti*. *J Am Mosq Control Assoc* 7: 282-286.
- Lima JBP, Da-Cunha MP, Da Silva RC, Galardo AK, Soares SS, Braga IA, Ramos RP, Valle D 2003. Resistance of *Aedes aegypti* to organophosphates in several municipalities in the State of Rio de Janeiro and Espírito Santo, Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 68: 329-333.
- Macoris ML, Andrighetti MTM, Takaku L, Glasser CM, Garbeloto VC, Bracco JE 2003. Resistance of *Aedes aegypti* from the state of São Paulo, Brazil, to organophosphates insecticides. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98: 703-708.
- Maillard M, Marston A, Hostettmann K 1993. Search for molluscicidal and larvicidal agents from plants. In M Balandrin, *Human Medicinal Agents From Plants*, American Chemical Society, Washington DC.
- Monzon RB, Alvior JP, Luczon LL, Morales AS, Mutuc FE 1994. Larvicidal potential of five Philippine plants against *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 25: 755-759.
- Park IK, Lee SG, Shin SC, Park JD, Ahn YJ 2002. Larvicidal activity of

- isobutylamides identified in *Piper nigrum* fruits against three mosquito species. *J Agric Food Chem* 50: 1866-1870.
- Perich MJ, Wells C, Bertsch W, Tredway KE 1995. Isolation of the insecticidal components of *Tagetes minuta* (Compositae) against mosquito larvae and adults. *J Am Mosq Control Assoc* 11: 307-310.
- Pinheiro FP & Corber SJ 1997. Global situation of dengue and dengue haemorrhagic fever and its emergence in the Americas. *World Health Stat Q* 50: 161-169.
- Siddiqui BS, Afshan F, Ghiasuddin SF, Navqi SNH, Tariq RM 2000. Two insecticidal tetranortriterpenoids from *Azadirachta indica*. *Phytochemistry*, 53: 371-376.
- Silva HHG, Silva IG, Lira KS 1998. Metodologia de criação, manutenção de adultos e estocagem de ovos de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) em laboratório. *Rev Patol Trop* 27: 51-63.
- Silva HHG, Silva IG, Lira KS 1999. Adaptação do *Aedes aegypti* em criadouros artificiais com água poluída. *Entomol Vect* 6: 383-391.
- Silva HHG, Silva IG, Santos RMG, Rodrigues F^o E, Elias CN 2004. Atividade larvicida de taninos isolados de *Magonia pubescens* St.Hil. (Sapindaceae) sobre o *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). *Rev Soc Bras Med Trop* 37: 396-399.
- Silva IG, Santos AH, Ferri PH, Alves RBN, Melo RL, Peixoto L, Silva HHG, Elias CN, Isac E, Lira KS, Camargo MF 1996. Atividade larvicida do extrato bruto etanólico de *Magonia pubescens* St.Hil. (tingui-do-cerrado) sobre o *Aedes aegypti* (Lin.) em laboratório. *Rev Patol Trop* 25: 51-59.
- Simas NK, Lima EC, Conceição SR, Kuster RM, Oliveira Filho AM 2004. Produtos naturais para o controle da transmissão da dengue - Atividade larvicida de *Myroxylon balsamum* (óleo vermelho) e de terpenóides e fenilpropanóides. *Quím Nova* 27: 46-49.
- Slimestad R, Marston A, Mavi S, Hostettmann K 1995. Larvicidal constituents of *Melantheria albinervia*. *Planta Med* 61:562-563.
- Viegas Jr C 2003. Terpenes with insecticidal activity an alternative to chemical control of insects. *Quím Nova* 26: 390-400.
- Veiga Jr V & Pinto AC 2002. O Gênero *Copaifera* L. *Quím Nova* 25:273-286.
- WHO-World Health Organization 2003. Dengue/dengue haemorrhagic fever

prevention and control. Regional Office for South-East Ásia, 1-33.

TABLE I

Larvicidal activity of the fractions from *Copaifera reticulata* against 3rd larval instar of *Aedes aegypti* and their chemicals constituents.

Fractions	Chemical class	LC ₅₀ (CI 95%) ppm	LC ₉₀ (CI 95%) ppm
Oil-resin		8.9 (6.9 – 10.8)	59.4 (41.9 – 102.2)
CRH ₁	Monoterpenes	2.3 (0.9 – 3.4)	8.8 (7.3 – 11.5)
CRH ₄	Sesquiterpenes	22.6 (22.5 – 26.4)	43.9 (40.2 – 49.1)
CRH ₅	Sesquiterpenes	13.9 (11.2 – 15.3)	40.9 (34.5 – 52.4)
CRM ₁	Mono-,di-,sesquiterpenes	0.8 (0.01 – 2.5)	8.1 (7.9 – 11.9)
CRM ₃	Diterpenes	17.3 (15.3 – 19.1)	61.1(50.4 – 80.3)
CRM ₄	Diterpenes	15.5 (11.8 – 18.6)	93.1 (67.2 – 163.0)
CRM ₅	Diterpenes	10.5 (9.1 – 11.7)	21.4 (18.6 – 26.5)

CI95% - Confidence interval at 95% probability. There was no mortality in the control group.

TABLE II

Larvicidal activity of the subfractions CRM₁ and CRM₅ from *Copaifera reticulata* against 3rd larval instar of *Aedes aegypti* and their chemicals constituents.

Fractions	Chemical class	LC ₅₀ (CI 95%) ppm	LC ₉₀ (CI 95%) ppm
CRM ₁₋₂	Monoterpenes	27.5 (12.1 – 41,9)	> 100
CRM ₁₋₃	Monoterpenes	3.9 (2.1 – 5.5)	37.8 (26.6 –69.4)
CRM ₁₋₄	Sesquiterpenes	0.2 (0.1 – 1.2)	12.2 (6.1 – 22.2)
CRM ₁₋₅	Sesquiterpenes	7.5 (4.9 – 15.7)	65.1 (59.4 – 85.2)
CRM ₁₋₆	Sesquiterpenes	>100	>100
CRM ₁₋₇	Sesquiterpenes	> 100	>100
CRM ₁₋₈	Labdane diterpenes	> 100	> 100
CRM ₁₋₉	Labdane diterpenes	10.3 (0.2 – 2.5)	>100
CRM ₅₋₇	Labdane diterpenes	0.8 (0.1 – 1.9)	8.2 (6.5 –11.3)
CRM ₅₋₈	Labdane diterpenes	7.9 (7.1 –8.4)	12.5 (11.3 – 15.1)
CRM ₅₋₉	Furane labdane diterpenes	32.3 (30.4 – 34.2)	56.2 (51.8 – 62.1)
CRM ₅₋₁₀	Furane labdane diterpenes	10.6 (9.7 – 11.5)	21.6 (19.4 – 25.2)
CRM ₅₋₁₁	Clerodane diterpenes	6.2 (5.7 – 6.8)	11.1 (9.9 – 13.0)
CRM ₅₋₁₂	Clerodane diterpenes	7.3 (5.1 – 9.4)	68.5 (48.4 – 117.2)

CI95% - Confidence interval at 95% probability. There was no mortality in the control group.

Artigo 3 – Submetido à Revista “Biochemical Systematics and Ecology”**Diterpenes from *Copaifera reticulata* Ducke with larvicidal activity against *Aedes aegypti***

Heloísa Helena Garcia da Silva^a, Regina Maria Geris dos Santos^{b*}, Edson Rodrigues-Fo^c, Andersson Barison^c, Antônio Gilberto Ferreira^c and Ionizete Garcia da Silva^a

^a*Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, CP 131, 74001-970, GO, Brasil.*

^b*Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, 40170-290, BA, Brasil.*

^c*Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, CP 676, 13.565-905, SP, Brasil*

Keywords: *Copaifera reticulata*; Leguminosae; copaiba oil; diterpenes; labdane diterpenes; larvicidal activity; *Aedes aegypti*

1. Subject and source

This paper describes the isolation and characterization of *ent*-labdanes diterpenes (**1-4**) from the oleoresin of *Copaifera reticulata* Ducke (Leguminosae) and their larvicidal activity against *Aedes aegypti* larvae. *C. reticulata* is a medium size tree, known as “copaibeira” and “pau d’óleo”, that is native to tropical regions of South America and grows abundantly in several states of Brazil like Pará, Amazonas and Ceará (Salvador, 1975; Corrêa, 1984). The oleoresin of this plant, which has been used mainly as a healing, anti-inflammatory and antiseptic agent (Corrêa, 1984; Basile et al, 1988; Cascón and Gilbert, 2000; Paiva et al, 2002; Veiga Jr and Pinto, 2002), was collected at Jacundá, Pará, Brazil. A voucher specimen (accession number is being providing) is deposited in the Herbarium of Botany Department of Federal University of Goiás, Brazil.

2. Previous work

Naturally occurring *ent*-labdane diterpenes have been reported in literature occurring in Asteraceae [*Eupatorium buniifolium* (Carreras et al., 1998)], Aracaureaceae

* Corresponding author. Tel. +55-71-237 5784 (R. 210). Fax: +55-71-237 4117
E-mail address: rmgeris@uol.com.br (R.M.G. dos Santos).

[*Araucarea bidwilli* (Caputo and Mangoni, 1974)], Aristolochiaceae [*Aristolochia cymbifera*, *A. esperanzae*, and *A. galeata* (Lopes and Bolzani, 1988)], Compositae [*Brickellia glomerata* (Calderon et al., 1987), *Oxylobus adscendens* and *O. arbutifolius* (Bohlmann et al., 1985)], Cupressae [*Juniperus chinensis* (Fang et al., 1993)], Euphorbiaceae [*Ricinocarpus muricatus* (Henrick and Jefferies, 1965a, 1965b)], Leguminosae [*Hymenaea courbaril* (Nakano and Djerassi, 1988), *Copaifera cearensis* (Pinto et al., 2000), *Acacia* sp (Forster et al., 1985)], and Nolanaceae [*Nolana filifolia* (Garbarino et al., 1988)], etc.

Copaifera species have been known to produce diterpenes belonging to kaurane, labdane and clerodane classes. Kaurane diterpenes such as 19-*ent*-kauranoic acid and 19-*ent*-kaurenoic acid have been found in oleoresin from *C. langsdorfii* (Ferrari et al., 1971), *C. guianensis* and *C. duckei* (Cascon and Gilbert, 2000). Clerodane and labdane diterpenes are found in the oil native of this genus [*C. langsdorfii* (Ohsaki et al., 1994), *C. cearensis* (Pinto et al., 2000)], as well as in commercial oil (Monti et al., 1996).

3. Present study

a) Isolation of Compounds

The oil “*in natura*” (186.5 g) was subjected to liquid-liquid partition with *n*-hexane and methanol resulting in two extracts, hexane (162.3 g) and methanol extract (22.8 g). The methanolic extract was submitted to a low-pressure silica gel CC eluted with *n*-hexane to methanol gradient. The medium polarity fraction eluted with ethyl acetate were reiteratively chromatographed in silica gel column, using *n*-hexane, ethyl acetate and methanol gradient as mobile phase and the diterpenes **1** and **3** were obtained. Subsequent CC procedure using *n*-hexane, ethyl acetate and methanol gradient as mobile phase the diterpene **2** was obtained as a white amorphous powder. Finally, diterpenes **4** was purified by preparative thin layer chromatography, using *n*-hexane:ethyl acetate (70:30) as mobile phase.

The structures of these compounds were proposed from their spectral data (¹H NMR, IR and MS) and comparison with literature data. Diterpene **1** has been isolated previously from commercial copaiba oil and is named as enantio-3-hydroxy-labd-8(17),13-dien-15-oic acid (Mahajan and Ferreira, 1971). Their data are in perfect agreement with those reported by these authors.

Diterpene **2** has also been described in literature as a dihydro derivate from compound **1**, through Pd/C catalytic hydrogenation method (Braun and Breitenbach,

1977). According to our knowledge, it was the first time that this compound is being isolated as a natural product.

Diterpene **3**, named 3-acetoxy-labda-8(17),13-dien-15-oic acid has been isolated from autumnal leaves of *Metasequoia glyptostroboides*, Cupressaceae (Braun and Breitenbach, 1977). However, this compound is being isolated from the first time from copaiba oils. The spectral data reported in literature for this diterpene are very similar to those obtained for compound **3**, excepting the opposite signal of optical rotations (positive in literature). Therefore it suggests that our compound could be the enantiomer of the diterpene reported by Braun and Breitenbach (1977).

After comparison of spectral data obtained for diterpene **4** with those in literature (Mahajan and Ferreira, 1971), we conclude that **4** is the labdane diterpene *enantio*-agathic acid.

b) Bioassays

For the larvicidal activity assay larvae of 3rd larval instars of *A. aegypti* were utilized. They were obtained from cyclic colony maintained more than 10 years at 28±1°C, 80±5% of relative humidity and 12h photoperiod (Silva et al., 1998). Each fraction was weighted, solved previously in dimethylsulphoxide (DMSO), and the volume filled up with distilled water to obtain a stock solution of 100 ppm. From this solution, a serie of dilutions was prepared to get desired concentrations. The bioassays were realized in 5 replicate in an acclimatized ambient similar to colony creation. For each concentration, twenty larvae were placed on the solution test and the control assays contained the same number of larvae in a DMSO-distillated water solution. The mortality of larvae was measured after 24 and 48 h through observation of total movement absence as well as the body and cephalic capsule darkness. The lethal concentrations and their respective confidence intervals were calculated by data interpolation, through Probit analyses using the Statistic Analyses System (SAEG).

Bioassays examined the activity of compounds **1**, **2**, **3**, and **4** against *A. aegypti* larvae. The toxicity of compounds is reported in Table 1. The results indicate that the LC₅₀ of the most toxic compound to larvae was the diterpene **3** (0.8 ppm). The larvicidal potential of **3** against *A. aegypti* can be better evaluated by comparison with studies realized using the same mosquito. The sesquiterpenes ϵ -nerolidol, farnesol, and nerolidol, the first one isolated from *Myroxilon balsamum* and the others obtained from commercial shops, showed, respectively, LC₅₀ de 6.0, 13.0, and 17.0 ppm (Simas et al.

2004). The diterpene isolated from *Melantheria albinervia* showed LC₁₀₀ 62.5 ppm (Slimestad et al. 1995).

Further investigations on the larvicidal mode-of-action, effects of subfractions on non-target organisms and the environment, as well as formulations for improving the larvicidal potency and stability are needed for their practical use as a naturally occurring mosquito larval control agent, and is underway in our laboratory.

4. Ecological significance

Dengue is a viral disease that has major consequence in public health and has grown dramatically in recent decades (WHO, 2003). About two fifths of the world's population are now at risk of catching dengue, according to the World Health Organization.

The principal vector *A. aegypti*, a highly anthrop specie, has adapted to the urban environment by using artificial containers that collect rainwater or those for domestic water storage, as its larval habitat (WHO, 2003). The high *A. aegypti* population density in the cosmotropical area has triggered several interventions by the public health authorities using synthetic insecticide application as the main means of combat and control. However, the inefficiency of the organophosphates and carbamates insecticides (Failloux et al., 1994; Campos & Andrade, 2003; Lima et al., 2003; Macoris et al., 2003; Braga et al., 2004), along with the need for safer methods regarding to toxicity to man and the environment has stimulated the search for the new means of control. Plants may be an alternative source of mosquito larval control agents because they constitute a rich source of bioactive chemicals (Siddiqui et al., 2000; Park et al., 2002; Carvalho et al., 2003; Viegas Jr., 2003, Cheng et al, 2004; Simas et al., 2004, Silva et al, 2004).

Recently we have investigated the activity of fractions obtained from *Magonia pubescens*, which showed a great effect against *A. aegypti* (Silva et al., 2004). It seems that tannins were the responsible for this activity. We are currently investigating fractions of *C. reticulata* and *C. langsdorfii* that exhibited some effect on larvae of this mosquito and the results are promising and probably terpenes (mono-, sesqui-, and diterpenes) are the main constituents of these fractions.

Acknowledgements

The authors are grateful to Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São

Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Ensino Superior (CAPES), and Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) for their financial support.

References

- Basile, A.C., Sertie, J.A.A., Freitas, P.C.D., Zanini, A.C., 1988. *Journal of Ethnopharmacology* 22, 101.
- Bohlmann, F., Hartono, L., Zdero, C, Jakupovic, J., 1985. *Phytochemistry* 24, 111.
- Braga, I.A., Lima, J.B.P., Soares, S.S.; Valle, D., 2004. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 99, 99.
- Braun, S., Breitenbach, H., 1977. *Tetrahedron* 33, 145.
- Calderon, J.S., Quijano, L., Garibay, F.G., Moran, M., Rios, T., 1987. *Phytochemistry* 26, 2639.
- Campos, J., Andrade, C.F.S., 2003. *Revista de Saúde Pública* 37, 523.
- Caputo, R., Mangoni, L., 1974. *Phytochemistry* 13, 467.
- Carreras, C.R., Rossomando, P.C., Giordano, O.S., 1998. *Phytochemistry* 48, 1031.
- Carvalho, A.F.U., Melo, V.M.M., Craveiro, A.A, Machado, M.I.L., Bantim, M.B., Rabelo, E.F., 2003. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 98, 569.
- Cascón, V., Gilbert, B., 2000. *Phytochemistry* 55, 773.
- Cheng, S.S., Liu, J.Y., Tsai, K.H., Chen, W.J., Chang, S.T., 2004. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 4395.
- Corrêa, M.P., 1984. *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*. Imprensa Nacional, v. II, Rio de Janeiro.
- Failloux, A.B., Ung, A., Raymond, M., Pasteur, N., 1994. *Journal Medical Entomology* 31, 639.
- Fang, J.M., Sou, Y.C., Chin, Y.H., Cheng, Y.S., 1993. *Phytochemistry* 34, 1581.
- Ferrari, M., Pagnoni, U.M., Pelizzoni, F., Lukes, V., Ferrari, G., 1971. *Phytochemistry* 10, 905.
- Forster, P.G., Ghisalberti, E.L., Jefferies, P.R., 1985. *Phytochemistry* 24, 2991.
- Garbarino, J.A., Chamy, M.C., Piovano, M., Gambaro, V., 1988. *Phytochemistry* 27, 1795.
- Henrick, C.A., Jefferies, P.R., 1965a. *Tetrahedron* 21, 1175.
- Henrick, C.A., Jefferies, P.R., 1965b. *Tetrahedron* 21, 3219.
- Lima, J.B., Da-Cunha, M.P., Da Silva, R.C., Galardo, AK., Soares, S.S., Braga, I.A.

- Ramos, R.P., Valle, D., 2003. *American Journal Tropical Medicine and Hygiene* 68, 329.
- Lopes, L.M.X., Bolzani, V.S., 1988. *Phytochemistry* 27, 2265.
- Macoris, M.L., Andrighetti, M.T.M., Takaku, L., Glasser, C.M., Garbeloto, V.C., Bracco, J.E., 2003. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 98, 703.
- Mahajan, J.R., Ferreira, G.A.L., 1971. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 43, 611.
- Monti, H., Tiliacos, N., Faure, R., 1996. *Phytochemistry*, 42, 1653.
- Nakano, T., Djerassi, C., 1988. *Journal of Organic Chemistry* 26, 167
- Ohsaki, A., Yan, L.T., Ito, S., Edatsugi, H., Iwata, D., Komoda, Y., 1994. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 4, 2889.
- Paiva, L.A., Alencar-Cunha, K.M., Santos, F.A., Gramosa, N.V., Silveira, E.R., Rao, V.S., 2002. *Phytotherapy Research* 16, 737.
- Park, I.K., Lee, S.G., Shin, S.C., Park, J.D., Ahn, Y.J., 2002. *Journal of Agricultural Food and Chemistry* 50, 1866.
- Pinto, A.C., Braga, W.F., Rezende, C.M., Garrido, F.M.S., Veiga-Jr, V.F., Bergter, L., Patitucci, M.L., Antunes, O.A.C., 2000. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 11, 355.
- Salvador, V., 1975. *História do Brasil: 1500-1627*, 6 ed; Melhoramentos, São Paulo..
- Siddiqui, B.S., Afshan, F., Ghiasuddin, S.F., Navqi, S.N.H., Tariq, R.M., 2000. *Phytochemistry* 53, 371.
- Silva, H.H.G., Silva, I.G., Lira, K.S., 1998. *Revista de Patologia Tropical* 27:51.
- Silva, H.H.G., Silva, I.G., Santos, R.M.G., Rodrigues-Fº, E., Elias, C.N., 2004. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 37, 396.
- Simas, N.K., Lima, E.C., Conceição, S.R., Kuster, R.M., Oliveira Filho, A.M., 2004. *Química Nova* 27, 46.
- Slimestad, R., Marston, A., Mavi, S., Hostettmann, K., 1995. *Planta Medica* 61, 562.
- Veiga-Jr, V.F, Pinto, A.C., 2002. *Química Nova* 25, 273.
- Viegas-Jr, C., 2003. *Química Nova* 26, 390.
- WHO - World Health Organization, 2003. *Regional Office for Southeast Asia*, 1.

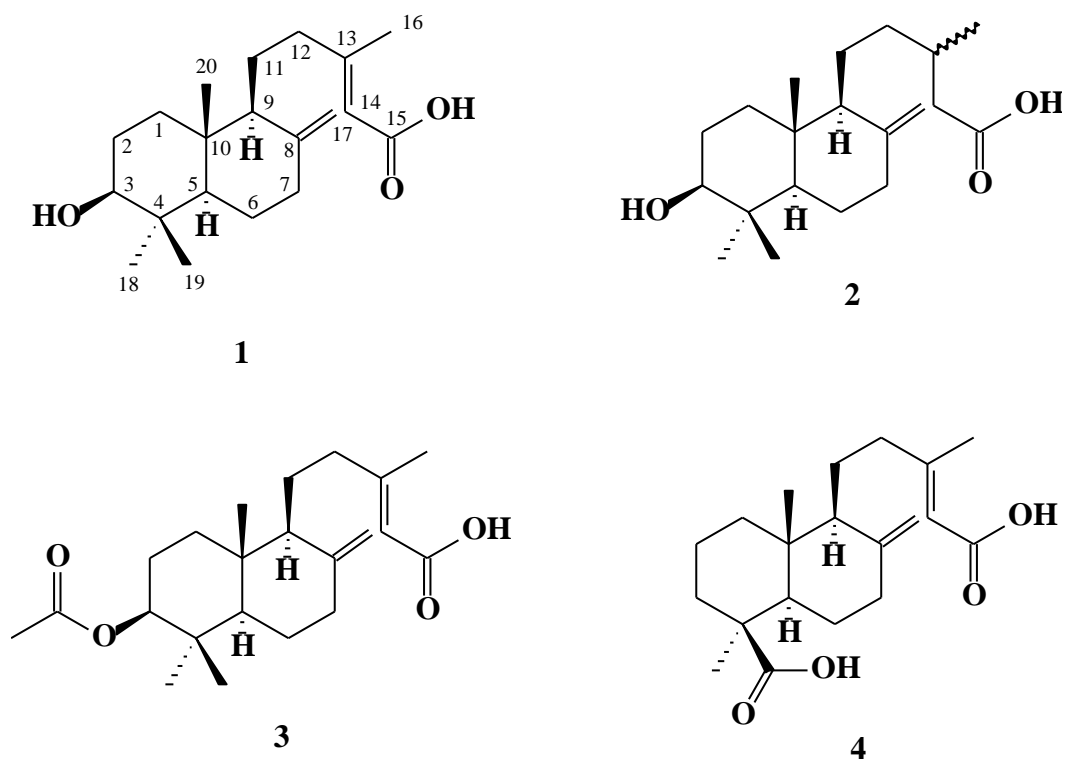


Table 1 - Larvicidal activity of compounds 1, 2, 3, and 4, isolated from *Copaifera reticulata*, against 3rd larval instar of *Aedes aegypti*.

Compounds	LC ₅₀ (CI 95%) ppm	LC ₉₀ (CI 95%) ppm
1	87.3 (41.5 – 146.2)	> 1000
2	No activity	No activity
3	0.8 (0.1 – 1.9)	8.2 (6.5 – 11.3)
4	No activity	No activity

CI 95% - Confidence interval at 95% probability. There was no mortality in the control group.

6. CONCLUSÕES

1 – Foram obtidas frações e substâncias puras, com CL_{50} inferiores a 3,1 ppm, com potencial de uso nas ações de controle do *A. aegypti*

2 - A fração larvicida MP₉, isolada da *M. pubescens*, apresentou como constituinte majoritário um tanino catéquico de massa molecular de 864.77 Da ($C_{45}H_{36}O_{18}$).

3 - Do óleo-resina de *C. reticulata* foi isolado um diterpeno labdano (CRM₅₋₇) de fórmula molecular $C_{22}H_{34}O_4$ identificado como ácido 3-acetoxi-labda-8(17),13-dien-15-oico, através da comparação dos dados espectrais com a literatura, com massa molecular de 362 Da. Este diterpeno apresentou o maior potencial larvicida para *A. aegypti* e, além disso, foi a primeira vez que esta substância foi isolada no gênero *Copaifera*.

4 - A integração de áreas do conhecimento como a Fitoquímica e a Entomologia conduziu a um caminho promissor e eficaz para a identificação de princípios ativos, que poderão ser de grande utilidade na prospecção e formulação de inseticidas naturais.

ANEXOS – Normas para publicação

ANEXO I - NORMAS PARA PUBLICAÇÃO - REVISTA DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL

A Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical destina-se à publicação de trabalhos científicos relacionados às doenças tropicais. A Revista tem periodicidade bimestral e aceitará trabalhos de pesquisadores brasileiros ou estrangeiros desde que obedeçam às normas e que sejam aprovados pelos relatores indicados pelos Editores,

1. Além de artigos, a revista publica comunicações, artigos de opinião, notas prévias, relatórios técnicos, relatos de casos, cartas ao editor, fatos históricos, resenhas bibliográficas e editoriais. Artigos de revisão, Artigos de opinião e editoriais serão publicados por solicitação do Corpo Editorial.

2. Os trabalhos devem ser originais e inéditos, digitados em espaço duplo, deixando margem de 3 cm à esquerda e remetidos em três vias, sendo uma a original. Após revisão, pede-se que os trabalhos sejam enviados em disquete, devidamente acompanhados de uma cópia impressa da versão revisada.

3. Normas para enviar trabalhos, após revisão, versão eletrônico; obedecer os seguintes requisitos:

- a) podem ser utilizados disquetes MS-DOS compatíveis no formato 3 1/2". Disquetes de Macintosh no formato 3 1/2" também serão aceitos. Elimine dos disquetes todos os arquivos não pertinentes ao artigo enviado. Escreva na etiqueta do disquete: título do artigo, nome do autor, nome do arquivo, editor de texto utilizado e nome dos arquivos acessórios (folhas de estilos, gráficos, tabelas etc);
- b) envie artigos compatíveis com os seguintes processadores de texto: Word para Windows (versão 7.0 ou anterior), Word para Mac (versão 6.0 ou anterior), outros formatos podem ser aceitos mediante consulta prévia. Nunca envie artigos em formato ASCII (só texto/ "text only");
- c) ao redigir o texto, o comando de retorno de linha ("Enter") deve ser utilizado exclusivamente no final dos parágrafos. Não adicione espaços extras ou "tabs" ao texto para obter recuo da primeira linha ou centralização de títulos na página. Tampouco retornos ("enters") adicionais para espaçar os parágrafos. Para obter estes efeitos, utilize apenas os comandos de

formatação de parágrafo, disponíveis em todos os editores de texto acima.

- d) podem ser incluídas tabelas, desde que montadas no próprio editor do texto. Observações e notas de rodapé devem ser, preferencialmente, colocadas após o final do artigo, devidamente numeradas e referenciadas;
- e) ilustrações, tabelas e gráficos produzidos em outros programas e “importados” para inclusão no texto devem ser enviados em arquivos anexos, em formatos universais de fácil compatibilidade (TIFF, BMP, PICT, GIF etc). Evite formatos não-padronizados (EPS, WMF etc) e arquivos que só podem ser abertos por programas específicos. De qualquer forma, envie sempre uma cópia bem impressa do gráfico, tabela ou ilustração para eventual reprodução.

4. Os trabalhos devem ser redigidos em português ou em inglês. A linguagem deve ser clara e precisa, e o texto conciso normalmente não ultrapassando 12 páginas digitadas para “artigos” e 6 para “Comunicações”.

5. A seguinte sequência deve ser observada:

- a) título original e traduzido e nome dos autores, evitando abreviar sobrenomes, em letras minúsculas na ordem direta, e respectiva afiliação. No rodapé Instituição onde foi realizado o trabalho e afiliação de cada autor, impreterivelmente; órgão financiador e o endereço completo por correspondência, inclusive telefone, fax e e-mail;
- b) resumo: máximo de 150 palavras para os artigos e 50 para as comunicações e relato de casos. Deve ser informativo e não indicativo, apresentando o objetivo do trabalho, como foi realizado, os resultados alcançados e a conclusão. Não usar abreviaturas ou citações bibliográficas. Citar 4 ou 5 palavras-chaves, respectivamente para artigos, relatos de casos e comunicações que expressem com precisão o conteúdo do trabalho;
- c) abstract: inserido logo após o resumo deve ser a tradução fiel do mesmo, seguido pelas key-words.
- d) Introdução: clara, objetiva, contendo informações que justifiquem o trabalho, restringindo as citações ao necessário;
- e) material e métodos: descrição concisa, sem omitir o essencial para compreensão e reprodução do trabalho. Métodos e técnicas já estabelecidas devem ser referidos por citação;
- f) resultados: sempre que necessário devem ser acompanhados por tabelas,

figuras ou outras ilustrações, auto-explicativas. Texto e documentação devem ser complementares. Quando aplicáveis os dados deverão ser informativo, não interpretativo;

g) discussão: limitar aos resultados obtidos e conter somente as referências necessárias. O conteúdo deve ser interpretativo e as hipóteses e especulações formuladas com base nos achados;

h) agradecimentos: limitados ao indispensável;

i) referências bibliográficas: digitadas em minúsculas, sem, sem ponto entre as abreviaturas em espaço duplo, numeradas e ordenadas em ordem alfabética pelo último sobrenome do autor; citar todos os autores de cada referência. Quando houver mais de uma citação do mesmo autor, seguir a ordem cronológica. As citações devem ser referidas no texto pelos respectivos números, acima da palavra correspondente, sem vírgula e sem parênteses; na lista de referências, deve seguir o seguinte estilo e pontuação:

- Artigos em periódicos (os títulos dos periódicos devem aparecer por extenso):

1. Coura JR, Conceição MJ. Estudo comparativo dos métodos de Lutz, Kato e Simões Barbosa no diagnóstico da esquistossomose mansoni. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 8:153-158, 1974.

- *Livros:*

2. Chandra RK, Newberne PM. *Nutrition immunity and infection: mechanisms of interactions*. Plenum, New York, 1977.

- *Capítulos de livros:*

3. Fulton JD. Diagnosis of protozoal diseases. In: Gell PGH, Coombs RRA (ed) *Clinical aspects of immunology*, 2nd edition, Blackwell, Oxford, p. 133-136, 1968.

- *Resumos de Congresso:*

4. Daher RH, Almeida Netto JC, pereira LIA. Disfunção hepática na malária grave. Estudo de 161 casos. *In: Resumos do XXXI Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Brasília* p.16, 1995.

- *Teses:*

5. Tavares W. Contaminação do solo do Estado do Rio de Janeiro pelo *Clostridium tetani*. Contribuição ao conhecimento da distribuição natural do bacilo tetânico. Tese de Doutorado, Universidade Federal do

Rio de Janeiro, RJ, 1975.

Somente deverão ser citados os trabalhos publicados. Dados não publicados ou comunicações pessoais devem ser referidos no texto da seguinte forma: (AB Figueiredo: comunicação pessoal, 1980) e (CD Dias, EF Oliveira: dados não publicados).

6. Tabelas: numeradas em algarismos arábicos e dotadas de título descritivo conciso. Manter seu número ao mínimo necessário e lembrar que tabelas muito grandes são difíceis de serem lidas. Devem ser digitadas em espaço duplo em folhas separadas sem linhas verticais e as unidades referidas no título de cada coluna. Todos os dados das tabelas, inclusive o título, devem ser em minúsculas, exceto as siglas, os dados estatísticos e/ou resultados percentuais deverão ter apenas uma casa decimal, após a vírgula, as fotografias devem ser originais.

7. Ilustrações: de boa qualidade e numeradas consecutivamente em algarismos arábicos. Além das fotografias, os gráficos, quadros, esquemas, etc devem ser referidos no texto como Figuras. Anotar no verso com lápis o número da figura e o nome do autor e trabalho. Listar as legendas numeradas com os respectivos símbolos e convenções em folha separada e em espaço duplo, o número de ilustrações deve ser restrito ao mínimo necessário.

8. Comitê de ética: no trabalho de pesquisa envolvendo seres humanos deverá constar o nº do processo e o nome do Comitê de Ética que o aprovou.

9. Permissão dos autores: anexar carta com ciente de todos os autores concordando com a publicação.

Endereço para remessa de trabalhos:

Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical
Caixa Postal 118, 38001-970 Uberaba, MG, Brasil
Tel: 34 3318-5287, Fax: 55343318-5279 ou Caixa Postal 04-671, 70919-970
Brasília, DF, Brasil.
Fax: 55 61 273-2811.

ANEXO II – Artigo II

NORMAS PARA PUBLICAÇÃO - REVISTA MEMÓRIAS DO INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Format style : The manuscript should be arranged in the following order: running title, title, authors' names, institutional affiliations, summary, key words, introduction, materials and methods, results, discussion, acknowledgements, and references. Sponsorships should be mentioned as a footnote on the first page.

Summary: up to 200 words (100 words in case of short communications). The summary should state the purposes of the study or investigation, basic procedures (selection of study subjects or laboratory animals; observational and analytical methods), main findings (giving specific data and their statistical significance, if possible), and the principal conclusions. It should emphasize new and important aspects of the study or observations.

Key words: 3-6 items must be provided. Terms from the Medical Subject Headings (Mesh) list of *Index Medicus* should be used.

Introduction: should set the purpose of the study, give a brief summary (not a review) of previous relevant works, and state what new advance has been made in the investigation. It should not include data or conclusions from the work being reported.

Materials and Methods: should briefly give clear and sufficient information to permit the study to be repeated by others. Standard techniques need only be referenced.

Ethics: when reporting experiments on human subjects, indicate whether the procedures followed were in accordance with the ethical standards of the responsible committee on human experimentation (institutional or regional) and with the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 1983. Do not use patients' names, initials, or hospital numbers, especially in illustrative material. When reporting experiments on animals, indicate whether the institution's or a national research council's guide for, or any national law on the care and use of laboratory animals was followed.

Results: should be a concise account of the new information discovered, with the least personal judgement. Do not repeat in text all the data in the tables and illustrations.

Discussion: should be limited to the significance of the new information and relate the new findings to existing knowledge. Only unavoidable citations should be included.

Acknowledgements: should be short and concise, and restricted to those absolutely necessary.

References: must be accurate. Only citations that appear in the text should be referenced. Unpublished papers, unless accepted for publication, should not be cited. Work accepted for publication should be referred to as "in press" and a letter of acceptance of the journal must be provided. Unpublished data should only be cited in the text as "unpublished observations", and a letter of permission from the author must be provided. The references at the end of the paper should be arranged in alphabetic order according to the surname of the first author.

The titles of journals should be abbreviated according to the style used in the *Index Medicus*. Consult the List of Journals Indexed in *Index Medicus* published in the January issue of *Index Medicus* or at the website <http://www.nlm.nih.gov/serials/lii.html>.

- In the text use authors' surname and date: Lutz (1910) or (Lutz 1910).

With two authors it is : (Lutz & Neiva 1912) or Lutz and Neiva (1912).

When there are more than two authors, only the first is mentioned:

Lutz et al. (1910) or (Lutz et al. 1910).

- diskette containing the text of the final approved version of the manuscript (including tables and graphics) in Word or Word Perfect for Windows format,(Macintosh formats should be converted);

- an **affidavit** signed by all authors, affirming that (i) all data contained are accurate; (ii) all authors have participated in the work in a substantive way and are prepared to take public responsibility for the work; (iii) the manuscript being submitted to this journal has not been published in total or in part, and is not being submitted for publication elsewhere. Authors from different countries or institutions may sign in different sheets containing the same basic statement;

- a copyright assignment form provided by the editorial Office and signed by the corresponding author must be returned.

Page charges: there will be no page charges.

Proofs: one set of page proofs will be supplied for the author to check for typesetting accuracy, to be returned by the stipulated date. No changes to the original manuscript will be allowed at this stage.

Offprints: authors will receive 30 free offprints. An order form will be sent to the author enabling further offprints to be ordered at prices listed on the form.

For other instructions the authors should consult and follow the most recent number of the **Memórias**, or contact the Editorial Office by phone (+55-21-598-4335), fax (+55-21-280-5048), or e-mail (memorias@pobox.com or memorias@ism.com.br).

ANEXO III – Artigo III**NORMAS PARA PUBLICAÇÃO - Biochemical Systematics and Ecology Guide for Authors Submission of Papers**

Authors are requested to submit their original manuscript and figures with two copies to: Executive Editor Professor Monique Simmonds Royal Botanic Gardens

Submission of a paper implies that it has not been published previously, that it is not under consideration for publication elsewhere, and that if accepted it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the publisher. Submission also implies that all authors have approved the paper for release and are in agreement with its content.

Note: compuscripts submitted are converted into PDF for the review process but may need to be edited after acceptance to follow journal standards. For this an "editable" file format is necessary. See the section on "Electronic format requirements for accepted articles" and the further general instructions on how to prepare your article below.

Submission to this journal proceeds totally on-line. Use the following guidelines to prepare your article. Via the "Author Gateway" page of this journal (<http://authors.elsevier.com>) you will be guided stepwise through the creation and uploading of the various files. Once the uploading is done, our system automatically generates an electronic (PDF) proof, which is then used for reviewing. It is crucial that all graphical and tabular elements be placed within the text, so that the PDF is suitable for reviewing. All correspondence is carried out using the website. In general, no separate proof is sent to you: the PDF is your proof. A proof will be provided *BSE Guide for Authors / Biochemical Systematics and Ecology* 31 (2003) I-VI only when the final layout of the article has to differ significantly from that in the initial PDF.

The above represents a very brief outline of this form of submission. It can be advantageous to print this 'Guide for Authors' section from the site for reference in the subsequent stages of article preparation.

Types of Contributions

Contributions will be accepted in English as Reviews, Research Papers or New Source Reports. Reviews which survey important and developing areas of biochemical systematics and ecology are encouraged but authors are advised to consult the Editor before preparing such articles.

Manuscript Preparation

General: Manuscripts must be typewritten, double spaced with wide margins on one side of white paper. Good quality printouts with a font size of 12 or 10 pt are required. The corresponding author should be identified (include a Fax number and E-mail address). Full postal addresses must be given for all co-authors. Authors should consult a recent issue of the journal for style if possible. An electronic copy of the paper should accompany the final version. The Editors reserve the right to adjust style to certain standards of uniformity. Authors should retain a copy of their manuscript since we cannot accept responsibility for damage or loss of papers. Original manuscripts are discarded one month after publication unless the Publisher is asked to return original material after use.

Identification and Nomenclature of Organisms: All organisms for which results are described must be properly identified.

Where this is carried out in places other than the Authors' own laboratory, the name of the individual and/or the institution responsible must be given in the Materials and Methods section. The correct Latin binomial should be given in accordance with the requisite code of nomenclature. Authorities of all specific and intra specific taxa should be given, but only at first mention in the text.

Voucher Specimens:For taxonomic or systematic papers and New Source Reports voucher specimens must be retained for wild collected material, or cultivated material from non-permanent sources, so that other scientists can check the identity of the material. In particular it is necessary to deposit the voucher specimens at a permanent lending herbarium, preferably national or regional, that is recognised by the International Association for Plant Taxonomy, and is listed in the Index Herbariorum (see www.nybg.org). University teaching herbaria which are listed in Index Herbariorum are acceptable, but other University or departmental herbaria will not be accepted. The accession numbers for the specimens must also be noted in the manuscript.

Text: Follow this order when typing manuscripts: Title, Authors, Affiliations, Abstract, Keywords, Main text, Acknowledgements, Appendix, References, Illustrations, Figure Captions and then Tables. Do not import the Figures or Tables into your text. The corresponding author should be identified with an asterisk and footnote. All other footnotes (except for table footnotes) should be identified with superscript Arabic numbers.

Title: This should be as brief as possible, consistent with clarity. If a paper forms part of a series this should be referred to in a footnote in the form: *Part 10 in the series "The Hormones of *Nereis diversicolor*". For Part 9 see Bloggs, A., 1848 *Biochem. Syst. Ecol.* 77, 117-121.

Authors: with first names in full.

Keywords: Authors should give from six to ten keywords or short phrases which identify the most important aspects covered by the paper.

References: All publications cited in the text should be presented in a list of references following the text of the manuscript. In the text refer to the author's name (without initials) and year of publication (e.g. "Since Peterson (1993) has shown that..." or "This is in the agreement with results obtained later (Kramer, 1994)"). For three or more authors use the first author followed by "et al.", in the text. The list of references should be arranged alphabetically by authors' names. The manuscript should be carefully checked to ensure that the spelling of authors' names and dates are exactly the same in the text as in the reference list. References should be given in the following form:

Illustrations: All illustrations should be provided in camera-ready form, suitable for reproduction (which may include reduction) without retouching. Photographs, charts and diagrams are all to be referred to as "Figure(s)" and should be numbered consecutively in the order to which they are referred. They should accompany the manuscript, but should not be included within the text. All illustrations should be clearly marked on the back with the figure number and the author's name. All figures are to have a caption. Captions should be supplied on a separate sheet.

Line Drawings: Good quality printouts on white paper produced in black ink are required. All lettering, graph lines and points on graphs should be sufficiently large and bold to permit reproduction when the diagram has been reduced to a size suitable for inclusion in the journal. Dye-line prints or photocopies are not suitable for reproduction. Do not use any type of shading on computer-generated illustrations.

Photographs: Original photographs must be supplied as they are to be reproduced (e.g. black and white or colour). If necessary, a scale should be marked on the photograph. Please note that photocopies of photographs are not acceptable.

Tables: Tables should be numbered consecutively and given a suitable caption and each table typed on a separate sheet. Footnotes to tables should be typed below the table and should be referred to by superscript lowercase letters. No vertical rules should be used.

Tables should not duplicate results presented elsewhere in the manuscript, (e.g. in graphs).

Proofs

Proofs will be sent to the author (first named author if no corresponding author is identified of multi-authored papers) and should be returned within 48 hours of receipt. Corrections should be restricted to typesetting errors; any others may be charged to the author. Any queries should be answered in full. Please note that authors are urged to check their proofs carefully before return, since the inclusion of late corrections cannot be guaranteed. Proofs are to be returned to the Log-in Department of the relevant Elsevier Science site.