



**FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDÔNIA**  
NÚCLEO DE SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EXPERIMENTAL PGBIOEXP/MESTRADO

**HILAMANI TORRES SANTANA**

**ESTUDO FITOQUÍMICO DE *Piper alatabaccum* TREL & YUNCK , 1950 E  
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA SOBRE *Aedes aegypti* LINNAUS, 1762  
(DIPTERA: CULICIDAE) EM CONDIÇÕES DE CAMPO SIMULADO**

**PORTO VELHO- RO**  
**2012**

**HILAMANI TORRES SANTANA**

**ESTUDO FITOQUÍMICO DE *Piper alatabaccum* TREL & YUNCK , 1950 E  
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA SOBRE *Aedes aegypti* LINNAUS, 1762  
(DIPTERA: CULICIDAE) EM CONDIÇÕES DE CAMPO SIMULADO**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Experimental, na área: parasitologia com ênfase na relação patógeno/hospedeiro do Programa de Pós-graduação em Biologia Experimental, na Universidade Federal de Rondônia.

**Orientador:** Dr. Valdir Alves Facundo

**PORTO VELHO- RO  
2012**

***FICHA CATALOGRÁFICA***  
**BIBLIOTECA CENTRAL PROF. ROBERTO DUARTE PIRES**

Santana, Hilamani Torres.

S232e

Estudo fitoquímico de *Piper alatabaccum* Trel & Yunck, 1950 e avaliação da atividade larvicida sobre *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762 (Diptera: culicidae) em condições de campo simulado. / Hilamani Torres Santana. Porto Velho, Rondônia, 2012.

90f.: il.

Dissertação (Mestrado em Biologia Experimental) – Núcleo de Saúde (NUSAU), Programa de Pós-Graduação em Biologia Experimental, Fundação Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, 2012.

**Bibliotecária Responsável:** Eliane Gemaque / CRB 11-549

**HILAMANI TORRES SANTANA**

**ESTUDO FITOQUÍMICO DE *Piper alatabaccum* TREL & YUNCK , 1950 E  
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA SOBRE *Aedes aegypti* LINNAUS, 1762  
(DIPTERA: CULICIDAE) EM CONDIÇÕES DE CAMPO SIMULADO**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Experimental, na área: parasitologia com ênfase na relação patógeno/hospedeiro do Programa de Pós-graduação em Biologia Experimental, na Universidade Federal de Rondônia.

\_\_\_\_\_  
Orientador  
Dr. Valdir Alves Facundo/ UNIR

\_\_\_\_\_  
Dr. Renita Betero Corrêa Frigeri/ UNIR

\_\_\_\_\_  
Dr. Maria Áurea Pinheiro de Almeida Silveira/ UNIR

Porto Velho, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ .

Resultado \_\_\_\_\_

*Ofereço esse trabalho aos meus pais, Francisco Santana Filho e Maria Joana Ribeiro Torres Santana, e à minha tia Maria Aparecida Ribeiro Torres pelo incentivo moral e financeiro.*

*Por terem acreditado em mim quando nem eu mesma acreditava mais, muito obrigada!*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Dr. Valdir Alves Facundo, pela confiança, constante incentivo e principalmente por sua paciência ao me orientar.

Ao Dr. Alexandre de Almeida e Silva, pela confiança, incentivo, amizade, dedicação e enorme ajuda ao me co-orientar.

Ao CNPQ pela bolsa e pelo financiamento do projeto.

À equipe de entomologia do IPEPATRO/ FIOCRUZ-RO, pela receptividade.

À equipe do LaBein-UNIR pelos conselhos dados durante as apresentações.

A todos os amigos e familiares que contribuíram direta ou indiretamente para conclusão deste trabalho.

***“O desejo é o que torna o irreal possível”***

Nando Reis.

## RESUMO

As plantas do gênero *Piper* são de interesse aos estudos como bioinseticidas devido à grande variedade de metabólitos secundários que apresentam e por possuírem em suas células óleos voláteis, notadamente fenilpropanóides e terpenóides, com atividades inseticidas já comprovadas. O *Aedes aegypti* é o mosquito responsável pela transmissão do vírus da dengue, uma arbovirose endêmica em regiões tropicais e subtropicais do mundo. Esse mosquito tem preferência por criadouros artificiais que possam ser encontrados acumulando água, seja ocasionalmente no caso de entulhos de lixo que acumulam água de chuva, ou locais que armazenam água para a utilização humana, como piscinas e caixas d'água. Visando contribuir com a pesquisa científica em busca de novos inseticidas naturais foi realizado o estudo de semi campo com recipientes utilizados pelo mosquito para o desenvolvimento de sua forma larval (copo, garrafa pet, prato suporte para vaso de planta, garrafão de 20L, pneu), utilizando um larvicida extraído de *Piper alatabaccum*. Para a determinação da substância larvicida a ser utilizada foi realizado o estudo fitoquímico de *P. alatabaccum* e as substâncias resultantes desse estudo foram avaliadas quanto à atividade larvicida frente a larvas de *Aedes aegypti* (3<sup>o</sup>-4<sup>o</sup> instar), foram elas: extrato etanólico das folhas, fração de acetato de etila das folhas, extrato etanólico das raízes, óleo essencial das folhas, as substâncias isoladas das foahas: pipartina e 5,5',7-trimetoxi-3',4'-metilendioxiflavona; e dilapiol componente majoritário do óleo essencial, os CL<sub>50</sub> encontrados foram, respectivamente, iguais a 751, 797, 33, 160, 269, 3345, 41 ppm, determinados através do programa MINITAB utilizando-se o procedimento PROC PROBIT e distribuição de Weibull. Os valores de CL<sub>50</sub> = 33 ppm e CL<sub>90</sub> = 184 ppm encontrados para o extrato etanólico das raízes foram os menores e esse extrato foi utilizado nos experimentos de semi campo, onde a atividade larvicida foi avaliada em diferentes condições climáticas, estação chuvosa e seca. O extrato etanólico das raízes apresentou melhor atividade larvicida quando aplicado na estação seca, mantendo alto o nível de mortalidade por um período maior de tempo do que o apresentado na estação chuvosa. O extrato etanólico das raízes de *P. alatabaccum* foi considerado satisfatório para o controle de *Aedes aegypti*, o que sugere que possa ser utilizado na fabricação de novos produtos larvicidas, com baixo efeito residual, prática aplicação e de baixo custo. É importante a realização de novos estudos relacionados ao isolamento da substância responsável pela atividade larvicida e à melhor maneira de aplicação em campo.

**Palavras Chave:** mosquito da dengue, biolarvicidas, *Piper alatabaccum* e efeito residual.

## ABSTRACT

***Phytochemical study of Piper alatabaccum and evaluation larvicidal activity against Aedes aegypti Linnaeus, 1762 (Diptera: Culicidae) in conditions of simulated field.*** The plants of the genus Piper are of interest to studies like insecticides because of the wide variety of secondary metabolites that show and by having in their cells volatile oils, especially phenylpropanoids and terpenoids, with proven insecticidal activities. Aedes aegypti is the mosquito responsible for transmitting the dengue virus, an arbovirus endemic in tropical and subtropical regions of the world. This mosquito has a preference for artificial habitats that may be found accumulating water, occasionally like case of garbage that accumulate rainwater, or places that store water for human use such as swimming pools and water tanks. To contribute to scientific research in search of new natural insecticides was carried an study the simulated field with containers used by the mosquito to develop their larval form (glass, plastic bottles, dish for support potted plant, carboy of 20L, tire) using an extract of Piper alatabaccum as larvicide. For the determination of the substance to be used as larvicidal was conducted the study phytochemical of P. alatabaccum and substances resulting from this study were evaluated for larvicidal activity against Aedes aegypti larvae (3<sup>rd</sup> - 4<sup>th</sup> instar) were these: ethanol extract of leaf, fraction of ethyl extract acetate of the leaves, ethanolic extract of roots, essential oil of leaves, the isolated compounds of fohas: pipartine and 5,5',7-trimethoxy-3', 4'-metilenodioxiflavona, and dilapiol the major component of the essential oil, the LC50 were, respectively, equal to 751, 797, 33, 160, 269, 3345, 41 ppm, determined by MINITAB using the PROC PROBIT Waibull and distribution. The values of LC50 and LC90 = 33 ppm = 184 ppm found for the ethanol extract of the roots were smaller and this extract was used in experiments simulate field, where the larvicidal activity was assessed in different weather conditions, wet and dry season. The ethanol extract of the roots showed better larvicidal activity when applied in the dry season, maintaining a high level of mortality for a longer period of time than the one presented in the rainy season. The etanóloico extract of the roots of P. alatabaccum was satisfactory for the control of Aedes aegypti, suggesting that can be used in the manufacture of new larvicides products, with low effect residual and low cost. It is important to conduct further studies related to isolation of the substance responsible for the larvicidal activity and the best way to field application.

**Key word:** dengue mosquito, biolarvicides, Piper alatabaccum and residual effect.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1-</b> Espécies do gênero <i>Piper</i> encontradas no Brasil.....	19
<b>Figura 2-</b> Estrutura química da molécula de Safrol ( <b>1</b> ).....	20
<b>Figura 3-</b> Folhas, talos (A) e raízes (B) de <i>Piper alatabaccum</i> .....	26
<b>Figura 4-</b> Substâncias isoladas das folhas de <i>Piper alatabaccum</i> .....	26
<b>Figura 5-</b> Representação dos halteres em dípteros (A); e dos culicídeos macho e fêmea (B).....	28
<b>Figura 6-</b> Mosquito <i>Aedes aegypti</i> .....	29
<b>Figura 7-</b> Criadouros em potencial para <i>Aedes aegypti</i> .....	30
<b>Figura 8-</b> Estágios do ciclo de vida do <i>Aedes aegypti</i> : ovos (A), larva (B), pupa (C) e adulto (D).....	30
<b>Figura 9-</b> Distribuição da dengue, áreas tropicais e subtropicais do mundo (HealthMap 2012).....	33
<b>Figura 10-</b> Comparação da incidência de dengue nos municípios entre os meses de janeiro a março de 2010 e 2011. (BRASIL, 2011).....	33
<b>Figura 11-</b> Número de casos, número de óbitos e taxa de letalidade por Dengue grave, Rondônia, 2002 a 2011 (Fonte: adaptado de SINAN).....	34
<b>Figura 12-</b> Trituração das folhas (A) para extração do óleo essencial de <i>Piper alatabaccum</i> (B) e desenho esquemático do aparelho de Clevenger modificado (C).....	41
<b>Figura 13-</b> Organograma de partição preliminar do extrato etanólico das partes aeres de <i>Piper alatabaccum</i> .....	44
<b>Figura 14.</b> Gaiolas menores usadas para colocar as pupas e alimentar os mosquitos (A) e	

gaiolas maiores, criadouros das colônias de <i>Aedes</i> (B).....	45
<b>Figura 15-</b> Alimentação sanguínea dos adultos de <i>Aedes aegypti</i> .....	46
<b>Figura 16-</b> Recipiente para a oviposição dos <i>Aedes</i> (A) inserido no criadouro (B).....	46
<b>Figura 17-</b> Bacias utilizadas para a criação de larvas de <i>Aedes aegypti</i> .....	47
<b>Figura 18-</b> Preparo das larvas de <i>A. aegypti</i> para os experimentos (A) e preparo do teste larvicida em copos plásticos utilizando uma pipeta de precisão com volume variável (B).....	48
<b>Figura 19-</b> Bacias utilizados para o teste de efeito residual com extrato etanólico das raízes de <i>Piper alatabaccum</i> em condições de laboratório sobre larvas de <i>Aedes aegypti</i> ....	49
<b>Figura 20-</b> Recipientes escolhidos para simular a aplicação larvicida contra <i>Aedes aegypti</i> . (pneu- A, garrafão de água- B, garrafa pet- C, copo descartável- D e prato- E)....	51
<b>Figura 21-</b> Constituintes majoritários identificados no óleo essencial das folhas de <i>Piper alatabaccum</i> .....	53
<b>Figura 22-</b> Teste dose-resposta realizado com os extratos etanólicos das folhas (A), das raízes (C) e fração de acetato de etila das folhas (B) de <i>Piper alatabaccum</i> contra <i>Aedes aegypti</i> .....	61
<b>Figura 23-</b> Teste dose-resposta realizado com as substâncias isoladas de <i>Piper alatabaccum</i> : dilapiol (A) Piplartina (B) e 5',7-trimetoxi-3',4'-metilenodioxiflavona (C) contra <i>Aedes aegypti</i> .....	63
<b>Figura 24-</b> Avaliação da atividade larvicida do extrato etanólico das folhas (A), da fração de acetato de etila das folhas (B), do extrato etanólico das raízes (C) e do óleo essencial das folhas (D) de <i>Piper alatabaccum</i> contra larvas de <i>Aedes aegypti</i> . Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as concentrações testadas ( $P \leq 0,001$ ), ns indica resultado não significativo.....	64
<b>Figura 25-</b> Avaliação da atividade larvicida das substâncias isoladas de <i>Piper alatabaccum</i> : dilapiol (A) piplartina (B) e 5',7-trimetoxi-3',4'-metilenodioxiflavona (C) contra larvas de 3-4º instar de <i>Aedes aegypti</i> . Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as concentrações testadas ( $P \leq 0,001$ ), ns indica resultado não	

significativo ( $P > 0,05$ ).....	69
<b>Figura 26-</b> Efeito residual do extrato etanólico das raízes de <i>Piper alatabaccum</i> na mortalidade de larvas de <i>Aedes aegypti</i> em condições controladas (27°C 70% UR e 12hs de fotoperíodo).....	70
<b>Figura 27-</b> Mortalidade larval de <i>Aedes aegypti</i> observada no teste de semi-campo com cinco diferentes recipientes utilizando a concentração de 184 ppm do extrato etanólico das raízes de <i>Piper alatabaccum</i> . Letras diferentes indicam diferença significativa ( $P \leq 0,001$ )..	73
<b>Figura 28.</b> Média de mortalidade larval de <i>Aedes aegypti</i> em cada recipiente utilizado no teste de semi-campo realizado com extrato etanólico das raízes de <i>Piper alatabaccum</i> em duas estações climáticas distintas.....	74

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1-</b> Exemplos de metabólitos secundários isolados do gênero <i>Piper</i> .....	21
<b>Tabela 2-</b> Relação das plantas com atividade larvicida contra <i>Aedes aegypti</i> em condições laboratoriais.....	38
<b>Tabela 3-</b> Classe de substâncias presentes nos extratos etanólicos das folhas e das raízes de <i>Piper alatabacum</i> .....	52
<b>Tabela 4-</b> Constituintes químicos do óleo essencial das folhas de <i>Piper alatabaccum</i> .....	54
<b>Tabela 5-</b> Deslocamentos químicos de RMN <sup>13</sup> G e RMN <sup>1</sup> C obtido em CDCl <sub>3</sub> de PAFET-1.	56
<b>Tabela 6-</b> Deslocamentos químicos (δ) de RMN <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> ) de PAFET.....	58
<b>Tabela 7-</b> Deslocamentos químicos (δ) de RMN <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> ) de PDEF-6.....	59
<b>Tabela 8-</b> CL <sub>50</sub> e CL <sub>90</sub> para os extratos etanólicos das folhas e das raízes (EF, ER), fração acetato de etila das folhas (AEF), óleo essencial das folhas (OE) e substâncias isoladas (dilapiol, 5',7-trimetoxi-3',4'-metilenodioxiflavona e piplartina) extraídas de <i>P. alatabaccum</i> , testados como larvicidas sobre larvas de 3 <sup>o</sup> -4 <sup>o</sup> instar de <i>Aedes aegypti</i> .....	68

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
<b>1.1 FAMÍLIA PIPERACEAE.....</b>	<b>18</b>
<b>1.1.1 Gênero <i>Piper</i>.....</b>	<b>20</b>
<b>1.1.2 <i>Piper alatabaccum</i> Trel. &amp; Yunck, 1950.....</b>	<b>26</b>
<b>1.2 <i>Aedes aegypti</i> LINNAEUS, 1762 (DIPTERA: CULICIDAE).....</b>	<b>28</b>
<b>1.2.1 <i>Aedes</i> e a transmissão de doenças.....</b>	<b>31</b>
<b>1.3 CONTROLE DE PRAGAS.....</b>	<b>34</b>
<b>1.3.1 Potencial de espécies vegetais como inseticidas para <i>Aedes aegypti</i>.....</b>	<b>36</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>39</b>
<b>2.1 Objetivo geral.....</b>	<b>39</b>
<b>2.2 Objetivos específicos.....</b>	<b>39</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>40</b>
<b>3.1 ANÁLISE FITOQUÍMICA .....</b>	<b>40</b>
<b>3.2 MARCHA FITOQUÍMICA PARA A IDENTIFICAÇÃO DAS CLASSES DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS.....</b>	<b>41</b>
<b>3.3 MÉTODO PARA A IDENTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE <i>P. ALATABACCUM</i>...</b>	<b>42</b>
<b>3.4. CROMATOGRAFIA.....</b>	<b>43</b>
<b>3.4.1 partição por solventes.....</b>	<b>43</b>
<b>3.4.2 CROMATOGRAFIA EM COLUNA .....</b>	<b>44</b>
<b>3.5 CRIAÇÃO DE <i>Aedes</i> AEGYPTI.....</b>	<b>45</b>
<b>3.6 ENSAIOS LARVICIDAS EM LABORATÓRIO.....</b>	<b>47</b>
<b>3.6.1 Efeito residual em condições de laboratório.....</b>	<b>49</b>
<b>3.7 TESTE DE SEMI-CAMPO COM <i>Aedes aegypti</i>.....</b>	<b>50</b>
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>52</b>
<b>4.1 Marcha fitoquímica para a identificação das classes de metabólitos secundários.....</b>	<b>52</b>
<b>4.1.1 Teste para classe de substâncias.....</b>	<b>52</b>
<b>4.1.2 Identificação dos constituintes químicos no óleo essencial das folhas de <i>P. alatabaccum</i>.....</b>	<b>53</b>
<b>4.2 CROMATOGRAFIA: SUBSTÂNCIAS ISOLADAS.....</b>	<b>55</b>
<b>4.2.1 Identificação estrutural de PAFET-1.....</b>	<b>55</b>
<b>4.2.2 Identificação estrutural de PAFET – 2.....</b>	<b>57</b>

4.2.3	Identificação estrutural de PAFO.....	58
4.3	ATIVIDADE LARVICIDA EM LABORATÓRIO.....	60
4.3.1	teste dose-resposta.....	60
4.3.2	Testes finais para o cálculo das Concentrações Letais (CLs).....	64
4.3.3	Efeito residual em condições de laboratório.....	70
4.4	TESTE DE SEMI-CAMPO COM ESTRATO ETANÓLICO DE <i>Piper alatabaccum</i> COMO LARVICIDA PARA <i>Aedes aegypti</i> .....	72
5.	CONCLUSÃO.....	77
6.	REFERÊNCIAS.....	78

## 1. INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais pela população é um costume antigo, enquanto a humanidade procurava alimentação foi descobrindo propriedades tóxicas ou curativas das plantas (CALIXTO et al., 2003). Os vegetais são importante fonte de substâncias com ampla diversidade estrutural e de propriedades químicas que podem servir para o desenvolvimento de um grande número de fitofármacos (ALVES, 2001).

O metabolismo secundário é o responsável pela produção dessas substâncias químicas com grande variabilidade estrutural. Muitos metabólitos secundários possuem ação inseticida, pois algumas plantas ao longo da sua evolução desenvolveram sua própria defesa química contra os insetos herbívoros, como os alcalóides de *Delphinium geyeri* L. (Ranunculaceae), o monoterpeno cetônico de *Lippia stoechadifolia* L. (Verbenaceae) ou as furanocumarinas tipicamente encontradas em plantas da família Rutaceae e Apiaceae (SIMÕES et al., 2004; DEQUECH, 2008).

Por serem de fatores de interação entre organismos os metabólitos secundários são geralmente substâncias com atividade biológica, farmacologicamente e comercialmente importantes. Essas substâncias são produtos de um conjunto de reações químicas que ocorrem no interior das células vegetais em resposta a estímulos do meio ambiente, sendo que a co-evolução de plantas, insetos, microorganismos e mamíferos conduz a síntese desses metabólitos com funções principais de defesa ou atração (SIMÕES et al., 2004). Além disso, outros fatores como sazonalidade, ritmo circadiano, desenvolvimento da planta, temperatura, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, nutrientes presentes no solo e altitude também podem interferir no conteúdo dos metabólitos secundários (GOBBO-NETO & LOPES, 2007).

Existem três grandes grupos de metabólitos secundários: terpenos, compostos fenólicos e alcalóides. Os compostos fenólicos são amplamente distribuídos no reino vegetal contribuindo para o sabor, odor e coloração de diversos vegetais, sendo muitos deles economicamente importantes pela utilização como corantes de bebidas e comidas. Em ecologia química possuem função na defesa das plantas, além de participarem na interação entre vegetais e animais (SIMÕES et al., 2004).

Os terpenos sintetizados pelas plantas são os responsáveis pela maioria dos tipos de atividades biológicas, tem como principais funções a produção de hormônios de sinalização e de atração de insetos polinizadores e fitoalexinas (defesa química das plantas) (SIMÕES et al., 2004). Uma classe importante de triterpenóides são as saponinas, que desempenham o

papel de defesa contra insetos e microorganismos nas plantas. As plantas também podem desenvolver análogos de hormônios esteróides de insetos, estes são denominados fitoecdisonas que vão interferir no desenvolvimento dos insetos tornando-os estéreis (PERES, 2004).

Os flavonóides são compostos fenólicos que compõem uma ampla classe de substâncias de origem natural. Tais compostos possuem uma série de propriedades farmacológicas que os fazem atuarem sobre os sistemas biológicos (LOPES et al., 2003). Eles podem ser divididos em diferentes classes: antocianinas, flavonóis, isoflavonas, flavononas e flavonas (CHEYNIER, 2005).

Os alcalóides são compostos farmacologicamente ativos encontrados predominantemente nas angiospermas. Muitas plantas que produzem alcalóides são evitadas por animais ou insetos em sua dieta, provavelmente devido à sua toxicidade ou ao fato de que a maioria dos alcalóides tem o gosto amargo. Assim como outros metabólitos secundários os alcalóides possuem uma ação comprovada na defesa da planta contra a invasão de microorganismos e vírus (SIMÕES et al., 2004). Os alcalóides possuem atividades biológicas importantes como, por exemplo, a ação antiplasmodial do quinino, alcalóide oriundo da casca de *Chichona officinalis* L. (Gentianales: Rubiaceae), o efeito estimulante do café provocado pela cafeína e a utilização do taxol no tratamento de câncer, substância isolada da árvore *Taxus brevifolia* Nutt. (Pinales: Taxaceae) (HELDT & PIECHULLA, 2011).

Os óleos essenciais são originados do metabolismo secundário e possuem composição química complexa de substâncias lipofílica, destacando-se a presença de terpenos e fenilpropanóides (CRAVEIRO & QUEIROZ, 1993). Esses produtos voláteis podem ser extraídos de diversas partes de plantas e geralmente são compostos de alta volatilidade, odoríferos e líquidos em temperatura ambiente (SIMÕES et al., 2004). Na mistura seus componentes se apresentam em diferentes quantidades sendo um deles o majoritário existindo outros em menores quantidades e alguns em baixíssima quantidade (SOLOMONS & FRYHLE, 2006).

Os óleos essenciais também são úteis ao homem para usos medicinais como aromaterápicos, antitumorais, antioxidantes, antidepressivos, antimicrobianos, vermífugos, inseticidas e acaricidas. Além do homem, outros animais podem beneficiar-se do uso de óleos essenciais para se defenderem de predadores. As formigas sequestram citronelal das plantas e liberam-no na presença de inimigos e os cupins sequestram  $\alpha$  e  $\beta$ - pineno para causar irritação nos predadores e fazê-los desistir do ataque. Existem trabalhos que relatam a

toxicidade de óleos essenciais para uma gama de insetos, o mentol e a mentona são exemplos de inibidores de crescimento em várias espécies de larvas (SIMÕES et al., 2004).

Dentre as plantas inseticidas atualmente estudadas, destaca-se a meliácea *Azadirachta indica* A. Juss., comumente conhecida por nim. Essa planta, cuja principal substância ativa é a azadiractina, é considerada a mais importante e promissora espécie vegetal com atividade inseticida. Os bons resultados obtidos com o nim têm estimulado estudos com outras meliáceas e diversas outras famílias botânicas (WIESBROOK, 2004), no intuito de encontrar novas espécies com atividades inseticidas.

Apesar de menos pesquisada que o nim, a família Piperaceae tem se revelado bastante promissora, pois algumas de suas espécies como *Piper nigrum* L., *Piper aduncum* L. e *Piper hispidinervum* C. DC., têm demonstrado excelentes resultados em pesquisas que avaliam suas potencialidades como plantas possuidoras de atividades controladoras de pragas. Dentro deste contexto, escolheu-se *Piper alatabaccum* Trel. & Yunck para avaliar seu potencial larvicida frente ao mosquito *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762 (Diptera: Culicidae).

## 1.1 FAMÍLIA PEPERACEAE

A família Piperaceae é de distribuição tropical e subtropical, onde seus representantes são predominantemente herbáceos, existindo também trepadeiras, arbustos e raramente árvores, mas assim mesmo com madeira mole e quebradiça. O caule normalmente apresenta-se articulado com nós e entrenós. As folhas são inteiras, dispostas alternadamente e frequentemente com espículas. As flores são muito pequenas e estão sempre reunidas em inflorescências do tipo espiga (JOLY, 1993).

Incluem-se nessa família cerca de 10 gêneros, onde os dois maiores são *Piper* e *Peperomia* com aproximadamente 2000 espécies, ausentes em regiões secas (JUDD et al., 2002). No Brasil ocorrem cinco gêneros e 500 espécies (figura 3) (JOLY, 1993), aproximadamente, dentre estas algumas espécies utilizadas medicinalmente, como a pariparoba e o falso jaborandi. (SOUZA & LORENZI, 2005).

Segundo Souza & Lorenzi (2005), essa é uma família muito comum nas formações florestais brasileiras, onde espécies de *Piper* aparecem principalmente em subosques e em áreas perturbadas, sendo facilmente reconhecidas. Essa família é conhecida como a família da pimenteira, onde seus representantes mais populares são a pimenta-do-reino (*Piper nigrum*), largamente cultivada no nordeste do Brasil e a pimenta longa (*Piper hispidinervum*) (figura 1) normalmente encontrada no estado do Acre, dela é extraído o safrol (**1**) (figura 2), substância utilizada pela indústria farmacêutica e na fabricação de perfumes e cosméticos (WEBERLING & SCHWANTES, 1986; MAIA et al., 1987).

**Figura 1-** Espécies do gênero *Piper* encontradas no Brasil.



***Piper auritum***



***Piper nigrum***



***Piper hispidinervum***



***Piper arboreum***



***Piper hispidum***



***Piper marginatum***

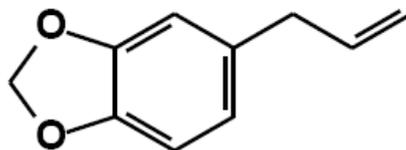


***Piper aduncum***



***Piper longum***

**Figura 2-** Estrutura química da molécula de Safrol (1).



### 1.1.1 Gênero *Piper*

*Piper* é um gênero de plantas herbáceas ou ligeiramente lenhosas de regiões quentes e úmidas do mundo (WU et al., 1997). Possuem folhas alternadas, opostas, verticiladas ou basais e frequentemente apresentam glândulas contentoras de óleo aromático. Os pecíolos dessas plantas geralmente apresentam bainha recobrindo o caule; sua inflorescência é simples, axial ou terminal; as flores são pequenas, sem perianto, usualmente verdes, podendo ser esbranquiçadas ou amareladas, raramente são vermelhas ou mais escuras (RIBEIRO et al., 1999).

Segundo Ribeiro et al. (1999) os frutos de *Piper* são drupáceos carnosos ou secos e a polinização e dispersão são geralmente feitas pelo vento. Podem ser usados como condimentos e comercialmente, ainda existem espécies usadas na produção de óleos essenciais.

As plantas do gênero *Piper* são de interesse à farmacologia devido à grande variedade de metabólitos secundários que apresentam (alcalóides, flavonóides, arilpropanóides e lignanas) (JUDD et al., 2002; FACUNDO, 2008). Segundo Dyer et al. (2004) apenas 10% das espécies de *Piper* conhecidas foram investigadas quanto a sua fitoquímica, sendo que em 112 espécies estudadas foram encontradas 667 substâncias, distribuídas em 190 alcalóides/ amidas, 49 lignanas, 70 neolignanas, 97 terpenos, 39 propenilfenóis, 15 esteróides, 18 kavapironas, 17 chalconas/ dihidrochalconas, 16 flavonas, 6 flavononas, 4 piperolidinas e 146 diversos compostos que não se encaixam nos principais grupos de metabólitos secundários.

Muitas espécies de *Piper* são usadas para fins curativos em diversas culturas (BEZERRA et al., 2007). O histórico do gênero *Piper* descrito por Parmar *et al.* (1997), relata o uso de espécies para o tratamento de algumas enfermidades em diferentes povos. Na China, algumas prescrições recomendam o uso das folhas de *P. futokasura* no tratamento de arritmias cardíacas e de asma. Na Jamaica dores estomacais são tratadas com uma infusão das folhas de

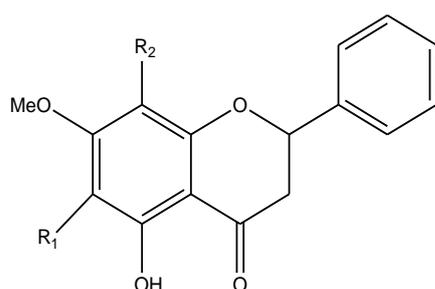
*P. aduncum* e *P. hispidum*. No México e no Brasil, usam-se as folhas de *P. amalago* para aliviar dores estomacais e no combate a diversas infecções. Folhas e talos de *P. marginatum* e *P. tuberculatum* são utilizadas, na Paraíba, contra picada de cobra e como sedativos (CHAVES et al., 2006; ARAÚJO-JUNIOR et al., 1999).

Silva et al. (2007) demonstraram que os extratos das folhas e raízes de *P. aduncum* apresentaram atividades inseticida sobre adultos de *Aetalion sp.* (Hemiptera: Aetalionidae) (cigarrinha). Os óleos essenciais das partes aéreas de plantas dessa espécie, coletadas em diferentes localidades da região Amazônica, apresentaram grandes concentrações do fenilpropanóide dilapiol, o qual foi considerado o responsável pelo efeito inseticida relatado por Maia et al. (1998). Foi divulgada a atividade larvicida, contra o *Aedes aegypti*, do óleo essencial de quatro espécies de *Piper* da região Amazônica, *P. gaudichaudianum*, *P. permucronatum*, *P. humaytanum* e *P. hostmanianum* (MORAES et al., 2007).

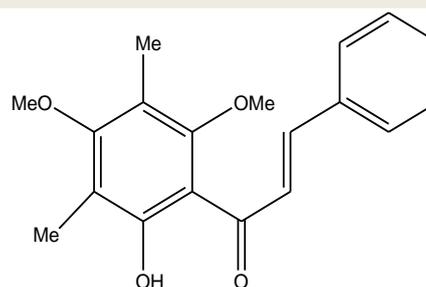
As espécies do gênero *Piper* estudadas sob o ponto de vista fitoquímico apresentaram uma grande variedade de metabólitos secundários (tabela 1), como flavonóides (2-10), alcalóides (11-17), lignanas (18-27), fenilpropanoídes (28-32), cromenos (33-37), terpenos/esteróides (38-45) (SENGUPTA & RAY 1987; PARMAR et al., 1997; BENEVIDES et al., 1999; AHMAD & TAWAN, 2002).

**Tabela 1-** Exemplos de metabólitos secundários isolados do gênero *Piper*.

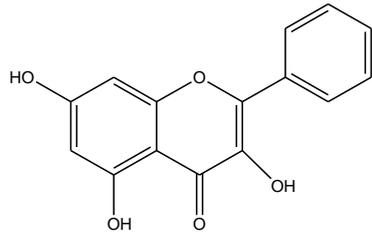
#### Flavonóides



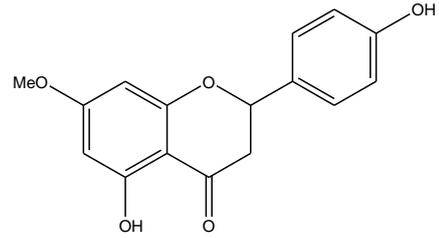
- (2) R<sub>1</sub>=Me; R<sub>2</sub>=H - 5-hidroxi-7-metoxi-6-metilflavanona  
 (3) R<sub>1</sub>=H; R<sub>2</sub>=OMe - 5-hidroxi-7-metoxi-8-metilflavanona  
 (4) R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>=Me - 5-hidroxi-7-metoxi-6,8-dimetilflavanona



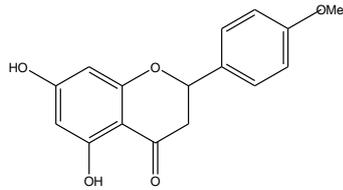
- (5) 2'-hidroxi-4',6'-dimetoxi-3',5'-dimetilchalcona



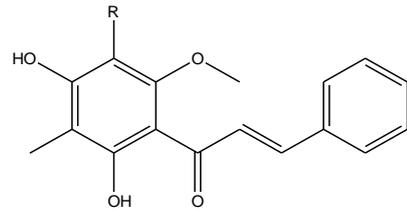
(6) galangina



(7) 5,4'-dihydroxy-7-methoxyflavanone



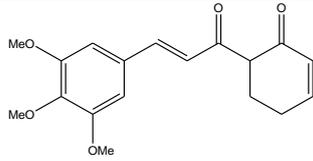
(8) 5,7-dihydroxy-4'-methoxyflavanone



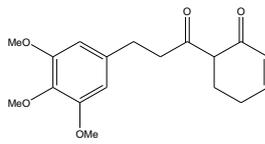
(9) R=H 2',4'-dihidroxi-6'-metoxi-3'-metilchalcona

(10) R=Me 2',4'-dihidroxi-6'-metoxi-3',5'-dimetilchalcona

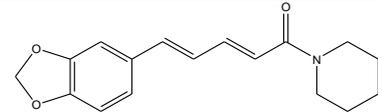
### Alcalóides



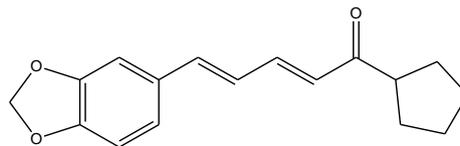
(11) pipartina



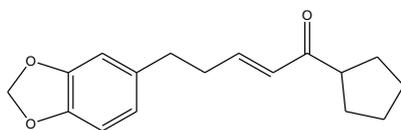
(12) dihidropipartina



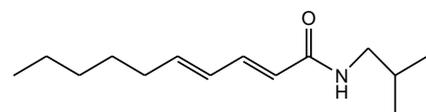
(13) piperina



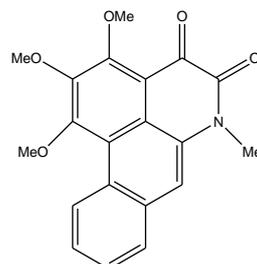
(14) piperilina

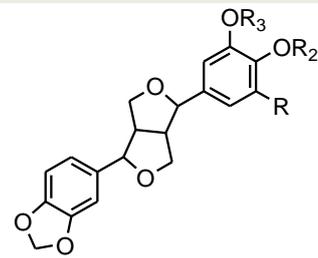
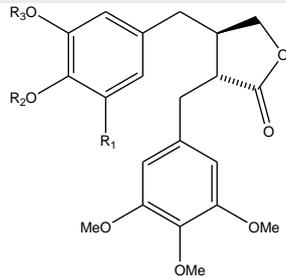
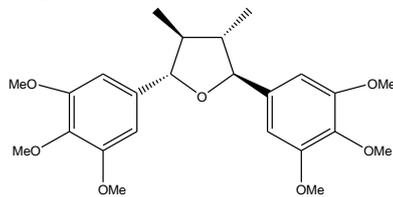
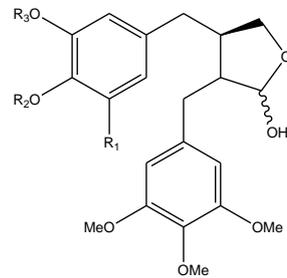
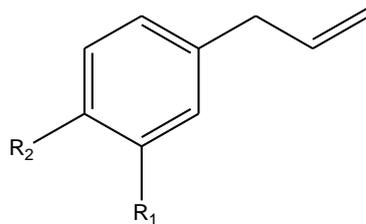
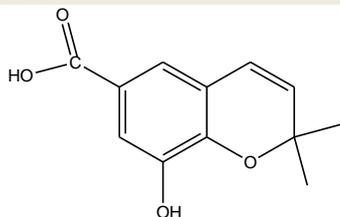
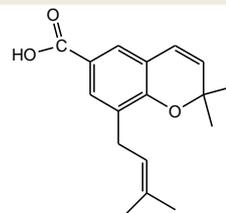


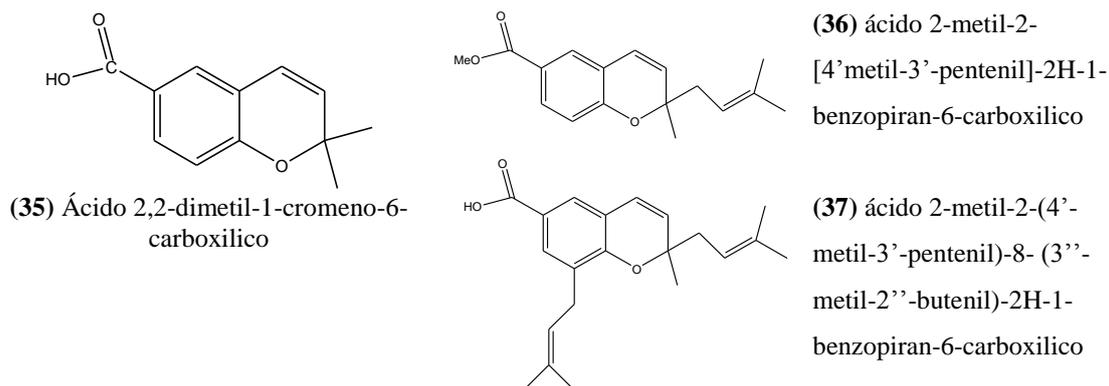
(15) dihidropiperilina



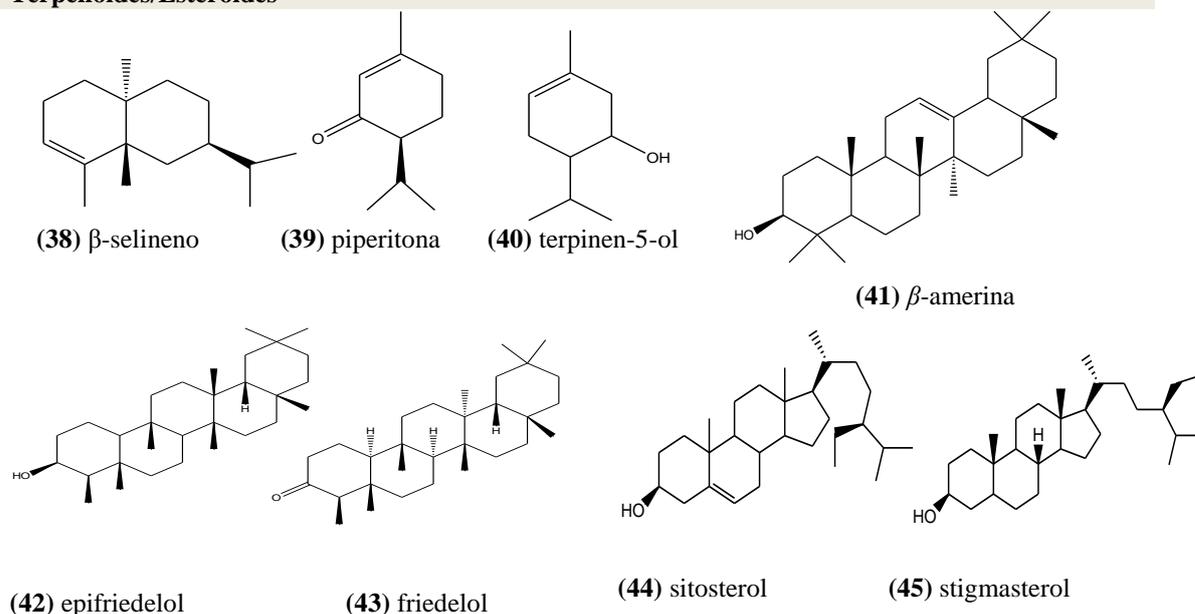
(16) pelitorina



**(17)** 1,2,3-trimetoxi-4,5-dioxi-6',7-deidroporfina**Lignanas****(18)** R<sub>1</sub>=OMe, R<sub>2</sub>=R<sub>3</sub>=Me Cubebininoide**(19)** R<sub>1</sub>=OMe, R<sub>1</sub>+R<sub>3</sub>=CH<sub>2</sub> Cubebinome**(20)** R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=R<sub>3</sub>=CH<sub>2</sub> Yatein**(21)** R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=R<sub>3</sub>=Me Di-*O*-metil tujapiclatin metil éter**(22)** R<sub>1</sub>=OMe, R<sub>2</sub>=R<sub>3</sub>=Me**(23)** R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=R<sub>3</sub>=CH<sub>2</sub>**(24)** grandisina**(25)** R<sub>1</sub>=OMe, R<sub>1</sub>=R<sub>3</sub>=Me cubebinin**(26)** R<sub>1</sub>=H, R<sub>1</sub>=R<sub>3</sub>=CH<sub>2</sub> clusin**(27)** R<sub>1</sub>=OMe, R<sub>2</sub>=R<sub>3</sub>=CH<sub>2</sub> 7-metoxiclusin**Fenilpropanóides****(28)** R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>=OAc**(29)** R<sub>1</sub>=OMe; R<sub>2</sub>=OH**(30)** R<sub>1</sub>=OAc; R<sub>2</sub>=OMe**(31)** R<sub>1</sub>=H; R<sub>2</sub>=OH**(32)** R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>=OCH<sub>2</sub>O**Cromenos****(33)** 8-hidroxi-2,2-dimetil-2H-cromeno-6-carboxilato de metila**(34)** 2,2-dimetil-8(3-metil-2-butenil)-2-cromeno-6-carboxilato de metila



### Terpenoides/Esteroides



Muitas substâncias isoladas de Piperaceae têm demonstrado os mais variados efeitos farmacológicos podendo ser utilizadas como princípio ativo em diferentes tipos de drogas, as amidas (14) e (15) isoladas de *P. arboreum*, apresentam atividade antifúngica e tripanossomicida (REGASINI et al., 2009a; REGASINI et al., 2009b) e as amidas (11-13) isoladas de varias espécies de *Piper*, também apresentam atividade antifúngica (NAVICKIENE et al., 2000). A lignana (24) isolada de *Piper cubeba*, apresenta atividades antiinflamatória, analgésica e bactericida (REZENDE et al., 2011). O fenilpropanóide (1), extraído do óleo essencial de *Piper hispidinervium*, é utilizado na síntese de piperonal, um fixador de fragrância e butóxido de piperonila, um inseticida sinergista (MAIA et al., 1987).

Estudos realizados com *P. chaba* concluíram que amidas isoladas do fruto dessa espécie possuem atividade anti-diabetes (ZHANG et al., 2008). Com o resultado do estudo químico e biológico realizado em *Piper sarmentosum* pode-se comprovar a atividade anti-tuberculose e antiplasmodial de amidas e lignanas isoladas (RUKACHAISIRIKUL et al.,

2004). Essa mesma espécie em outro estudo, realizado por Ridditid et al. (1998), demonstrou atividade de bloqueio neuromuscular sugerindo o uso da *P. sarmentosum* C. DC. em estudos relacionados ao alívio de dores musculares.

Estudos com óleos de *Piper* têm sido conduzidos, tanto para a caracterização química quanto para a elucidação de suas atividades biológicas. As espécies: *Piper arboreum* Aubl., *P. dilatatum* Rich. e *P. hispidum* Sw., apresentaram variação nos componetes dos óleos essenciais de acordo com a mudança de região de coleta (POTZERNHEIM et al., 2006) e as *P. hispidinervum* C. CD., *P. hostmannianum* (Miq.) C. CD. e *P. permucronatum* Yunck. demonstraram ser altamente inseticidas, a primeira contra *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) (FAZOLIN et al., 2007) e as outras duas para *Aedes aegypti* (MORAIS et al., 2007).

O extrato bruto do fruto de *Piper tuberculatum* Jacq., conhecida como pimenta longa, foi testado no controle do curuquerê-do-algodoeiro (*Alabama argillacea*, Lepdoptera: Noctuidae) apresentando efeito tóxico agudo contra lagartas de 3º instar (MIRANDA et al., 2002) sendo considerado um potencial inseticida, assim como o óleo de *P. aduncum* L. e de *P. hispidinervum* para o controle do caruncho *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) e de *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) popularmente conhecido como gorgulho do milho (PEREIRA et al., 2008; ESTRELA et al., 2006).

O estudo realizado por Quignard et al. (2004) com 21 plantas oriundas da região Amazônica mostra que o extrato das espécies *Piper hostmannianum*, *P. aduncum* e *P. tuberculatum* se destacaram ficando entre as mais ativas contra *Artemia franciscana* (Anostraca: Artemiidae), conhecida popularmente como camarão -de -salmoura. O extrato de *Piper nigrum* L. (caule e folha), foi analisado como moluscicida contra *Biomphalaria tenagophila* (Basommatophora: Planorbidae), hospedeiro intemediário do parasita causador da esquistossomose, obtendo boa atividade para o extrato do caule que causou 100% de mortalidade em todas as concentrações utilizadas (PAULA et al., 2011) e as *Piper*: *P. aduncum*, *P. crassinervium* H.B. & K., *P. cuyabanum* C. DC., *P. diospyrifolium* Kunth. e *P. hostmannianum* também apresentaram efeito moluscicida no trabalho realizado por Rapado et al. (2009).

### 1.1.2 *Piper alatabaccum* Trel. & Yunck, 1950

Essa espécie é conhecida como João Brandinho e suas raízes são utilizadas popularmente como anestésico bucal local, comumente apresenta-se na forma de arbusto, possui folhas semi-coriáceas e ramos rígidos com nós muito evidentes. É frequentemente encontrada no Suriname, na Guiana Francesa e no Norte do Brasil (RIBEIRO et al., 1999) (figura 3).

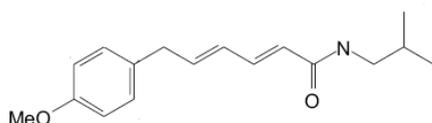
**Figura 3-** Folhas, talos (A) e raízes (B) de *Piper alatabaccum*.



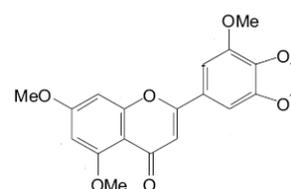
Fonte: Santana, H. T. (2009).

O estudo fitoquímico das folhas e talos de *P. alatabaccum* levou ao isolamento e identificação de quatro compostos. Sendo estes, dois alcalóides piplartina (**11**) e dihidropiplartina (**12**), uma amida, piperovatina (**46**) e uma flavona, 5,5',7-trimetoxi-3',4'-metilendioxiflavona (**47**) (figura 4) (FACUNDO et al., 2005).

**Figura 4-** Substâncias isoladas das folhas de *Piper alatabaccum*.



(46) Estrutura da amida piperovatina



(47) Estrutura da flavona 5,5',7-trimetoxi-3',4'-metilendioxiflavona

Sua atividade anestésica pode estar relacionada à presença da amida piperovatina (46) que é conhecida por possuir essa propriedade (McFERREN & RODRIGUEZ, 1998), essa substância também já foi isolada em outras espécies do gênero *Piper* e *Ottonia* (FACUNDO et al., 2004; McFERREN et al., 2002).

A piplartina possui conhecida atividade antifúngica (NAVICKIENE et al., 2000), outros estudos apontam essa substância como antidepressiva e redutora de ansiedade em testes realizados com ratos (FELIPE et al., 2007), e também com atividade relacionada à reversão de efeitos tóxicos das células tumorais em estudo realizado por Bezerra et al., (2006a). A piplartina, a dihidropiplartina e a flavona 5,5',7-trimetoxi-3',4'-metilenodioxiflavona foram avaliadas quanto a sua atividade larvicida contra o transmissor da malária *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae) obtendo bons resultados (TRINDADE et al., 2012).

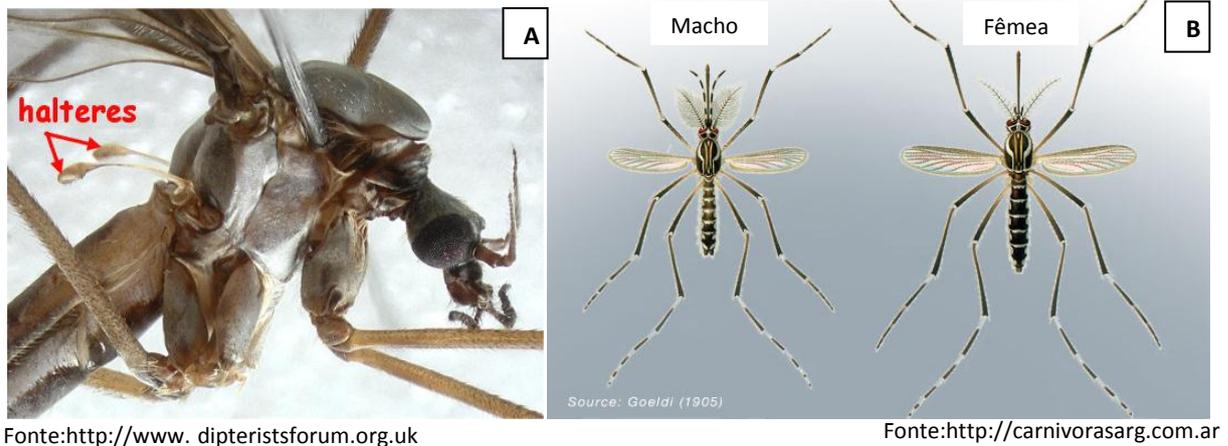
A flavona (47) foi isolada pela primeira vez nas raízes em *Bauhinia championii* Benth. (Fabaceae) (CHEN et al., 1984), posteriormente das sementes dessa mesma planta (CHEN et al., 1994) e foi encontrada também em *Neoraputia paraensis* Duck. (Rutaceae) (SOUZA et al., 1995). No estudo de realizado por Chen et al. (1986) este composto não apresentou atividade antifúngica, bactericida nem antiprotozoário.

Não obstante, essa espécie apresenta propriedades promissoras para aplicação em diferentes áreas farmacológicas e/ou como larvicida, no entanto, poucos trabalhos científicos têm sido produzidos com a mesma, mas, estudos preliminares têm demonstrado uma possível ação inseticida do extrato dessa *Piper* contra *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae), atividade farmacológica frente à *Leshimania* (ALPIREZ, 2006) e ação inibitória da atividade fosfolipásica dos venenos de serpentes do gênero *Bothrops* (SILVA, 2009).

## 1.2 *Aedes aegypti* LINNAEUS, 1762 (DIPTERA: CULICIDAE)

A família Culicidae pertence à ordem Diptera, uma ordem com um grande número de espécimes, todos contendo asas anteriores funcionais e posteriores reduzidas a pequenas protuberâncias recebendo o nome de halteres, essa estrutura parece estar relacionada ao equilíbrio e à orientação durante o voo (RUPPERT & BARNES, 1996; CONSOLI & OLIVEIRA, 1998) (figura 5).

**Figura 5-** Representação dos halteres em dípteros (A); e dos culicídeos macho e fêmea (B).



O *Aedes aegypti* é um inseto de pequeno porte e de corpo delgado pertencente à família Culicidae. Os insetos pertencentes a essa família são chamados popularmente de mosquitos, muriçocas ou pernilongos e têm a característica de se desenvolvem seus primeiros estágios de vida (larva e pupa) em águas de vários tipos, onde comportam-se como animais aquáticos, porém retirando o oxigênio diretamente do ar. Quando adultos nutrem-se de néctar de flores e suco de frutos que são essenciais para a sobrevivência de muitas espécies, contudo, o repasto sanguíneo feito pelas fêmeas dos mosquitos, com exceção da subfamília Toxorhynchitinae, é imprescindível para a maturação dos ovos. Este hábito, chamado de hematofágico, torna essa família de extrema importância para a epidemiologia e para o controle de doenças transmissíveis como, por exemplo, malária, filariose, febre amarela e dengue (FORATTINI, 1996; REY, 1992).

O *Aedes aegypti* é originário do continente africano e acompanhou o homem em suas migrações pelo mundo sendo carregado em embarcações, trens, automóveis e aviões, podendo hoje ser considerado um mosquito cosmopolita, por ter se adaptado às regiões tropicais e subtropicais do globo. No Brasil o *A. aegypti* foi combatido e erradicado em 1955 por ser o vetor da febre amarela, entretanto, países vizinhos (Guianas e Venezuela) não obtiveram o mesmo sucesso contra o mosquito e, novamente, por meio de transportes humanos, principalmente embarcações, houve a recolonização do mosquito no Brasil, sendo reencontrado em 1967 em Belém do Pará e em 1977 no Rio de Janeiro (CONSOLI & OLIVEIRA, 1998).

O gênero *Aedes* possui mais de 500 espécies de mosquitos rajados, de colorido geral escuro com manchas brancas no corpo (figura 6) distribuídos geograficamente entre as latitudes 40° N e 40°S (REY, 1992).

**Figura 6-** Mosquito *Aedes aegypti*.



Em geral, a fêmea de culicídeos faz uma postura após cada repasto sanguíneo, entretanto o *A. aegypti* mais do que qualquer outra espécie, ao menor movimento a fêmea abandona o hospedeiro e assim alimenta-se mais de uma vez antes de estar totalmente ingurgitada. Essa característica aumenta a possibilidade do mosquito se contaminar e de transmitir o vírus (CONSOLI & OLIVEIRA, 1998). Uma única cópula assegura a fecundidade por toda a vida do inseto. Os ovos são depositados em grande número de 10 a 100 por vez, depositados acima do nível da água, onde as desovas se repetem com intervalos de 4 a 5 dias, sempre precedidas de repasto sanguíneo. Cada fêmea vive em média dois meses e durante esse tempo alimenta-se cerca de 12 vezes, ovipondo um total de 300 a 750 ovos (FORATTINI et al., 2001).

Além da transmissão de doenças, a presença de grandes populações do mosquito causa incômodos, prejuízos ao turismo e limitações ao trabalho e lazer, em função desses problemas a população desse mosquito tem que ser controlada, eliminando-se o mosquito, seus criadouros e larvas (MONNERAT et al., 2006).

Os *Aedes* produzem ovos resistentes à dessecação, podendo permanecer por mais de ano em ambiente seco sem prejudicar a eclosão da larva, que ocorre caso haja o contato com a água. O *A. aegypti* tem por preferência criadouros artificiais, tanto os abandonados pelo homem como copo descartável, pneu, garrafa pet, ou qualquer recipiente que possa ser ocasionalmente preenchido pelas águas das chuvas; como também aqueles que são utilizados para armazenar água doméstica, como caixas d'água, piscinas, aquários abandonados, dentre outros (figura 7) (CONSOLI & OLIVEIRA, 1998).

Esse vetor tem preferência por reservatórios com águas limpas, entretanto ele se adapta muito bem a outros tipos de ambientes, pois seu habitat está intimamente relacionado às condições domiciliares ou peridomiciliares ofertadas pelo modo de vida das populações humanas, logo, o *A. aegypti* consegue se desenvolver também em águas com alto nível de poluição como esgotos domésticos, desde que não haja nenhuma barreira que impeça a exposição do sifão respiratório das larvas (BESERRA et al., 2009).

**Figura 7-** Criadouros em potencial para *Aedes aegypti*.



Fonte: <http://precisodisso.com.br>

O *A. aegypti* tem sua densidade populacional diretamente influenciada pela presença de chuvas, nesse período a população alcança níveis elevados e de importância para fins de transmissão do patógeno (CONSOLI & OLIVEIRA, 1998). Em condições de laboratório já foi comprovado que a amplitude de temperatura favorável ao ciclo de vida do *Aedes* (que encontra-se entre 22°C e 30°C) proporciona o estabelecimento do vetor durante todo o ano, e de acordo com as médias de temperatura de cada região, todos os municípios brasileiros apresentam condições favoráveis ao estabelecimento do vetor, permitindo a ocorrência de mais de 20 gerações anuais de *A. aegypti* (BESERRA et al., 2006).

Os estágios básicos do ciclo de vida do mosquito são ovos, larva, pupa e adulto, essas fases são divididas em ínstaes, separados por mudas. As larvas passam por quatro ínstaes, na medida em que se alimentam e crescem passam para o ínstar seguinte. Ao final da sequência o estágio juvenil se transforma em uma pupa e então ocorre a metamorfose para adulto (figura 8).

**Figura 8-** Estágios do ciclo de vida do *Aedes aegypti*: ovos (A), larva (B), pupa (C) e adulto (D).



Fonte: Santana, H. T.(2009)

### 1.2.1 *Aedes* e a transmissão de doenças.

Em 1906 Bancroft *apud* Consoli & Oliveira (1998), descobriu que a transmissão da dengue se dava pelo mesmo vetor da febre amarela, o *Aedes aegypti*. Além do *A. aegypti* o *Aedes albopictus* Skuse. também pode transmitir a doença, sendo o vetor de manutenção da dengue na Ásia, entretanto essa espécie não tem sido associada à transmissão da doença no Brasil (VAZEILLE et al., 2003; FORATTINI et al., 2001).

O *A. aegypti* também é vetor do vírus causador da febre chikungunya- CHIKV, uma doença semelhante à dengue que é caracterizada por severas, e às vezes persistentes, dores nas articulações (artrite), seguida de febre e erupção cutânea. Essa doença raramente é fatal, e apresenta um perfil epidemiológico diferenciado com grandes epidemias que aparecem e desaparecem normalmente com um período inter-epidêmico de 7-8 anos. Após um longo período de ausência essa doença tem causado infecções significantes no sul e no oeste da África, no sudeste e sul da Ásia. Em 2006 na Índia causou mais de 1,38 milhões de casos, até o momento não existem casos autóctones no Brasil (WHO, 2010; BRASIL, 2010).

Martín et al. (2010) fizeram o levantamento dos casos de dengue durante o período de 1980 a 2007 e concluíram que vários fatores podem estar envolvidos no aumento de casos da doença na América, dentre eles a ocorrência de *Aedes albopictus* nas áreas rurais, este pode ter desenvolvido um importante papel na manutenção do ciclo do vírus na ausência do *A. aegypti*. Outro fator de peso no crescimento de casos da doença, segundo o autor, foi o crescimento populacional desordenado, sem infra-estrutura e de condições sanitárias precárias.

A dengue, assim como a febre amarela, é uma arbovirose causada por um vírus pertencente à família *Flaviviridae*, essa doença tem quatro sorotipos diferentes, denominados: DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4 (CONSOLI & OLIVEIRA, 1998). A contaminação do mosquito vai ocorrer quando o humano infectado estiver no período de viremia, ou seja, com o vírus no sangue, sendo que esse período começa um dia antes do aparecimento da febre e vai até o 6º dia da doença. No mosquito o vírus se aloja nas glândulas salivares, onde vai se multiplicar durante 8 a 12 dias de incubação e só após este período o mosquito é capaz de transmitir a doença (BRASIL, 2005). A doença manifesta-se em geral com febre alta de início abrupto, cefaléia (dor de cabeça) aguda e dor retro-orbitária (atrás dos olhos). Os sintomas aparecem 3-14 dias após a picada infecciosa e ainda não existem medicamentos antivirais específicos para a dengue (CASEIRO et al., 2003; WHO, 2010).

Os aspectos clínicos da doença podem ser infecção assintomática com febre leve da dengue clássica, febre hemorrágica da dengue (FHD) que é dividida em 4 níveis crescentes de gravidade sendo o III e o IV grau também chamados de síndrome do choque da dengue (SCD), que é frequentemente fatal devido à permeabilidade dos capilares e extravasamento do plasma sanguíneo; por fim, têm-se a dengue com complicações que é um caso normal que evolui para a forma grave, mas não possui todos os critérios da FHD (BRASIL, 1998).

Quando ocorre a infecção por um tipo de dengue as infecções sucessivas tendem a ter maior potencial de letalidade, o que dificulta ainda mais a criação de uma vacina para essa doença. Uma vacina deveria conter amostras de menor virulência dos quatro tipos de vírus, um produto ajustado para produzir imunidade para cada um dos quatro tipos. Entretanto não se sabe ao certo se uma pessoa imunizada por esta vacina estará realmente protegida ou se a vacina será responsável pelo agravamento de infecções que ocorrerem após a imunização. Outra dificuldade é a ausência de algum animal que manifeste a doença da mesma forma que em humanos, no qual possam ser realizados os testes (SCHATZMAYR, 2003).

O primeiro surto de dengue registrado no Brasil ocorreu em Boa Vista, Roraima, em 1982, após a expansão da epidemia na América Central e no Caribe, causada pelo sorotipo DEN-1 e DEN-4, em seguida tornou-se endêmica nas regiões Sudeste e Nordeste, na década de 90 nas regiões Centro-Oeste e Norte. Após a introdução do sorotipo 2 do vírus em 1990 foram registrados os primeiros casos de febre hemorrágica do dengue (VASCONCELOS et al., 1993, PIMENTA & SILVA, 2001).

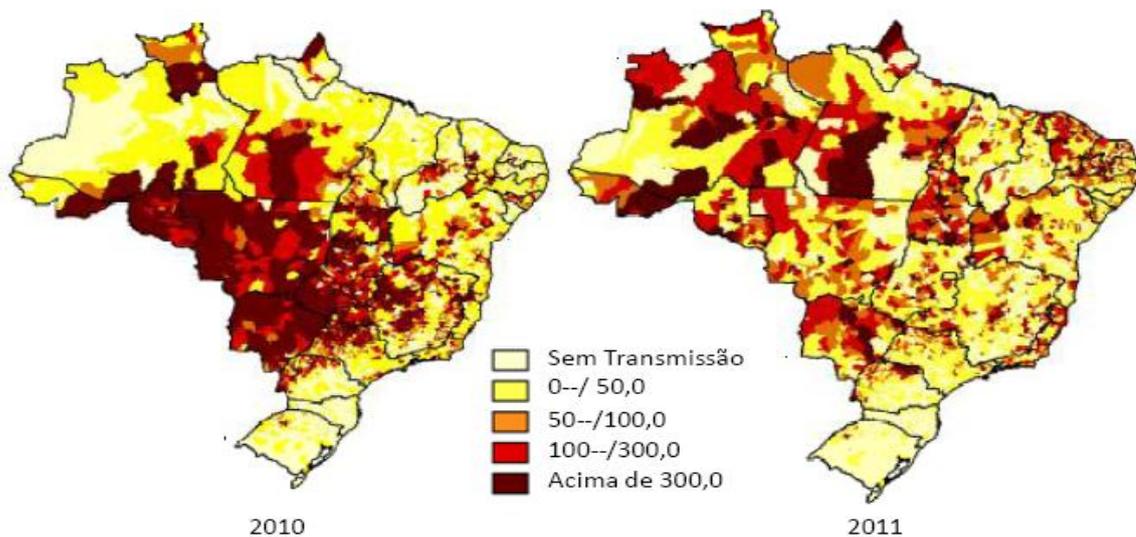
Quase 3 bilhões de pessoas vivem em países tropicais e subtropicais onde a dengue ocorre e estima-se que 50-100 milhões de infecções ocorram a cada ano. O vírus da dengue ocorre em mais de 100 países na região Ásia-Pacífico, Américas, Oriente Médio e África (WHO, 2010) (figura 9).

**Figura 9-** Distribuição da dengue, áreas tropicais e subtropicais do mundo (HealthMap 2012).



No Brasil, em 2011, registrou-se 721.543 casos de dengue, comparando-se com 2010 houve uma redução de 24% no total de casos notificados. Entretanto na região Norte houve um aumento de 47% em relação ao ano anterior, sendo que foram confirmados aproximadamente 113.638 casos de dengue. Os municípios de Manaus (AM) e Rio Branco (AC) apresentam os maiores números de casos notificados, com 53.668 e 16.677 casos, respectivamente. Esses dois municípios foram responsáveis por 62% dos casos notificados na região (BRASIL, 2011) (figura 10).

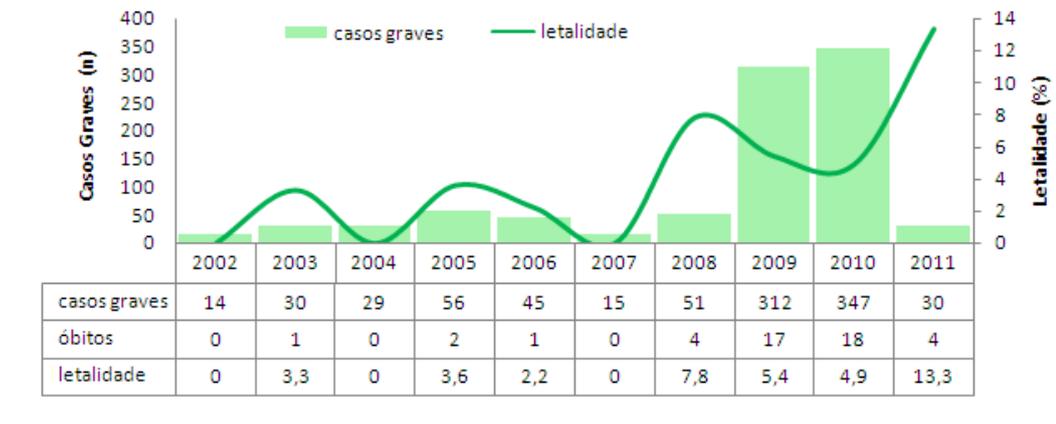
**Figura 10-** Comparação da incidência de dengue nos municípios entre os meses de janeiro a março de 2010 e 2011. (BRASIL, 2011).



Em relação ao ano de 2010, em 2011 no estado de Rondônia observou-se a diminuição de notificações da doença de 18.578 para 3.245 com incidência de 207,95 casos por 100.000 habitantes.

Houve uma diminuição de 91,4 % na ocorrência de casos graves da doença e de 77,8% no número de casos que chegaram a óbito, entretanto comparando os casos graves e a quantidade de óbitos pode-se observar que a letalidade desses casos agravados foi alta, o que indica que a doença esta sendo mais severa (figura 11). Das 103 amostras analisadas em Rondônia foram isolados apenas os sorotipos DEN-1 e DEN-2 (BRASIL, 2011).

**Figura 11-** Número de casos, número de óbitos e taxa de letalidade por Dengue grave, Rondônia, 2002 a 2011 (Fonte: adaptado de SINAN).



### 1.3 CONTROLE DE PRAGAS

O desenvolvimento de inseticidas que permanecem ativos por períodos longos foi um dos mais importantes avanços no controle de insetos acontecidos no século XX. O primeiro inseticida de efeito prolongado, ou propriedade residual, foi o dicloro-difenil-tricloroetano (DDT), um organoclorado desenvolvido durante a Segunda Guerra Mundial, que, quando aplicado em paredes e tetos de casas, permanecia ativo contra os insetos por vários meses (ROZENDAAL, 1997), assim como o BHC, o Aldrin, o Dieldrin e o Clordano (CORRÊA & VIEIRA, 2007).

Até a descoberta dos inseticidas organossintéticos, na primeira metade do século passado, as substâncias extraídas de vegetais eram amplamente utilizadas. As variações na eficiência do controle, devido às diferenças na concentração do ingrediente ativo entre plantas

e, principalmente, o baixo efeito residual que apontava à necessidade de várias aplicações em períodos curtos fizeram com que os inseticidas vegetais fossem gradativamente substituídos pelos sintéticos (organoclorados e/ou fosforados) (SIMÕES et al., 2004; COSTA et al., 2004).

Entretanto, produtos químicos sintéticos acarretam diversos problemas, tais como resíduos nos alimentos e intoxicação de aplicadores. Esses inseticidas possuem amplo espectro de atividades e exterminam indiscriminadamente os insetos considerados pragas, assim como, aqueles benéficos ao homem, sem contar com o fato dos insetos adquirirem resistência aos inseticidas de tal forma que sempre havia a necessidade de aplicações de quantidades cada vez maiores causando danos ecológicos e poluição ao meio ambiente (SALEHZADEH *et al.*, 2002; ROEL et al., 2000). Devido aos danos causados pelo uso indiscriminado dos produtos sintéticos, a procura por “bioinseticidas”, como são chamados os inseticidas de origem vegetal, aumentou (MIRANDA et al., 2002; SIMÕES et al., 2004).

O uso de extrato de plantas como inseticidas vem sendo estudado como alternativa no manejo integrado de pragas, pois o extrato aplicado associado a outras práticas potencializa o efeito inseticida desejado de forma a reduzir a quantidade de extrato utilizada, diminuindo também a procura pela matéria-prima (COSTA et al., 2004).

Para um inseticida ser comercialmente viável, ele não pode ser apenas eficaz, mas deve preencher uma série de requisitos, como seletividade contra inimigos naturais (baixa toxicidade ambiental), baixa toxicidade em mamíferos, biodegradabilidade e ausência de fitotoxicidade, dentre outros critérios práticos que devem ser preenchidos como matéria-prima abundante e de baixo custo, facilidade no cultivo da planta-fonte de maneira a padronizar e potencializar a produção do composto ativo e possibilidade para patentear a substância inseticida. Mesmo com tantos critérios alguns inseticidas botânicos estão disponíveis comercialmente, como é o caso do piretro, da rotenona, do nim, da sabadila e da riânia (CORRÊA & VIEIRA, 2007; WIESBROOK, 2004).

Estudos realizados por Pereira et al. (2008) comprovaram a ação inseticida de componentes extraídos de 10 plantas diferentes em *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae), praga do caupi. Outro teste realizado por Roel e colaboradores (2000) comprovou a ação inseticida de *Trinchilia pallida* Swartz (Meliaceae) contra a lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda*, Lepidoptera: Noctuidae); Fazolin et al. (2005) testaram o óleo essencial de *Piper aduncum* em adultos de *Cerotoma tingomarianus* (Coleoptera: Chrysomelidae) obtendo resultados satisfatórios. Inúmeros estudos comprovam a ação inseticida de plantas contra uma grande diversidade de pragas, apesar das vantagens do uso de inseticidas botânicos, estudos feitos até o momento apontam para uma série de limitações ao

uso desses produtos em campo, como por exemplo, a falta de dados a aspectos relacionados à fito toxicidade, ou seja a possível toxicidade da planta inseticida no desenvolvimento de outras plantas, à persistência e aos efeitos sobre organismos benéficos (COSTA et al., 2004).

Estes produtos podem apresentar desvantagens como a rápida degradabilidade, que embora seja uma característica favorável ao meio ambiente e à saúde humana, pode significar maior número de aplicações do inseticida. Outra desvantagem está associada à toxicidade, apesar de em geral os derivados botânicos serem menos tóxicos do que os sintéticos aqueles também podem causar danos como é o caso da rotenona e da nicotina, que são prejudiciais aos peixes e aos humanos. Além disso, há uma escassez de dados quanto à toxicidade crônica relacionada ao uso prolongado do inseticida de origem vegetal (WIESBROOK, 2004). Sendo assim ainda são necessários estudos relacionados ao isolamento de princípios ativos, da mesma forma que técnicas de conservação e aplicação desses produtos (COSTA et al., 2004).

### 1.3.1 Potencial de espécies vegetais como inseticidas para *Aedes aegypti*

Para se combater o mosquito *A. aegypti*, inúmeros pesquisadores têm desenvolvido estudos com as mais diversas substâncias naturais que possam ter efeito ovicida, larvicida ou adulticida e assim contribuir com o desenvolvimento de produtos inseticidas menos agressivos ao meio (CARVALHO et al., 2001; SIMAS et al., 2007). O controle convencional de *A. aegypti* se dá através da aplicação de organofosforados, porém o uso indevido desses produtos acabou por selecionar os mosquitos a eles resistentes, tornando assim necessária a fabricação e aplicação de novos inseticidas (MACORIS, et al., 1999)

Estudos focados em produtos naturais, sendo eles: extratos de plantas, óleos essenciais ou substâncias isoladas, têm obtido os mais diversos resultados para testes realizados com *A. aegypti* (Tabela 2).

**Tabela 2.** Relação das plantas com atividade larvicida contra *Aedes aegypti* em condições laboratoriais.

<b>Planta</b>	<b>Substância</b>	<b>Referência</b>
<i>Ageratum conyzoides</i> , <i>Cymbopogon citratus</i> , <i>Lippia sidoides</i> , <i>Ocimum gratissimum</i> , <i>O. basilicum purpurascens</i> , <i>O. tenuiflorum</i> , <i>Cymbopogon winterianus</i> , <i>Tagetes minuta</i> , <i>Vanillosmopsis arbórea</i> e <i>Citrus limon</i> .	Óleo essencial	Furtado et al. (2005);
<i>Anacardium humile</i>	Óleo essencial	Porto et al. (2008);
<i>Hyptis martiusii</i> , <i>Lippia sidoides</i> e <i>Syzigium aromaticum</i>	Óleo essencial	Costa et al. (2005);
<i>Piper sarmentosum</i> , <i>P. longum</i> e <i>P. ribesoides</i>	Extrato etanólico	Chaithong et al. (2006);
<i>Magonia pubescens</i> , <i>Paepalanthus speciosa</i> e <i>Copaifera langsdorffii</i>	Frações e óleo essencial	Silva et al. (2001);
<i>Magonia pubescens</i>	Substância isolada	Silva et al. (2004);
<i>Pentaclethra macroloba</i> e <i>Cordia piauhiensis</i>	Substância isolada	Santiago et al. (2005);
<i>Ageratina adenophora</i>	Extrato acetônico	Mohan & Ramaswasmy (2007);
<i>Piper permucronatum</i> , <i>Piper hostmanianum</i> , <i>Piper gaudichaudianum</i> , e <i>Piper humaytanum</i>	Óleo essencial	Morais et al. (2007);
<i>Cymbopogon citrates</i> , <i>Lippia sidoides</i> , <i>Ocimum americanum</i> , <i>Ocimum gratissimum</i>	Óleo essencial	Cavalcante et al. (2004);
<i>Myroxylon balsamum</i>	Óleo essencial, terpenóides e fenilpropanóides	Simas et al. (2004);
<i>Tapura amazonica</i> , <i>Piper aduncum</i> , <i>P. tuberculatum</i> e <i>Simaba polyphylla</i>	Extrato metanólico	Pohlit et al. (2004);
<i>Piper auritum</i> , <i>Pimenta racemosa</i> , <i>Chenopodium ambrosioides</i> e <i>Piper aduncum</i>	Óleo essencial	Leyva et al. (2009).

Entretanto para que se possa efetivar um produto como larvicida comercial é necessário que além dos testes em laboratório, haja testes de campo simulado e posteriormente de campo, onde a eficiência do produto larvicida no ambiente em que o inseto ocorre naturalmente seja verificada (WHO, 2005).

São poucos os trabalhos que saem da fase laboratorial para a fase de semi-campo, um raro exemplo é o trabalho realizado por Silva et al. (2002) onde o extrato etanólico de *Magonia pubescens* St. Hil. foi aplicado em condições de campo simulado às larvas de *A. aegypti* em sete diferentes criadouros artificiais do mosquito. A maioria dos testes de semi-campo são realizados com bactérias entomopatogênicas (*Bacillus thuringiensis*- Bt), que já são comercializadas no exterior e importadas pelo Brasil, neste caso empresas nacionais testam diferentes cepas dessa bactéria para a fabricação de um bioinseticida nacional à base de Bt (EMBRAPA, 2006; EMBRAPA, 2008).

Devido à escassez de estudos com substâncias oriundas de plantas em condições de campo simulado para *Aedes aegypti* e ao fato de que essa espécie apresenta resistência aos produtos atualmente empregados no seu controle, a avaliação de novas substâncias larvicidas nas condições mais próximas àquelas encontradas no hábitat do mosquito, torna-se importante para a aplicação de medidas sobre a utilização do inseticida.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

- Realizar o estudo fitoquímico de *Piper alatabaccum* e avaliar o potencial larvicida de seus extratos, óleo essencial e substâncias isoladas sobre larvas de *Aedes aegypti* em condições de laboratório e de semi-campo.

### 2.2 Objetivos específicos

- Identificar as classes de metabólitos secundários, através de métodos espectroscópicos, presentes nos extratos etanólicos de folhas e raízes, bem como, identificar os constituintes químicos presentes no óleo essencial.
- Analisar a eficácia dos extratos etanólicos, da fração de acetato de etila, do óleo essencial e das substâncias isoladas de *Piper alatabaccum* contra larvas de *Aedes aegypti* e calcular as concentrações letais (CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub>) para cada substância;
- Analisar o efeito residual do extrato com melhor atividade larvicida em condições laboratoriais e em condições de semi-campo;
- Avaliar o efeito do larvicida em diferentes recipientes de criação de *A. aegypti* e em duas condições climáticas diferentes (chuvosa e seca).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 ANÁLISE FITOQUÍMICA

A *Piper. alatabaccum* foi coletada no mês de junho de 2009, em área de terra firme no seguinte local: BR 319 Km 15,5 sentido Porto Velho- Humaitá (08° 38' 44,38" latitude sul, 63° 59' 42, 55" longitude oeste), o material foi enviado para identificação ao Herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) onde foi identificado pelo botânico J. F. Ramos. O número da exsicata referente à *P. alatabaccum* é 211711.

Após a coleta a amostra foi encaminhada ao Laboratório de Pesquisa em Química de Produtos Naturais – LPQPN da Universidade Federal de Rondônia – UNIR, em Porto Velho/RO onde foi separada em duas partes (folhas com talos, e raízes) e pesada, sendo o peso fresco das raízes de 2,6 Kg e o das folhas de 4,3 Kg. Posteriormente as folhas foram cortadas e submetidas à extração de óleo essencial (figura 12 A/B), após esse procedimento foram colocadas para secar, em estufa com circulação de ar, à temperatura média de 40°C. Estando secas as folhas e raízes foram armazenadas em local arejado, não úmido.

Para a obtenção do óleo essencial as folhas foram submetidas à extração por 4 horas com arraste de vapor d'água utilizando um sistema tipo Clevenger modificado (figura 12/C). O óleo foi tratado com o agente dessecante sulfato de sódio anidrido ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), posteriormente foi pesado (0,4g) e armazenado em vidro escuro sob refrigeração até a realização da análise dos componentes e dos bioensaios.

**Figura 12-** Trituração das folhas (A) para extração do óleo essencial de *Piper alatabaccum* (B) e desenho esquemático do aparelho de Clevenger modificado (C).



Para obtenção dos extratos brutos das folhas e das raízes, cada amostra foi colocada em Erlenmeyer contendo 1 litro de etanol (4x 1L) à temperatura ambiente por sete dias. Posteriormente, foram evaporados com auxílio de um evaporador rotatório. Obtendo 70g de extrato bruto concentrado de folhas denominado EF e 25,8 g de extrato bruto de raízes, denominado ER que foram então utilizados nos bioensaios e na análise cromatográfica.

### 3.2 MARCHA FITOQUÍMICA PARA A IDENTIFICAÇÃO DAS CLASSES DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

Os extratos de *P. alatabaccum* foram submetidos a testes de classe de substâncias para esteróides, terpenos, flavonóides, alcalóides e saponinas (CARVALHO et al., 2002)

- *Esteróides e Terpenos*

Os extratos foram dissolvidos em 1 ml de clorofórmio ( $\text{CHCl}_3$ ) em tubos de ensaios. A seguir, adicionou-se 1 ml de anidrido acético e aproximadamente três gotas de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ). Alterações na coloração revelam a presença destas substâncias: verde indica teste positivo para esteróide e vermelha positiva para terpeno.

- *Flavonóides*

O extrato foi dissolvido em aproximadamente 1ml de etanol ou álcool etílico. A seguir, foi adicionado uma pequena porção de pó de magnésio, seguido de 0,5 ml de ácido clorídrico concentrado (HCL). O surgimento de coloração avermelhada indica teste positivo para flavonóides.

- *Alcalóides*

Para identificação de alcalóides, solubilizou-se uma pequena quantidade do material em solução de HCl. Adicionou-se, ao tubo de ensaio, algumas gotas de Dragendorf (solução de iodeto de potássio e subnitrito de bismuto). A precipitação de um material amarelo indica teste positivo para alcalóides.

- *Saponinas*

Uma pequena porção do extrato foi solubilizada em água destilada, agitou-se o recipiente a fim de visualizar a formação de espuma. A formação de espuma na solução indica teste positivo.

### 3.3 MÉTODO PARA A IDENTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *P. alatabaccum*

O óleo essencial obtido foi analisado usando um cromatógrafo gasoso HP 5890 acoplado a um espectrômetro de massas HP 5973, equipado com coluna capilar (30 m x 0,25 mm) dimetilpolisiloxano DB-5 (J&W) (25 m x 0,20 mm, 0,20  $\mu\text{m}$ ); gás de arraste: He (fluxo de 1,0 mL/min); as temperaturas do injetor (modelo split): 250° C; detector de ionização de chama (FID): 270° C; temperatura da coluna: 35–180°C/3°C/min, 180–250 °C/10 °C/min; O volume injetado 0,02  $\mu\text{L}$  de óleo puro. Os espectros de massas: impacto de elétrons a 70 eV.

A identificação dos constituintes químicos foi feita em um computador acoplado ao espectrômetro de massas por comparação com o índice de retenção baseados na série dos n-alcenos e comparação visual com espectros de massas de catálogos (ADAMS, 1995).

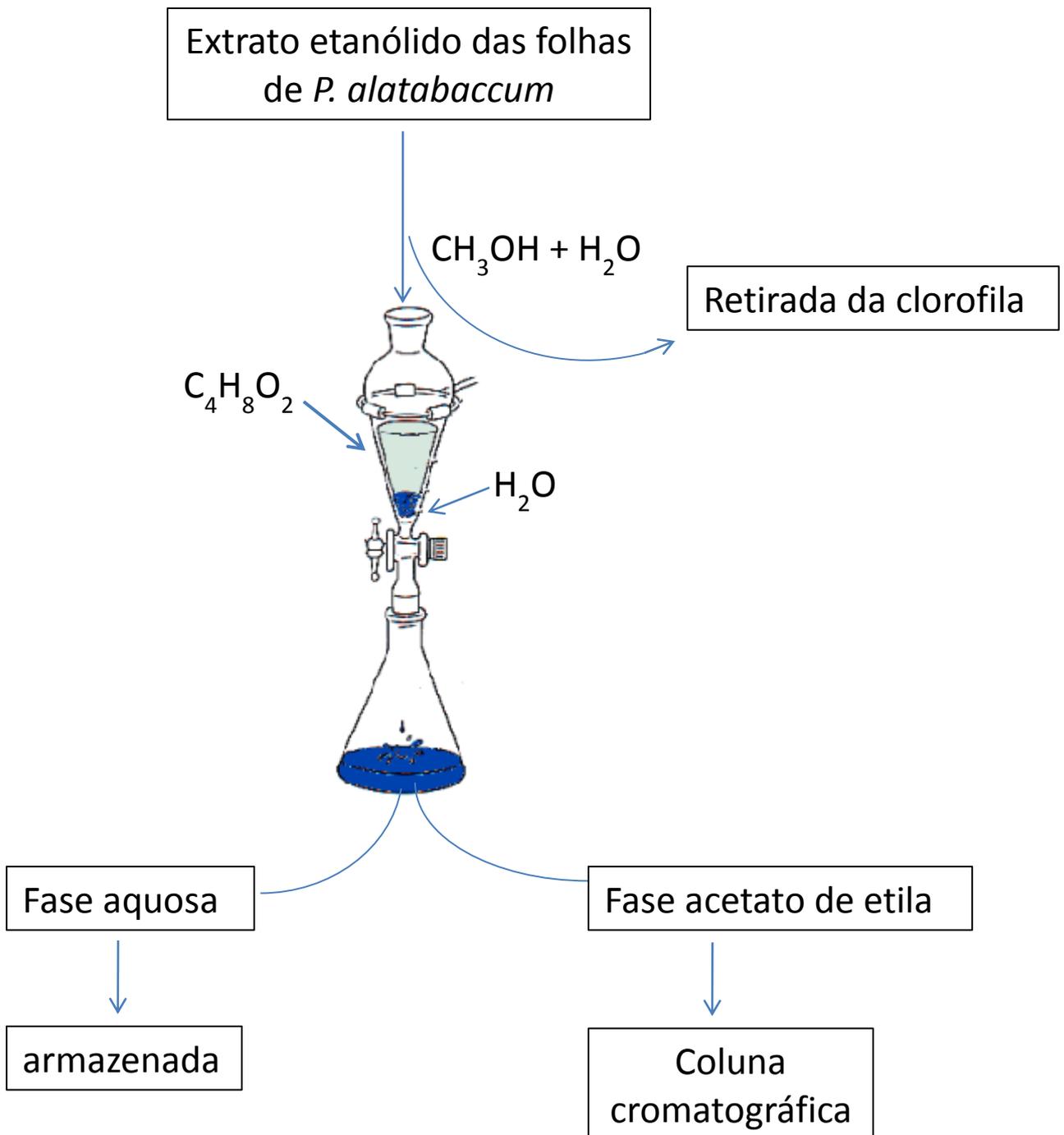
Com o intuito de isolar as substâncias presentes no óleo essencial, foi feita nova coleta onde as folhas frescas e trituradas (300g) foram submetidas à extração com hexano a temperatura ambiente por três dias, após a evaporação do solvente obteve-se 25g de extrato hexânico. Esse extrato das folhas foi submetido a uma coluna cromatográfica utilizando-se como fase fixa sílica gel e como fase móvel hexano. Vinte frações foram obtidas e através de cromatografia em camada delgada foi possível observar que as frações 6 a 10 apresentaram-se puras e com a constituição de óleo, a qual foi denominada PAFO.

### **3.4 CROMATOGRAFIA**

#### **3.4.1 Partição por solventes**

O EF (52 g) foi submetido à partição por solventes de acordo com a figura 13. Primeiramente foi feito o tratamento com metanol 10% e água destilada para a retirada da clorofila, em seguida o extrato foi diluído em acetato de etila e água, formando assim duas fases que foram separadas, sendo que a fase contendo água foi posta em estufa para evaporação e armazenada; a fase contendo acetato de etila foi rotoevaporada e o extrato concentrado, nomeado fração AEF (fração acetato de etila das folhas), submetido à cromatografia líquida em coluna de sílica.

**Figura 13-** Organograma de partição preliminar do extrato etanólico das partes aéreas de *Piper alatabaccum*.



### 3.4.2 Cromatografia em coluna

Para cromatografia de absorção foram utilizados 30g da fração acetato de etila que foram submetidos à cromatografia em coluna de vidro. Foi utilizado como suporte gel de

sílica (200-300 mesh, 90 g) e como fase móvel foram utilizados os seguintes solventes: hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol, puros ou combinados em gradiente crescente de polaridade. Para cromatografia em camada delgada, fez-se uso da placa de gel de sílica 60 ( $\phi$   $\mu$ m 2-25 sobre poliéster T-6145 da Sigma Chemical CO (como indicador de fluorescência na faixa 24  $\eta$ m) onde a revelação de substâncias se deu com pulverização de um revelador universal, seguido de aquecimento em estufa a 100°C, por 5 min.

A partir das frações coletadas (100 ml, cada) e com a utilização de cromatografia em camada delgada de sílica foi possível reunir duas frações com perfil diferentes as quais em seguida foram recromatografadas e resultaram no isolamento de dois sólidos brancos amorfos denominados PAFET-1 (40mg) e PAFET-2 (49mg) que foram encaminhados para identificação na Universidade Federal do Ceará.

### 3.5 CRIAÇÃO DE *Aedes aegypti*

Os ovos de *Aedes aegypti* foram doados pelo Laboratório de Ecologia Química da Universidade Federal de Minas Gerais (LABEC- UFMG) e encaminhados ao Laboratório de entomologia da FIOCRUZ em Porto velho, RO. Os ovos foram colocados em bacias contendo água destilada e ao eclodirem as larvas foram distribuídas para outras bacias com o auxílio de pipetas. Diariamente as pupas foram retiradas e postas em gaiolas pequenas, e após a emergência foram alimentadas com sangue, e então postas nas gaiolas maiores onde foram alimentadas com solução açucarada a 20% (Figura 14 A/B). Tanto as larvas como os adultos eram mantidos em condições controladas (27°C 70% UR e 12hs de fotoperíodo).

**Figura 14-** Gaiolas menores usadas para colocar as pupas e alimentar os mosquitos (A) e gaiolas maiores, criadouros das colônias de *Aedes* (B).



Fonte: Santana, H. T.(2009)

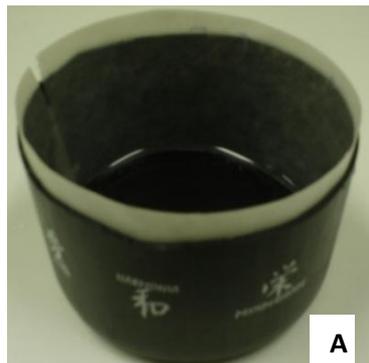
Após a alimentação das fêmeas com sangue de coelho (figura 15), aguardou-se três dias para a maturação dos ovos e então foram colocados nas gaiolas juntamente com os espécimes recipientes escuros contendo papel filtro e água (Figura 16 A/B) para que as fêmeas iniciassem a oviposição que ocorria no papel filtro umedecido. Após contados, os ovos foram colocados para eclosão, para a realização dos testes ou secos e armazenados.

**Figura 15-** Alimentação sanguínea dos adultos de *Aedes aegypti*.



Fonte: Trindade, F. T. T. (2008)

**Figura 16-** Recipiente para a oviposição dos *Aedes* (A) inserido na gaiola de criação (B).



**A**



**B**

Fonte: Santana, H. T.(2009)

As larvas, até atingirem o tamanho ideal para serem utilizadas nos testes (3<sup>o</sup>- 4<sup>o</sup> instares), foram alimentadas com ração para cachorro sem gordura (Sabor e vida modelo light- GUABI) e mantidas em bacias (figura 17) cujas águas foram renovadas a cada dois dias.

**Figura 17-** Bacias utilizadas para a criação de larvas de *Aedes aegypti*.



Fonte: Santana, H. T.(2009)

### 3.6 ENSAIOS LARVICIDAS EM LABORATÓRIO

As metodologias empregadas na preparação dos experimentos variaram de acordo com a quantidade de substância disponível para os testes.

Para os testes larvicidas com os extratos e fração foi realizado preliminarmente o teste dose-resposta com nove diferentes concentrações (ppm: 25, 50, 100, 150, 250, 400, 500, 750, 1000 e controle) em três réplicas para cada uma, este foi realizado em copos descartáveis de aproximadamente 50ml, onde foram adicionadas 10 larvas de 3<sup>o</sup>- 4<sup>o</sup> de instar de *A. aegypti* criadas em laboratório (27°C 70% UR e 12hs de fotoperíodo). Este teste é feito com o propósito de se estimar o intervalo de concentrações que inclui de 10 a 95% de mortalidade no período de 24-48 h (WHO, 2005). As substâncias foram solubilizadas em 10 ml de etanol, obtendo assim as soluções estoque de 100.000 ppm para cada extrato. Desta solução foram retiradas, com o auxílio de pipetas de precisão com volume variável, as alíquotas necessárias para formular as concentrações utilizadas nos bioensaios.

As concentrações definitivas foram estabelecidas baseadas no teste dose- resposta. A realização dos testes definitivos consistiu em cinco diferentes concentrações. Para o ER foram as concentrações de: 30, 75, 150, 200 e 325 ppm; para o EF: 75, 150, 300, 500 e 750 ppm e para a fração AEF: 50, 125, 250, 500 e 750 ppm . Cada teste foi realizado com quatro

réplicas cada, onde 100 larvas foram utilizadas para cada concentração, além do controle (1 ml de etanol e 100 ml de água).

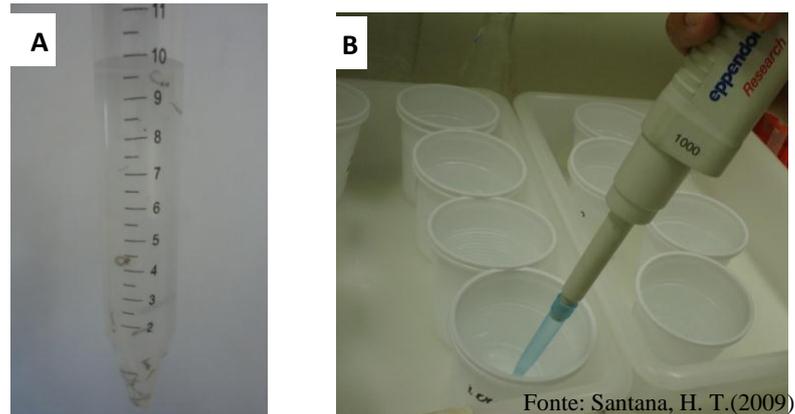
Os testes foram repetidos 3 vezes em momentos diferentes, totalizando o uso de 300 larvas para cada concentração escolhida. Os experimentos continham o volume final de 100 ml de concentração em cada copo, sendo estes, copos descartáveis de plástico com capacidade para 150 ml (WHO, 2005).

As concentrações utilizadas no teste com o óleo essencial foram estabelecidas baseadas em Morais et al. (2007), dispensando, assim, o ensaio preliminar. A realização do teste consistiu em quatro diferentes concentrações (10, 50, 100 e 250 ppm) com três réplicas cada, onde 75 larvas foram utilizadas para cada concentração, sendo o volume final para cada réplica de 10 ml em copos com capacidade para aproximadamente 50 ml. O experimento foi repetido duas vezes em momentos diferentes.

Para os testes preliminares com as substâncias isoladas foram utilizadas 8 concentrações (1, 5, 10, 20, 40, 60, 80 e 100 ppm) onde a solução estoque foi preparada à concentração de 1000 ppm (10 mg/10 ml de água), assim como nos outros experimentos foram realizadas três réplicas com 10 larvas de 3-4º instar em cada, com o volume final de 10ml de solução. Subsequentemente foram escolhidas as quatro concentrações (50, 100, 200 e 300 ppm) que seriam utilizadas nos testes definitivos com a PAFET-1 e a PAFET-2. Para o PAFO as concentrações selecionadas foram: 10, 30, 60 e 90 ppm.

Para facilitar o trabalho as larvas foram separadas em tubos falcon de 15 ml e ao mesmo tempo a quantidade de água necessária para cada concentração já medida (figura 18/A). Em seguida as larvas, com a água, foram transferidas para copos devidamente marcados, por fim a substância larvicida foi adicionada (figura 19/B). Após 24 horas a alimentação foi acrescentada. A mortalidade larval foi observada de 24-96 horas, entretanto para cálculo de  $CL_{50}$  e  $CL_{90}$  foram utilizados os dados de 24-48 horas (WHO, 2005).

**Figura 18-** Preparo das larvas de *A. aegypti* para os experimentos (A) e preparo do teste larvicida em copos plásticos utilizando uma pipeta de precisão com volume variável (B).



O procedimento metodológico previa que fossem consideradas mortas todas as larvas que não respondessem ao estímulo da pipeta e as moribundas, aquelas que não conseguiram alcançar a superfície quando perturbadas.

Os valores obtidos nos experimentos foram analisados pelo programa MINITAB (dosagem X mortalidade) utilizando-se o procedimento PROBIT para obtenção do  $CL_{50}$  e do  $CL_{90}$  (WHO, 2005) pelo programa Minitab 14.1 (Minitab Inc.).

Foram utilizadas sete substâncias larvicidas extraídas de *P. alatabaccum*: extrato etanólico de raízes (ER), extrato etanólico das folhas (EF), fração de acetato de etila das folhas (AEF), óleo essencial das folhas (OE), PAFO, PAFET-1e PAFET-2. A mortalidade causada pelas substâncias e suas concentrações sobre as larvas de *Aedes aegypti* foram analisadas por ANOVA utilizando o programa SigmaStat 2.0.

### 3.6.1 Efeito residual em condições de laboratório

Após a obtenção dos resultados de  $CL_{90}$  foi realizado o teste de efeito residual, com o intuito de estipular a persistência do larvicida em condições laboratoriais. Neste caso a concentração necessária para matar 90% da amostra foi aplicada em 4 réplicas de 1L contendo 25 larvas de *A. aegypti* cada, mais o controle (figura 19). Diariamente as bacias de 25x15x6 cm de medida foram analisadas e as larvas mortas substituídas por larvas vivas. Não havendo mais uma mortalidade expressiva, menos de 20%, o experimento foi encerrado.

**Figura 19-** Bacias utilizados para o teste de efeito residual com extrato etanólico das raízes de *Piper alatabaccum* em condições de laboratório sobre larvas de *Aedes aegypti*.



Fonte: Santana, H. T.(2012)

### 3.8 TESTE DE SEMI-CAMPO COM *Aedes aegypti*

Para os testes de campo simulado foi utilizada a concentração de CL<sub>90</sub> obtida em laboratório. O extrato foi diluído em etanol e adicionado água para a obtenção da concentração desejada. Aos recipientes, foi primeiramente adicionada a água e deixada 24 horas para o envelhecimento e então foram colocadas as larvas, após 3 horas de aclimação das larvas, o larvicida foi adicionado.

Cinco recipientes de diferentes formatos e volumes foram utilizados para simular os ambientes que podem ser aproveitados pelo mosquito para a sua proliferação larval, recipientes estes que são encontrados em residências acumulando água ocasionalmente (água da chuva, por exemplo) ou propositalmente (água armazenada para a utilização humana) os experimentos foram realizados no quintal de uma residência no bairro Aponiã em Porto Velho-RO (8° 43' 53,96'' latitude sul, 63° 51' 35,87'' longitude oeste).

Para os testes foram utilizados copos descartáveis de 400 ml, garrafa pet de 2L, garrafão de 20L, pneus aro 14 e pratos utilizados como suporte de vasos de plantas com capacidade para 500 ml. Cada recipiente foi replicado quatro vezes, mais o controle e que foram cobertos com tela de nylon para evitar que outros mosquitos depositassem ovos na solução (figura 20). Nos recipientes: copo, prato e garrafa, foram utilizados 300ml de solução e nos recipientes maiores, garrafão e pneu, foram utilizados 3L. Para ambos os experimentos a quantidade de larvas foi a mesma, 50 larvas de 3°-4° instar de *Aedes aegypti*. As larvas foram contabilizadas diariamente, e as mortas substituídas por larvas vivas até que não houvesse mais uma mortalidade significativa em nenhum dos recipientes. Foi estipulado que uma mortalidade insignificante seria inferior a 20%.

Foram realizados dois testes, em condições climáticas diferentes, com e sem chuva onde as temperaturas ambiente e dos recipientes foram coletadas, para posterior análise dessas variações no efeito do larvicida.

Os resultados laboratoriais para as diferentes substâncias e os resultados de campo em função da variação de recipientes e da variação climática foram submetidos à análise estatística de variância (ANOVA) de um fator (com normalidade avaliada) pelo programa SigmaStat 2.0 (SPSS).

**Figura 20-** Recipientes escolhidos para simular a aplicação larvicida contra *Aedes aegypti*. (pneu- A, garrafão de água- B, garrafa pet- C, copo descartável- D e prato- E).





Fonte: Santana, H. T.(2012)

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 ANÁLISE FITOQUÍMICA

#### 4.1.1 Marcha fitoquímica para a identificação das classes de metabólitos secundários

As principais classes de substâncias presentes nos extratos etanólicos das raízes e das folhas de *P. alatabaccum* estão representadas na tabela 3.

**Tabela 3.** Classe de substâncias presentes nos extratos etanólicos das folhas e das raízes de *Piper alatabaccum*.

<b>Classe de substância</b>	<b>Folhas</b>	<b>Raiz</b>
Esteróides	(+)	(-)
Terpenos	(-)	(+)
Flavonóides	(+)	(-)
Alcalóides	(+)	(+)
Saponinas	(+)	(-)

(+) presente; (-) ausente.

O teste para a detecção de metabólitos secundários feito com o extrato das folhas apresentou resultado positivo para esteróides devido à coloração verde adquirida durante o teste, e para flavonóides devido à coloração que variou de parda a vermelho.

O extrato das raízes apresentou resultado positivo para terpenos, caracterizado pela coloração vermelha e para alcalóides, por apresentar durante o teste pequena quantidade de precipitado amarelo. No teste realizado para saponinas o extrato das raízes não apresentou a formação de bolhas, já o extrato das folhas apresentou a formação de bolhas sugerindo a presença dessa substância em sua composição.

O resultado positivo para terpenos e alcalóides e negativo para flavonóides nas raízes corrobora com o obtido por Silva (2009) entretanto, neste estudo foi obtido resultado positivo para esteróides no extrato etanólico e metanólico das raízes de *Piper alatabaccum*. No presente estudo confirmou-se a presença de esteróides apenas nas folhas, a presença de alcalóides corrobora com o que é encontrado na literatura. Facundo et al. (2005) descreveu dois alcalóides para as folhas dessa planta sendo eles a piplartina (11) e a diidropiplartina (12).

Os testes para classes de substâncias facilitam os estudos químicos, entretanto não dispensam um estudo fitoquímico mais minucioso, pois a realização das reações de caracterização diretamente no extrato pode mascarar o resultado (SIMÕES et al., 2004). A análise de substâncias depende da coloração adquirida pela solução durante o teste, entretanto, o extrato ou a fração em teste já possui a sua própria coloração, dessa forma a falta de visibilidade que não confirma a presença da substância em teste, também não descarta a possibilidade de tê-la.

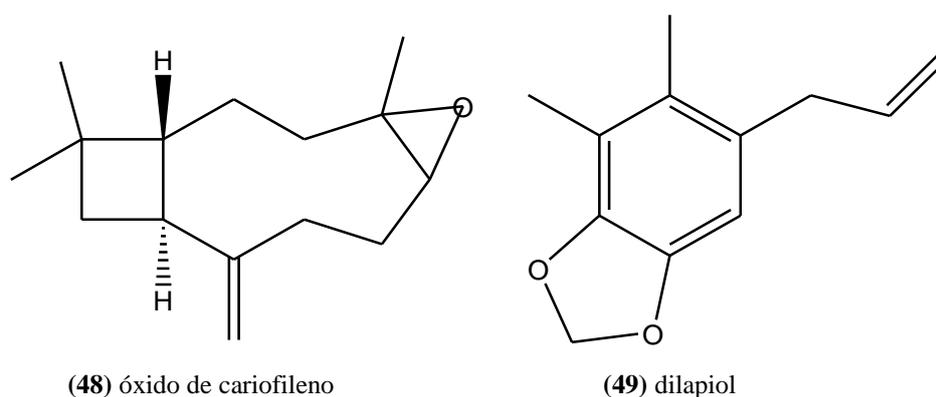
No entanto as diferenças relacionadas à presença ou ausência de metabólitos secundários também podem ser atribuídas a vários fatores ligados a resposta aos estímulos do meio ambiente, como sazonalidade, temperatura, disponibilidade hídrica, nutrientes presentes no solo, dentre outros fatores que estimulam ou inibem a produção de metabólitos secundários (GOBBO-NETO & LOPES, 2007).

#### 4.1.2 Identificação dos constituintes químicos no óleo essencial das folhas de *P. alatabaccum*

O óleo essencial das folhas de *P. alatabaccum*, extraído por arraste de vapor d'água, apresentou-se incolor e com um rendimento de 0,8%. A relação dos constituintes presentes no óleo, bem como, os percentuais e os índices Kovts encontram-se relacionados na tabela 4.

Foram identificados um total de vinte e dois constituintes químicos no óleo essencial, seis monoterpenos (14,4%), quinze sesquiterpenos (52,0%) e um fenilpropanol (27,8%), perfazendo um total de 94,2% de constituintes químicos identificados (tabela 4). Os constituintes majoritários identificados foram o sesquiterpeno óxido de cariofileno (10,6%) (**48**) e o fenilpropanoide dilapiol (27,8%) (**49**) (figura 21).

**Figura 21-** Constituintes majoritários identificados no óleo essencial das folhas de *Piper alatabaccum*.



**Tabela 4.** Constituintes químicos do óleo essencial das folhas de *Piper alatabaccum*

N <sup>o</sup>	Constituintes	IR*	Porcentagem
01	$\alpha$ -pineno	957	3,1
02	canfeno	952	1,3
03	$\beta$ -pineno	977	1,0
04	sabineno	969	3,5
05	$\alpha$ -felandreno	986	2,8
06	limoneno	1012	2,7
	<b>Monoterpenos</b>	-	<b>14,4</b>
08	$\gamma$ -elemeno	1432	4,1
09	$\alpha$ -cubebeno	1339	1,8
10	$\alpha$ -copaeno	1364	2,5
11	$\beta$ -elemeno	1379	1,9
12	óxido de cariofileno	1406	<b>10,6</b>
13	(Z)- $\beta$ -farneseno	1438	5,6
14	aloaromadendreno	1443	1,2

15	$\alpha$ -humuleno	1444	3,1
16	biciclogermacreno	1475	7,9
17	$\beta$ -bisaboleno	1484	1,3
18	germacrene-D	1483	5,0
19	$\beta$ -selineno	1486	2,9
20	$\gamma$ -cadineno	1490	2,0
21	$\delta$ -cadineno	1498	2,3
21	germacreno B	1528	6,8
	<b>Sesquiterpenos</b>	-	<b>52,0</b>
22	dilapiol	1462	<b>27,8</b>
	<b>Fenilpropanoide</b>	-	<b>27,9</b>
<b>Total identificado</b>		-	<b>94,2</b>

\*IR=Índices de retenção. Os constituintes estão descritos em ordem crescente de eluição em coluna não polar.

No presente estudo predominaram estruturas sesquiterpênicas com uma pequena porcentagem de monoterpenos na composição do óleo essencial, assim como em Santos et al. (2001), onde foram avaliados os óleos essenciais de dez espécies de Piperáceas e no estudo realizado por Autran et al. (2009) onde predominaram também estruturas sesquiterpênicas na composição do óleo das folhas de *Piper marginatum*.

O dilapiol, fenilpropanóide encontrado em maior concentração (27,8%) no óleo essencial das folhas de *P. alatabaccum*, é uma substância abundante no óleo essencial de *Piper aduncum* (FAZOLIN et al., 2005, LEYVA et al., 2009) e também já foi encontrado em altas concentrações no óleo de em *Piper hispidum* (FACUNDO et al., 2008).

O óxido de cariofileno (10,6%) foi encontrado em quantidade similar (10,1%) no óleo essencial de *Piper arboreum* por Potzernheim et al. (2006), encontrado também em em *P. tuberculatum* (32,1%) (FACUNDO et al. 2008), dentre varias outras espécies *Piper*. Essa substância é comum nos óleos de plantas em geral e apresenta atividade antifúngica (YANG et al., 1999)

Os componentes descritos para o óleo de *P. alatabaccum* corroboram com o que é citado na literatura, pois cinco dos sete componentes mais encontrados em espécies de *Piper*, segundo Mesquita et al. (2005), foram relatados para essa espécie, são eles:  $\beta$ -pineno, óxido de cariofileno, germacreno D,  $\alpha$ -pineno e limoneno, não estando presentes apenas o espatulenol e o *E*-cariofileno.

## 4.2 CROMATOGRAFIA: SUBSTÂNCIAS ISOLADAS

### 4.2.1 Identificação estrutural de PAFET-1

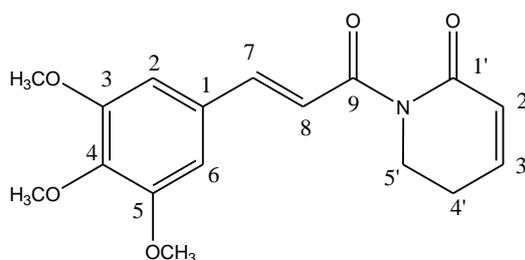
O composto denominado **PAFET-1**, apresentou-se como um sólido branco amorfo, solúvel em acetona, ponto de fusão 122,2 . 122,6 °C. Apresentou teste positivo para alcalóide quando tratado com reagente de Dragendorff.

O espectro de massa de PAFET-1, exibiu o pico do íon molecular  $M^+$  com  $m/z$  317, sugeriu a fórmula molecular  $C_{17}H_{19}NO_5$ , compatível com a fórmula molecular do alcalóide pipartina (**11**), já isolada das folhas de *P. alatabaccum* (Facundo et al., 2005). A comparação entre amostra de pipartina autentica com amostra de PAFET-1, em cromatografia em camada delgada também apresentou semelhança.

A absorção no espectro de RMN  $^{13}C$  em  $\delta$  105,4 foram compatíveis com os carbonos  $C_2$  e  $C_6$  da pipartina, assim como, as absorções em  $\delta$  125,8 e 145,5 foram compatíveis com os carbonos olefinícos do anel piperínico  $C-2'$  e  $C-3'$  absorvendo em  $\delta$  145,4 e 145,6.

O espectro de RMN  $^1H$  de PAFET-1, exibiu as absorções compatíveis com os grupamentos metoxilas da pipartina em  $\delta$  3,87 (6H, s) e 3,86 (H, s). As absorções em  $\delta$  7,64 (H, d) e 7,66 (H, d) foram compatíveis com os hidrogênios H-7 e H-8, respectivamente.

Todos estes dados comprovaram que PAFET-1 apresenta a mesma estrutura da pipartina (**11**), já isolada das folhas de *Piper cenocladum* (DODSON et al., 2000), a partir dos caules e das folhas de *P. puberullum* (WU et al., 1997), nos frutos de *Piper tuberculatum* e nas folhas de *P. alatabaccum* ela também foi encontrada (FACUNDO et al., 2008; FACUNDO et al., 2005). Os deslocamentos químicos de carbonos e hidrogênios estão relacionados na tabela 5.



(11)

**Tabela 5-** Deslocamentos químicos de RMN  $^{13}G$  e RMN  $^1C$  obtido em  $CDCl_3$  de PAFET-1.

C	$\delta_C$	$\delta_H$
---	------------	------------

1	130,7	-
2	105,4	6,80 (H, s)
3	153,2	-
4	140,0	-
5	153,2	-
6	105,4	6,80 (H, s)
7	143,6	7,64 (H, d)
8	121,1	7,66 (H, d)
9	168,7	-
1'	165,8	-
2'	145,4	6,02 (H, dd)
3'	145,6	6,92 (H, m)
4'	24,7	2,47 (2H, m)
5'	41,5	4,05 (2H, m)
OCH <sub>3</sub> -3	56,5	3,87 (H, s)
OCH <sub>3</sub> -4	61,3	3,86 (H, s)
OCH <sub>3</sub> -5	56,5	3,87 (H, s)

Em uma revisão realizada por Parmar et al. (1997) essa substância foi atribuída à composição das espécies *P. aborescens*, *P. callosum*, *P. longum*, *P. retrofractum*, *P. sylvaticum* e *P. tuberculatum*; e os dímeros de piplartina foram encontrados em *P. aborescens*, *P. rugosum* e *P. tuberculatum*.

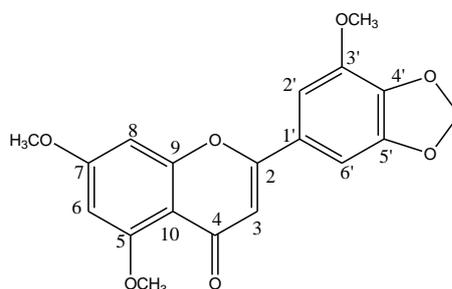
#### 4.2.2 Identificação estrutural de PAFET - 2

O composto denominado como **PAFET-2** foi isolado como um sólido branco amorfo, solúvel em acetona e apresentou teste positivo para flavonóide quando tratado com ácido clorídrico concentrado e magnésio metálico, coloração vermelha.

Os dados de espectrais de RMN <sup>1</sup>H foram compatíveis com um flavonóide contendo no anel A dois hidrogênios acoplados em posições *meta* em  $\delta$  6,57 (1H, d,  $J=2,2$  Hz, H-6), 6,39 (1H, d,  $J=2,2$  Hz, H-8) e dois hidrogênios acoplados em posições *meta* no anel B em  $\delta$  7,07 (2H, s). Um sinal em  $\delta$  6,05 (2H, s) foi compatível com um grupamento metilenodioxido, sinais em  $\delta$  3,93 (6H, s) e 3,92 (3H, s) foram compatíveis com a presença de três grupamentos metoxilas.

Os dados espectrais de RMN <sup>13</sup>C confirmaram a presença do grupamento metilenodioxido através do sinal em  $\delta$  103,4 e dos grupamentos metoxilas em  $\delta$  56,3 e 55,6. Todos estes dados foram compatíveis com a flavona 5,5',7-trimetoxi-3',4'-metilenodioxiflavona (**47**) já isolada das folhas de *P. alatabaccum* (Facundo et al., 2005). Este flavonóide foi isolado pela primeira vez em *Bauhinia chapioni* (CHEN et al., 1984) e esta é a

primeira vez que foi isolado em espécies de *Piper*. Os deslocamentos químicos de hidrogênios e carbonos encontram-se listados na tabela 6.



(47)

**Tabela 6-** Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) de PAFET

c	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$
2	160,5	-
3	103,4	6,63 (1H, s)
4	108,8	-
5	160,9	-
6	96,2	6,57 (1H, d, $J=2,2$ Hz)
7	164,1	-
8	92,9	6,39 (1H, d, $J=2,2$ Hz)
9	159,8	-
10	109,1	-
1'	126,7	-
2'	103,4	7,07 (1H, s)
3'	153,5	-
4'	140,8	-
5'	153,5	-
6'	103,4	7,07 (1H, s)
OCH <sub>2</sub> O	103,6	6,05 (2H, s)
OCH <sub>3</sub> -3'	56,3	3,93 (6H, s)
OCH <sub>3</sub> -5	56,3	3,93 (6H, s)
OCH <sub>3</sub> -7	56,8	3,92 (3H, s)

#### 4.2.3 Identificação estrutural de PAFO

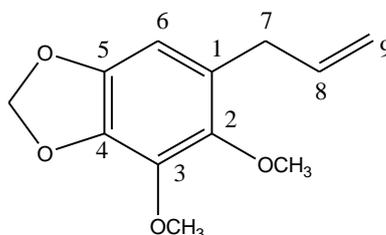
O composto denominado **PAFO**, apresentou-se como um óleo incolor, solúvel em clorofórmio. O espectro na região do Infravermelho de PAFO exibiu bandas de absorções, entre outras, em 3118, 1620 e 1479  $\text{cm}^{-1}$ , relacionadas à presença de anel aromático.

O espectro de massas de PAFO apresentou o pico do íon molecular ( $M^+$ )  $m/z$  122 u.m.a, compatível com a fórmula molecular  $C_{12}H_{14}O_4$ . De acordo com a fórmula molecular proposta, PAFO apresenta seis graus de insaturações.

O espectro de Ressonância Magnética Nuclear de  $^{13}\text{C}$  (RMN  $^{13}\text{C}$ ) de PAFO exibiu doze linhas espectrais, sendo possível propor a presença de um grupamento metilenodióxido absorvendo em  $\delta$  101,5 e dois grupamentos metoxilas absorvendo em  $\delta$  60,4 e 61,7. A análise comparativa entre os espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  – BB de PAFO e os dados fornecidos pelo espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ , utilizando a técnica DEPT – 135 de PAFO, levou a constatação de que das doze absorções exibidas no espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  – BB, oito são de átomos de carbonos  $sp^3$ , as quais absorveram em  $\delta$  145,0; 144,7; 138,0; 137,8; 136,4; 126,5; 115,9 e 103,1. Através desta análise foi possível, também, confirmar a presença do grupamento metilenodióxido, uma ligação dupla carbono-carbono monosubstituída absorvendo em  $\delta$  103,1, e uma absorção em  $\delta$  34,3 relacionado a um átomo de carbono dihidrogenado ( $\text{CH}_2$ ).

O espectro de Ressonância Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$  (RMN –  $^1\text{H}$ ) de PAFO confirmou a presença do grupamento metilenodióxido absorvendo em  $\delta$  5,91 (s). As absorções relacionadas aos grupamentos metoxilas absorveram em  $\delta$  4,00 (s) e 3,76 (s). Uma absorção em  $\delta$  6,36 (s) pode ser relacionada a um átomo de hidrogênio ligado a um anel aromático penta-substituído. Uma absorção em  $\delta$  3,31 (2H, d,  $J=6,53$  Hz) pode perfeitamente ser atribuída a um grupamento metilênico vizinho a átomos de carbonos olefínicos.

Todos os dados apresentados até aqui foram compatíveis com a estrutura do fenilpropanóide dilapiol (**49**), já isolado em várias espécies de *Piper* (Parmar et al., 1997). Os deslocamentos químicos de carbonos e hidrogênios estão relacionados na tabela 7.



**(49)**

**Tabela 7-** Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) de PDEF-6

c	$\delta_C$	$\delta_H$
1	126,5	-
2	145,0	-
3	138,0	-
4	136,4	-
5	144,7	-
6	103,1	6,38 (1H, s)
7	34,3	3,31 (1H, d, $J=6,53$ Hz)
8	137,8	5,94 (1H, m)
9	116,0	5,06 (2H, m)
2-OCH <sub>3</sub>	61,7*	3,76 (3H, s) <sup>#</sup>
3-OCH <sub>3</sub>	60,4*	4,00 (3H, s) <sup>#</sup>
OCH <sub>2</sub> O	101,5	5,91 (3H, s)

\*<sup>#</sup> Estes valores podem estar trocados

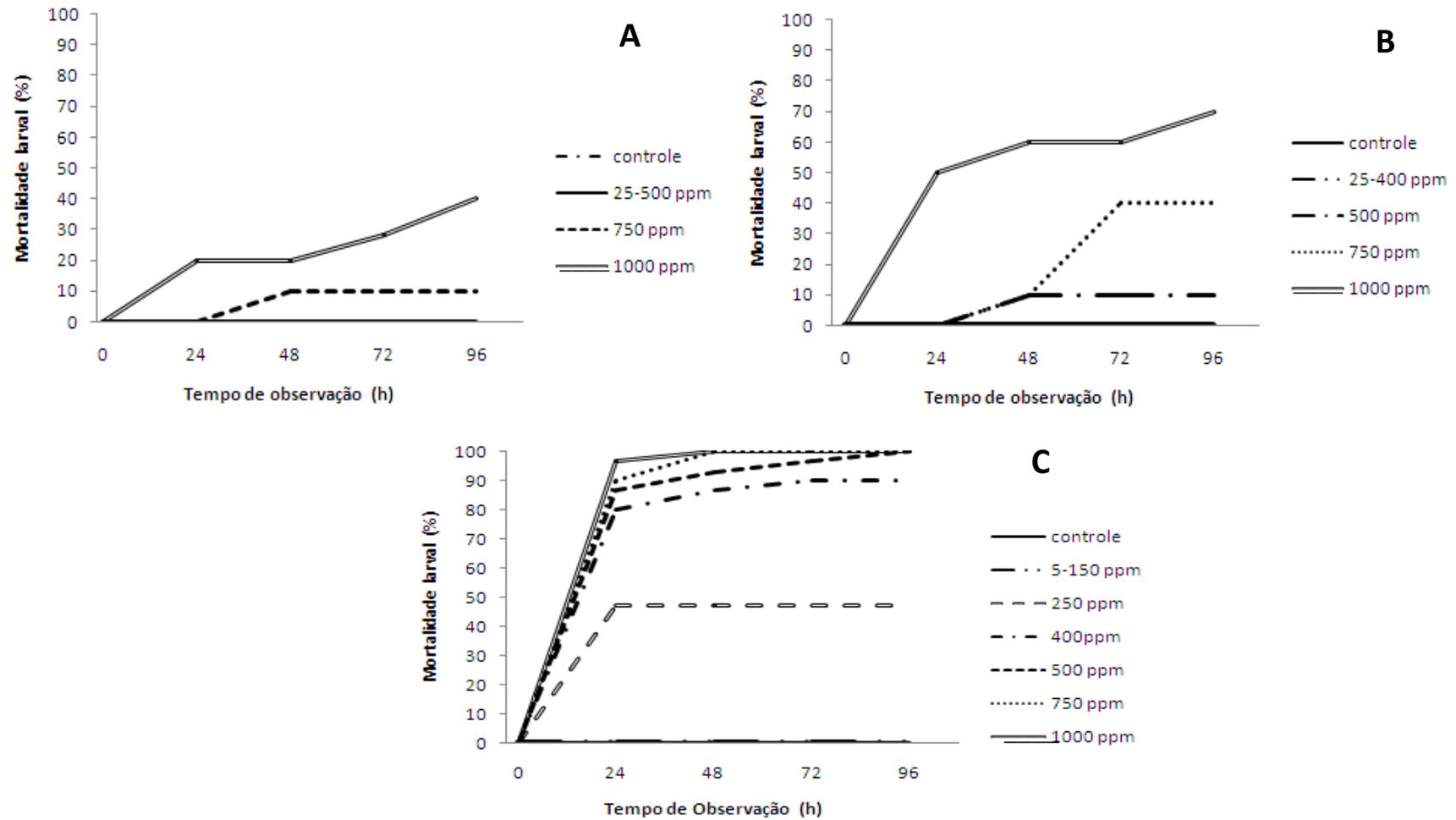
### 4.3 ATIVIDADE LARVICIDA EM LABORATÓRIO

#### 4.3.1 teste dose-resposta

O extrato etanólico das folhas apresentou atividade larvicida apenas nas concentrações de 750 e 1000 ppm, com 10 e 40% de mortalidade, respectivamente (Figura 22/A). A fração de acetato de etila das folhas, nas concentrações de 500, 750 e 1000 ppm causou mortalidade de 10, 40 e 70 %, respectivamente, entretanto as concentrações menores não mostraram atividade larvicida (Figura 22/B). O teste dose-resposta realizado com o extrato das raízes promoveu mortalidade de 100% nas concentrações de 500, 750 e 1000 ppm durante o período de observação de 24- 96 horas. As menores concentrações de 25, 50, 100 e 150ppm não apresentaram atividade larvicida, a atividade passou a ser notada a partir da concentração de 250 ppm com 47% de mortalidade (Figura 22/C).

A fração de acetato de etila foi obtida a partir do extrato etanólico das folhas. Mesmo com a baixa atividade larvicida do extrato etanólico, a fração de acetato de etila foi testada para analisar a influência da retirada da clorofila, com conseqüente concentração dos metabólitos secundários, na mortalidade larval. Em todos os testes não houve alteração no controle.

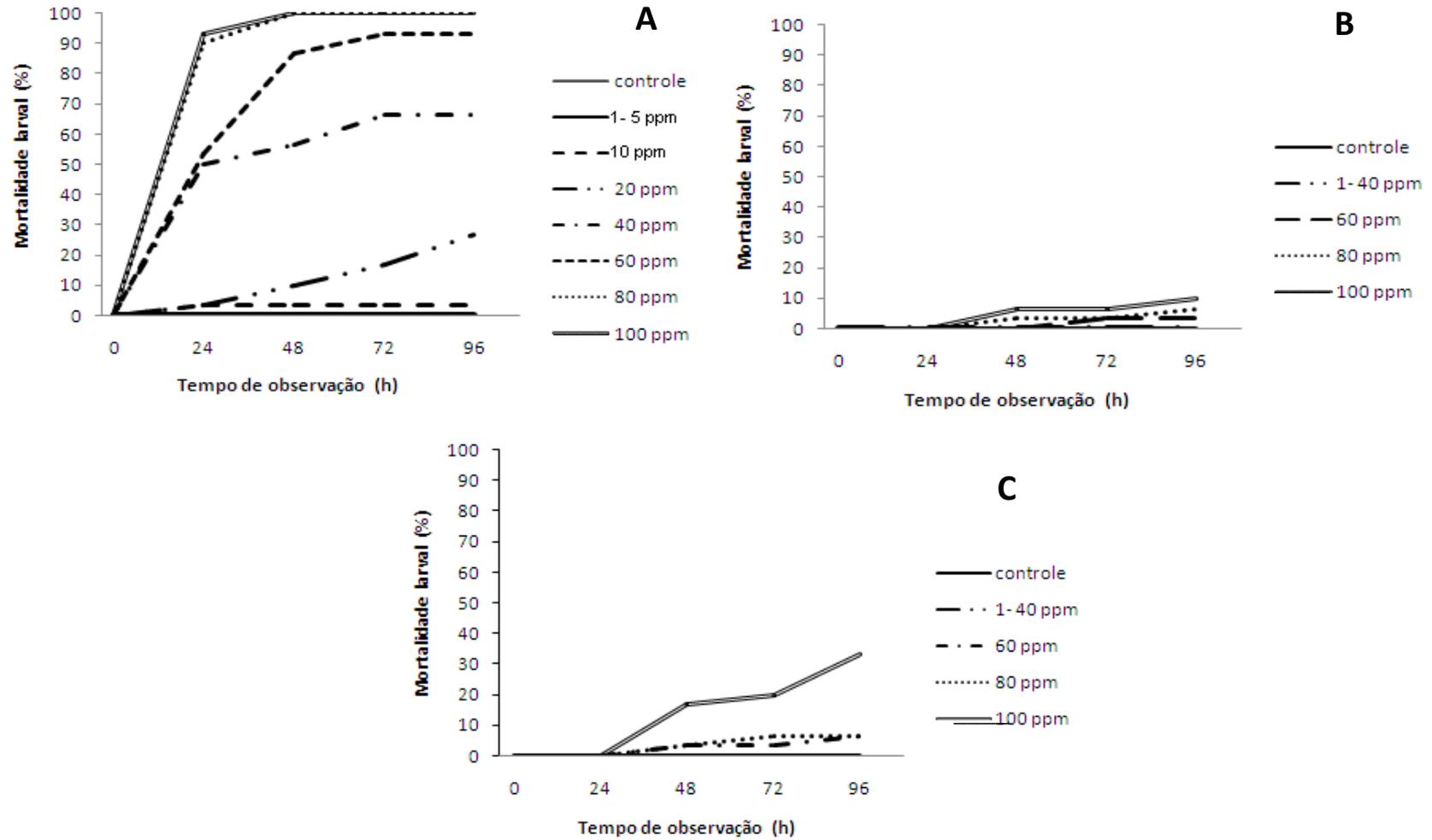
**Figura 22-** Teste dose-resposta realizado com os extratos etanólicos das folhas (A), das raízes (C) e fração de acetato de etila das folhas (B) de *Piper alatabaccum* contra *Aedes aegypti*.



Os testes pilotos realizados com as substâncias isoladas das folhas não apresentaram alta atividade larvicida. Nas concentrações de 1 a 40 ppm a piplartina e a PAFET não causaram mortalidade, as concentrações de 60 e 80 ppm alcançaram 3,3 e 6,6 % de mortalidade, respectivamente para as duas substâncias, à concentração de 100 ppm a piplartina alcançou apenas 10 % de mortalidade enquanto a PAFET chegou a 33% (figura 24 A e B).

O dilapiol apresentou atividade larvicida de 3,3 % em 10 ppm e aumentou sua atividade de acordo com o aumento das concentrações sendo que em 80 ppm já alcançava 100% de mortalidade (figura 23).

**Figura 23-** Teste dose-resposta realizado com as substâncias isoladas de *Piper alatabaccum*: dilapiol (A) Piplartina (B) e 5',7-trimetoxi-3',4'-metilendioxi-flavona (C) contra *Aedes aegypti*.



#### 4.3.2 Testes finais para o cálculo das Concentrações Letais (CLs)

As concentrações escolhidas para a realização do teste final do extrato das folhas e talos foram: 75, 150, 300, 500 e 750 ppm (figura 24/A). Este extrato foi o que apresentou a mais baixa atividade larvicida com  $CL_{50}= 869$  e  $CL_{90}=1579$  ppm, nem mesmo a maior concentração aplicada chegou a alcançar 50% de mortalidade, matando apenas 49,33% das larvas amostradas. A fração AEF deste extrato apresentou  $CL_{50}= 797$  e  $CL_{90}= 1563$  (figura 24/B), para este teste foram escolhidas as concentrações de 50, 125, 250, 500 e 750 ppm. O teste realizado com o extrato das folhas não apresentou aumento significativo de mortalidade com o aumento das concentrações ( $P= 0,062$ ), no teste feito com a fração de acetato de etila a concentração de 750 ppm causou mortalidade larval significativamente maior do que as demais concentrações. No trabalho realizado por Alpirez (2006) o extrato das folhas apresentou atividade inseticida diferente contra *Hypothenemus hampei*, sendo letal à baixas concentrações (5 ppm) e de ação rápida nas maiores concentrações, onde 50 e 100 ppm provocaram 100% de mortalidade em 1 hora de experimento. A diferença nos resultados do testes para *Aedes aegypti* e para *Hypothenemus hampei* sugere uma seletividade no modo de ação desse extrato, característica procurada nos produtos inseticidas (CORRÊA & VIEIRA, 2007), logo o extrato etanólico das folhas de *Piper alatabaccum*, assim como a fração de acetato de etila, que obtiveram baixa atividade para *Aedes aegypti* poderiam ser melhor utilizados no controle de outras pragas.

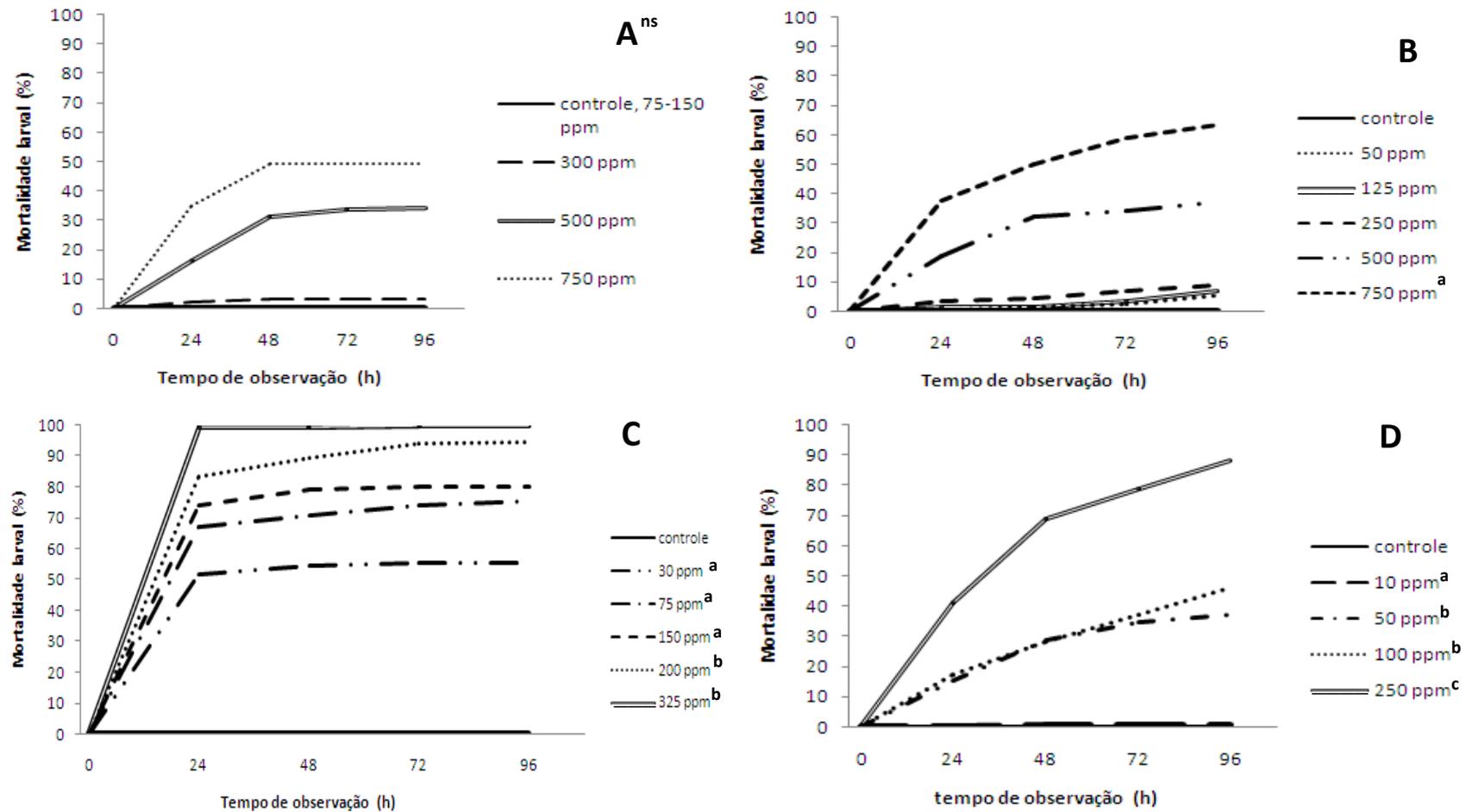
As concentrações escolhidas para o teste definitivo com o óleo essencial foram de 10, 50, 100 e 250 ppm e as mortalidades obtidas no final de 96 horas de observação foram, respectivamente de 0,8%, 37, 3%, 46,2% e 88,4% e seu  $CL_{50}=160$  ppm. O óleo essencial não apresentou diferença entre as concentrações de 100 e 50 ppm, entretanto essas duas concentrações foram diferentes das de 10 e 250 ppm ( $H= 36,2$  e  $P\leq 0,001$ ). (Figura 25/D). Os óleos essenciais das *P. gaudichaudianum* e *P. humaytanum* com  $CL_{50}$  igual à 121, 156, respectivamente contra *A. aegypti* foram considerados de baixa atividade larvicida por possuírem óleos com  $CL_{50}$  superior a 100 ppm (MORAIS et al., 2007). O dilapiol foi o componente majoritário (27,8%) desse óleo e é uma substância conhecida por possuir efeito sinergista em insetos, entretanto apresentou-se em pequena quantidade na composição do óleo não conferindo ao óleo grande letalidade. Os óleos essenciais possuem baixa estabilidade (volatilidade, oxidação dos constituintes, dentre outros) o que desfavorece a sua aplicação direta, Gonçalves et al. (2009) sugere a técnica de microencapsulação de óleos essenciais para

a utilização como larvicidas em *Aedes aegypti*, o óleo de *P. alatabaccum* que apresentou baixa atividade pode ser reavaliado utilizando-se outras metodologias de aplicação.

Para o extrato etanólico das raízes foram utilizadas as seguintes concentrações: 30, 75, 150, 200, 325 ppm (figura 25/C), que causaram a mortalidade de 51, 67, 74, 83 e 99% nas primeiras 24 horas de observação. O extrato das raízes apresentou duas diferenças significantes no aumento da mortalidade em função do aumento da concentração, sendo que as concentrações de 30, 75e 150 ppm foram iguais entre si e diferentes das duas maiores concentrações de 200 e 325 ppm também não foram consideradas diferentes uma da outra (H= 11,9 e P= 0,018).

Esta planta apresentou  $CL_{50}$ = 33 ppm e  $CL_{90}$ = 184 ppm para o extrato etanólico das raízes. A atividade desse extrato diferiu significativamente da atividade causada pelas substâncias OE, EF e AEF que não diferiram entre si. Nas primeiras 24 horas de observação, a maior concentração testada atingiu 99,3% de mortalidade e a menor concentração atingiu mais de 50%, mostrando assim a eficiência desse extrato. Outros extratos de *Piper* também apresentaram alta atividade contra *Aedes aegypti*, sendo que a *P. tuberculatum* e a *Piper aduncum* causaram 100% de mortalidade na concentração de 500 ppm, no estudo realizado por Pohlit et al. (2004) e resultados mais baixos foram encontrados para as *Piper longum*, *P. sarmentosum* e *P. ribesoides* que apresentaram  $CL_{50}$ = 2,2, 4,06 e 8,13 ppm, respectivamente (CHAITHONG et al. 2006), concentrações tão baixas quanto às encontradas para o extratos dos frutos de *P. longum* e da *P.nigrum* branca e preta (sendo que preta é o fruto maduro e branca o fruto verde) , que apresentaram  $CL_{50}$ = 0,017; 0,024 e 0,007 ppm respectivamente (KUMAR et al., 2011). Em ambos os estudos os resultados elevados de toxicidade à *Aedes* foram associados a alterações morfológicas nas papilas anais das larvas.

**Figura 24-** Avaliação da atividade larvicida do extrato etanólico das folhas (A), da fração de acetato de etila das folhas (B), do extrato etanólico das raízes (C) e do óleo essencial das folhas (D) de *Piper alatabaccum* contra larvas de *Aedes aegypti*. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as concentrações testadas ( $P \leq 0,001$ ), ns indica resultado não significativo.



O alcalóide piplartina na maior concentração, 300 ppm, alcançou 78,66% de mortalidade acumulada nas 96 horas de experimento, as demais concentrações de 50, 100 e 200 ppm apresentaram mortalidade de 18, 19 e 30 %, respectivamente. A piplartina causou três aumentos significativos na mortalidade larval de acordo com o aumento das concentrações ( $H= 29,9$  e  $P \leq 0,001$ ), sendo que 50 e 100 ppm apresentaram resultados de mortalidade similares.

A atividade inseticida da piplartina contra larvas de *A. aegypti* não foi satisfatória, com  $CL_{50}= 269$  ppm (tabela 5). Outros alcalóides/amida isolados do gênero *Piper* apresentaram melhor atividade contra *A. aegypti* como a guineensina com  $CL_{50}= 0, 89$  ppm extraída de *P. nigrum* (PARK et al., 2002) e a pipernonalina extraída de *P. longum* com  $CL_{50}= 0,25$  ppm (YANG et al., 2002). No trabalho realizado por Trindade et al.(2012) o extrato metanólico dos talos dessa *Piper* apresentou  $CL_{50}=235$  ppm contra *Anopheles darlingi* e substâncias isoladas dessa planta apresentaram  $CL_{50}= 17$  ppm para piplartina- dihidropiplartina e  $CL_{50}= 24$  ppm para 5,5',7-trimetoxi-3',4'-metilenodioxiflavone (**47**), e a piplartina (**11**) isolada de *Piper tuberculatum* apresentou  $CL_{50}= 40$  ppm.

A substância PAFET (**47**) não chegou a apresentar 50% de mortalidade. Na maior concentração de 300 ppm o percentual alcançado foi de 42%, os demais índices de mortalidade foram todos inferiores à 24%. A atividade larvicida da piplartina foi maior do que a PAFET, com mediana de mortalidade igual a 20,6% enquanto a PAFET apresentou mediana igual a 8,0% (figura 25/C). Esse flavonóide (**47**) não obteve bom resultado como larvicida assim como os dois flavonóides glicosídicos (3,7-di-*O*- $\alpha$ -Lraminopiranosíl 8-metoxiquercetina e 3,7-di-*O*-raminosil 8- metoxikanferol) isolados de *Kalanchoe brasilienses* testados por Trevisan et al. (2006) em larvas de *A. aegypti*.

Os resultados encontrados para as substâncias (**47** e **11**) em *A. aegypti* no presente trabalho diferiram grandemente dos obtidos para *A. darlingi* por Trindade et al. (2012). Essa susceptibilidade de culicídeos aos produtos fitoquímicos é variável, segundo o estudo realizado por Shaalan et al. (2005) normalmente as larvas de *Aedes* são mais robustas e menos susceptíveis do que as de *Culex*, entretanto essa generalização não se estende às larvas de *Anopheles*, pois a susceptibilidade desse gênero é muito variável em comparação aos outros dois. Outro estudo realizado por Pridgeon et al. (2008), constatou também que diferentes espécies de mosquitos são diferentemente susceptíveis aos inseticidas, mostrando assim a necessidade de selecionar os compostos que serão mais eficientes para o controle do mosquito em questão. Neste caso, as substâncias (**47** e **11**) que apresentaram baixa atividade

para *Aedes aegypti* poderão ser melhor empregadas em estudos relacionado ao controle de *Anopheles darlingi* dentre outros culicídeos.

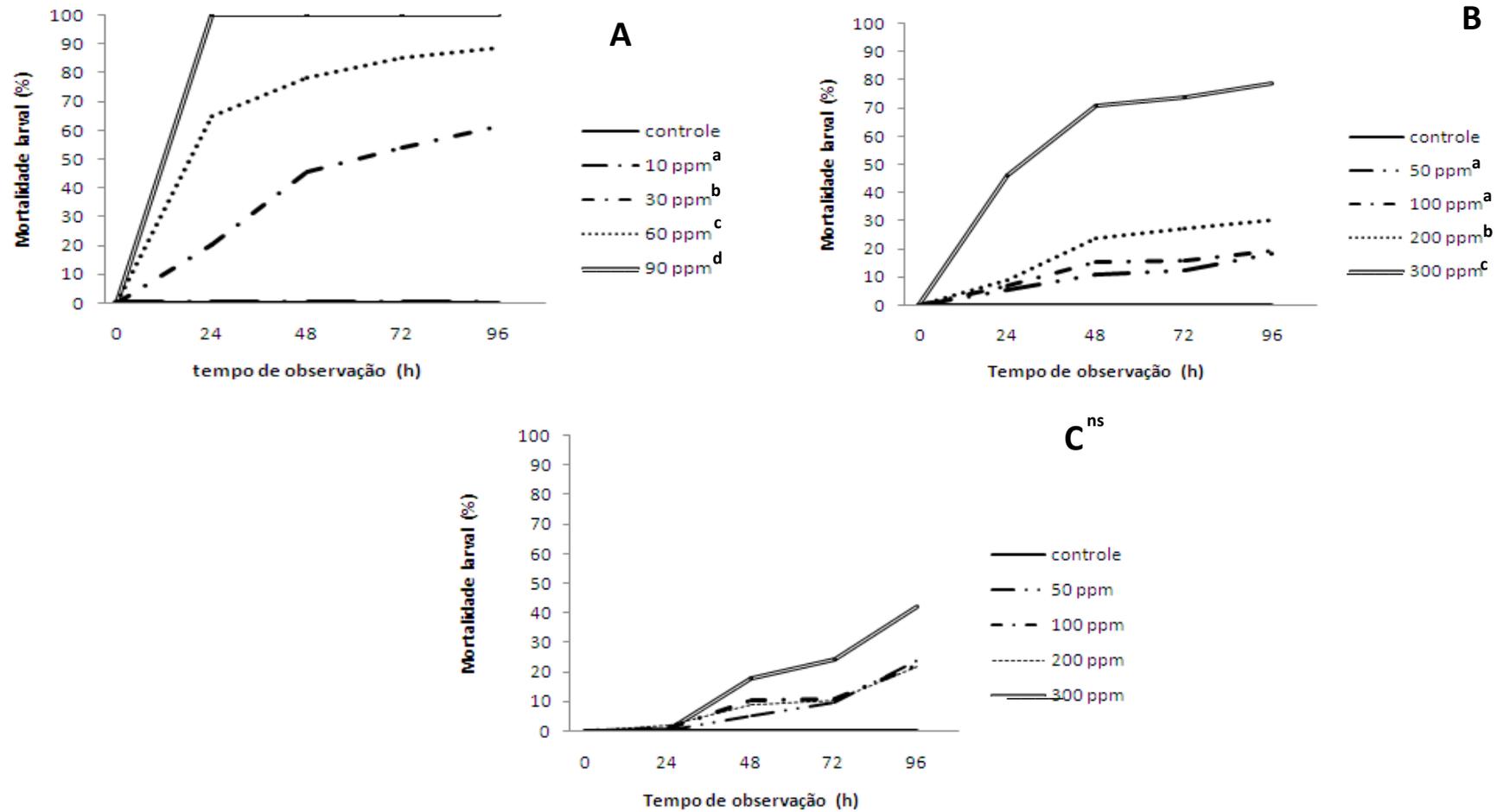
O dilapiol, substância presente óleo essencial, foi isolado e avaliado separadamente apresentando atividade superior à do óleo, sendo que nas concentrações de 10, 30, 60 e 90 ppm as mortalidades foram de 0,8%, 54, 2%, 85,3% e 100%, respectivamente. A análise realizada com o dilapiol mostrou aumento significativo de concentração a partir de 30 ppm e todas as concentrações diferiram entre si ( $H= 44,7$  e  $P \leq 0,001$ ). Dentre as substâncias isoladas essa foi a que apresentou melhor atividade, com mediana de mortalidade igual a 64,6% ( $H= 27,6$  e  $P \leq 0,001$ ) (figura 25/A), obtendo  $CL_{50}= 41$  ppm e  $CL_{90}= 68$  ppm.

O dilapiol já foi testado contra *A. aegypti* obtendo  $CL_{50}= 0,0057\%$  (LEYVA et al., 2009), ainda contra *A. aegypti* no trabalho de Quadros et al. (2010) o  $CL_{50}$  foi de 19  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Há uma falta de padronização dos resultados e/ou das metodologias empregadas nos testes, o que dificulta a comparação dos resultados dessa conhecida substância inseticida aos demais resultados obtidos no presente estudo. Em Rafael et al. (2008) a ação dessa substância foi avaliada a níveis moleculares e ficou comprovada a sua ação citotóxica, verificando que o dilapiol pode reduzir a sobrevivência e a reprodução de *A. aegypti*.

**Tabela 8-**  $CL_{50}$  e  $CL_{90}$  para os extratos etanólicos das folhas e das raízes (EF, ER), fração acetato de etila das folhas (AEF), óleo essencial das folhas (OE) e substâncias isoladas (dilapiol, 5',7-trimetoxi-3',4'-metilenedioxiflavona e piplartina) extraídas de *P. alatabaccum*, testados como larvicidas sobre larvas de 3°-4° instar de *Aedes aegypti*.

<b>Substância</b>	<b><math>CL_{50}</math></b>	<b><math>CL_{90}</math></b>
EF	751	1133
ER	33	184
AEF	797	1563
OE	160	299
Dilapiol	41	68
Piplartina	269	477
PAFET	3345	6434

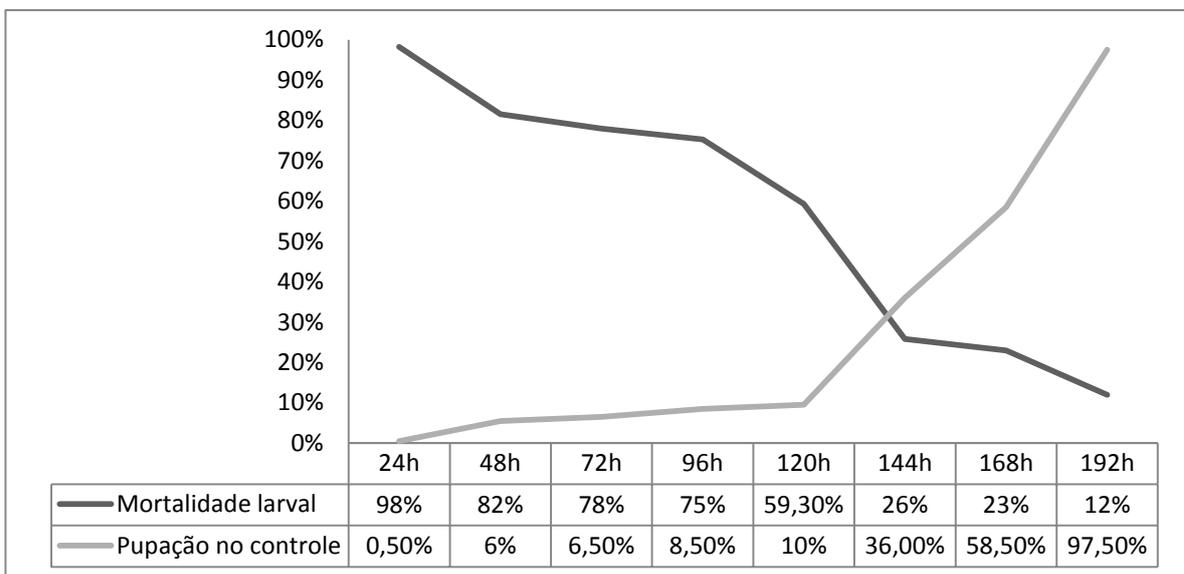
**Figura 25-** Avaliação da atividade larvicida das substâncias isoladas de *Piper alatabaccum*: dilapiol (A) piplartina (B) e 5<sup>o</sup>,7-trimetoxi-3',4'-metilendioxi-flavona (C) contra larvas de 3-4<sup>o</sup> instar de *Aedes aegypti*. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as concentrações testadas ( $P \leq 0,001$ ), ns indica resultado não significativo ( $P > 0,05$ ).



### 4.3.3 Efeito residual em condições de laboratório

O teste foi realizado com a concentração do CL<sub>90</sub> obtida durante o teste larvicida com o extrato ER que foi de 184 ppm e teve a duração de 192 horas., A mortalidade larval diminuiu com o passar dos dias iniciando com 98% de mortalidade e chegando a 12% no final do 8º dia de experimento (figura 26).

**Figura 26-** Efeito residual do extrato etanólico das raízes de *Piper alatabaccum* na mortalidade de larvas de *Aedes aegypti* em condições controladas (27°C 70% UR e 12hs de fotoperíodo).



O extrato etanólico das raízes foi o escolhido por apresentar a melhor atividade larvicida, com o menor valor de CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub>. Segundo o protocolo da Organização Mundial de Saúde (WHO, 2005) o teste de laboratório deve servir de guia para a escolha da concentração utilizada no testes de semi-campo e a concentração normalmente escolhida para esses ensaios é múltipla do CL<sub>90</sub>.

Durante 24 e 96 horas não houve redução significativa de mortalidade, mas somente 120 horas após o início do experimento. A maior diminuição na mortalidade larval ocorreu no período entre 120 e 144 horas ( $\chi^2 = 50,7$  e  $P \leq 0,001$ ).

Poucos estudos de persistência com produtos vegetais como larvicidas de dípteros são encontrados, entretanto em outras áreas de estudo os produtos derivados de *Piper* têm sido relatados quanto a sua atividade residual. Como exemplo pode-se citar o estudo realizado por Coitinho et al. (2010), que demonstraram que o óleo essencial de *Piper marginatum* apresenta maior efeito residual no controle de *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae), o

caruncho do milho, com 53,1 % de mortalidade após 120 dias de experimento, entretanto em outro estudo realizado pelos mesmos autores a pimenta do reino em pó (*Piper nigrum*) não obteve resultado de residualidade para o controle dessa mesma praga apresentando mortalidade de apenas de 0,8% nos períodos de observação (COITINHO et al., 2006).

A concentração utilizada no teste com *P. alatabaccum* foi bem inferior às encontradas na bibliografia, assim como a duração de sua atividade. No estudo realizado por Silva et al. (2003) o efeito residual do extrato de *M. pubescens* teve a duração de 12 semanas e o recipiente de cerâmica, que apresentou mais alta taxa de mortalidade, ainda apresentava mortalidade de 50%. Considerando ser um produto natural esse efeito residual é muito alto, entretanto a concentração utilizada também foi bem acima da concentração utilizada para a *P. alatabaccum*, sendo de 1.400 ppm. Um estudo realizado por Ruas-Neto et al. (1994), onde foram comparadas formulações químicas de inseticidas comerciais e inseticidas biológicos chegou-se à conclusão de que a dose de 1250 ppm para as formulações biológicas é adequada para a rotina das aplicações, uma vez que essa dosagem permite ao produto superar as influências físicas do meio sobre os resultados.

Sendo assim, é provável que o extrato etanólico das raízes de *P. alatabaccum* tenha um efeito residual mais prolongado caso seja aumentada a dosagem. Contudo, a disponibilidade de matéria-prima neste caso torna-se um empecilho, pois se trata da raiz de uma planta e a obtenção do extrato consiste em sua morte, além disso, o rendimento do extrato das raízes é baixo, logo uma forma de reduzir a quantidade de extrato a ser utilizada, segundo Costa et al. (2004), é aplicar os fundamentos do manejo integrado de pragas, onde o potencial de determinado método de controle pode ser incrementado com a associação de outros métodos.

O efeito residual apresentado pelo ER de *P. alatabaccum* é muito baixo quando comparado aos produtos larvicidas comercializados. O estudo realizado por Monnerat et al. (2006) mostra a eficácia e persistência de dois bioinseticidas (Vectobac WDG e Vectobac DT) à base de *Bti*, um regulador de crescimento (IGR) (Pyriproxyfen) e um produto químico (Temefós) em populações de *A. aegypti*, os produtos a base de *Bti* mantêm 100% de mortalidade até o vigésimo dia e os produtos a base de Temefós e Pyriproxyfen causam 100% de mortalidade durante 60 dias. Uma das qualidades procuradas em produtos de origem vegetal é a rápida degradabilidade, uma característica que favorece o meio ambiente e a saúde humana, entretanto, neste caso há a necessidade de se repetir as aplicações em períodos mais curtos de tempo (WIESBROOK, 2004). O controle populacional de *A. aegypti* pode ser efetuado com produtos naturais para o controle focal do vetor, entretanto para efeitos em longo prazo faz-se

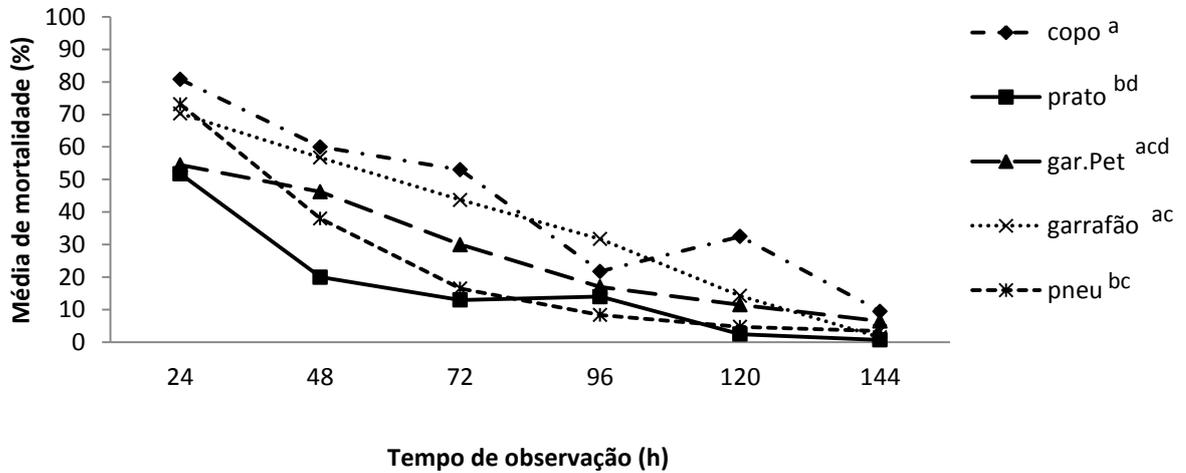
necessária a adoção de medidas preventivas como melhorias no saneamento básico e participação da comunidade no sentido de reduzir criadouros potenciais do vetor (BRASIL, 2002).

#### 4.4 TESTE DE SEMI-CAMPO COM EXTRATO ETANÓLICO DE *Piper alatabaccum* COMO LARVICIDA PARA *Aedes aegypti*

A concentração do extrato etanólico das raízes de *P. alatabaccum* utilizada nesse experimento foi a CL<sub>90</sub> de 184 ppm encontrada em laboratório, que foi aplicada igualmente em todos os recipientes.

Não houve muitas diferenças significativas na mortalidade larval entre os diferentes recipientes testados, entretanto a mortalidade das larvas nos copos foi significativamente ( $H=27, 24$  e  $P\leq 0,001$ ) maior do que em recipientes cuja mortalidade foi menor, e.g. pratos e pneus (figura 27), sendo assim esse larvicida seria melhor aproveitado na aplicação peridomiciliar com acúmulo de lixo, para o uso em áreas com depósito de pneus provavelmente seria necessário o aumento da concentração utilizada. O estudo realizado por Camargo et al. (1998) comparou a eficiência de Temephós em seis recipientes diferentes (pneu, vaso de barro, bacia de alumínio, aquário de vidro, bacia de plástico e caixa de amianto), dentre estes recipientes o pneu se destacou por apresentar significativa redução na atividade do larvicida e os autores concluíram que era possível estar ocorrendo uma inativação do larvicida através da ação química com os componentes do pneu com os do larvicida, logo, o mesmo pode estar ocorrendo no presente estudo.

**Figura 27-** Mortalidade larval de *Aedes aegypti* observada no teste de semi-campo com cinco diferentes recipientes utilizando a concentração de 184 ppm do extrato etanólico das raízes de *Piper alatabaccum*. Letras diferentes indicam diferença significativa ( $P \leq 0,001$ ).

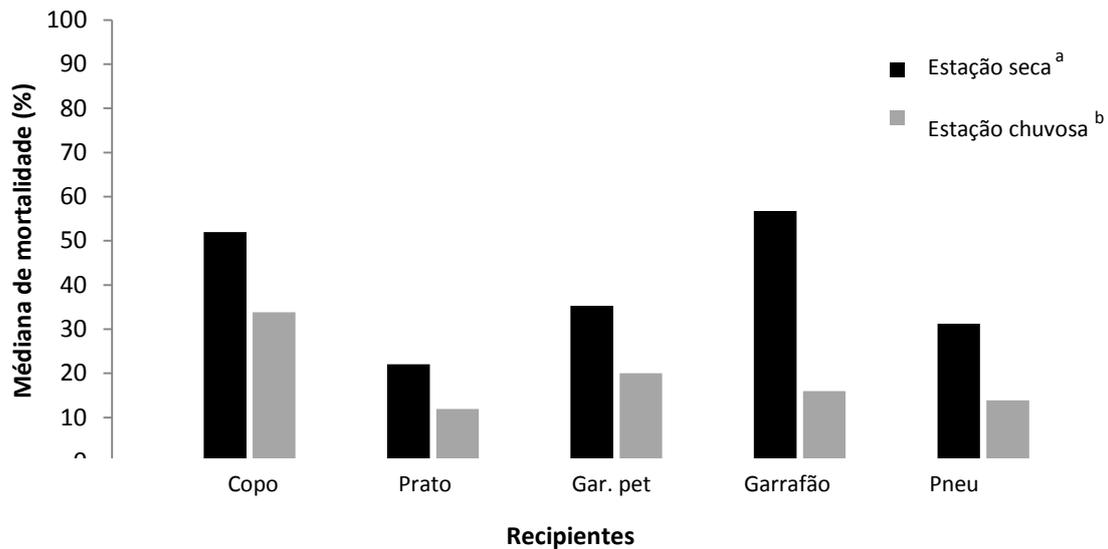


A mortalidade variou ao longo do tempo decrescendo significativamente ( $H=134, 17$  e  $P \leq 0,001$ ) após 72 horas, atingindo seu menor valor no sexto dia de experimento. A mediana de mortalidade das larvas de *A. aegypti* no copo foi a maior (34%), em seguida vem o garrafão e a garrafa pet com 27 e 22%, respectivamente. No entanto, não houve diferença significativa entre eles ( $P > 0,05$ ). Em Silva et al. (2003) recipientes de cerâmica, plástico, pneu, vidro lata e amianto foram utilizados em teste de campo simulado com *A. aegypti*, onde o extrato bruto etanólico da planta *Magonia pubescens* (Sapindales: Sapindaceae) foi aplicado contra larvas de 3º instar, neste estudo também foi constatado que existe diferença na mortalidade de acordo com a mudança de recipientes, sendo que nos criadouros de plástico a atividade da droga foi mais eficaz do que no pneu, resultado similar ao obtido no presente estudo. Neste trabalho os autores avaliaram quanto ao potencial larvicida três partes da planta (casca do caule, envoltório da semente e semente) e a escolhida para a aplicação em condições de campo não foi a mais letal, mas sim a hidrossolúvel ressaltando a facilidade no preparo da solução para uso o popular, coincidentemente no caso dos extratos de *Piper alatabaccum* a mais eficiente era também a única hidrossolúvel.

O teste de efeito residual realizado em condições laboratoriais teve a duração de 8 dias e foi encerrado ao apresentar apenas 16% de mortalidade e a mediana de mortalidade calculada foi de 44%. Já o experimento realizado em condições ambientais no 6º dia apresentou taxas de mortalidade inferiores a 10% e as medianas foram todas inferiores à encontrada para o teste laboratorial. Considerando o período estudado houve uma diferença

significativa entre a estação chuvosa e a estação seca ( $T= 11644,5$  e  $P \leq 0,001$ ), sendo que as taxas de mortalidade alcançadas na seca foram muito superiores às da estação chuvosa (figura 28).

**Figura 28-** Média de mortalidade larval de *Aedes aegypti* em cada recipiente utilizado no teste de semi-campo realizado com extrato etanólico das raízes de *Piper alatabaccum* em duas estações climáticas distintas.



No período de seca houve diferença significativa na variação de temperatura entre o copo e os demais recipientes ( $H=11,43$  e  $P= 0,022$ ), sendo que este apresentou a mais alta mediana de temperatura. Durante a seca houve uma correlação positiva entre a temperatura nos recipientes e a mortalidade larval ( $R= 0,44$  e  $P= 0,01$ ) sendo mais forte em alguns recipientes como Pet ( $R=0,94$ ;  $P=0,01$ ) e Pneu ( $R=0,89$ ;  $P=0,01$ ). Isso mostra que aumentando a temperatura há um aumento da mortalidade pelo menos na seca, quando a mortalidade é maior.

Na estação chuvosa não houve diferença nas temperaturas dos recipientes ( $P=0,849$ ). A média de temperatura do copo ( $32,9^{\circ}\text{C}$ ), juntando-se seca e chuva, é significativamente ( $F=3,17$  e  $P=0,02$ ) maior do que pneu ( $28,7^{\circ}\text{C}$ ) e prato ( $28,9^{\circ}\text{C}$ ), que tiveram as menores temperaturas, assim como a mortalidade que foi significativamente maior no copo em comparação aos outros dois recipientes, evidenciando a correlação positiva entre aumento de temperatura e mortalidade larval. Em estudo realizado por Bezerra et al. (2006b) verificou-se que as temperaturas extremas de  $18^{\circ}\text{C}$  e  $34^{\circ}\text{C}$  apresentam efeitos negativos sobre o desenvolvimento e a fecundidade de *A. aegypti*, sendo que as melhores temperaturas estão entre  $22^{\circ}\text{C}$  e  $30^{\circ}\text{C}$ .

A utilização do extrato etanólico das raízes de *P. alatabaccum* como larvicida deve ser feita aproveitando o período desfavorável ao ciclo de vida do mosquito, que é a época de seca. Ferreira & Yang (2003) constataram que este é o melhor período para a aplicação de larvicidas é no início do verão, sendo que durante a época de maior infestação com temperaturas e umidades relativas altas deve ser realizado o controle com adulticidas.

Durante o período de seca não houve chuva em nenhum dos dias no local de realização dos experimentos, as temperaturas ambientes foram todas acima de 34° C chegando a máxima de 40°C, a máxima umidade relativa do ar registrada foi de 67% e a mínima de 53,7%. Já na estação chuvosa a umidade relativa do ar variou de 84,5% a 93,2%, o nível de precipitação chegou a 38,6 mm com ocorrência de chuva em todos os dias. As temperaturas registradas estiveram ente 24,5 e 30°C.

As diferenças climáticas entre as duas épocas são bem expressivas, assim como a mudança na atividade do larvicida, logo aplicação deste produto à concentração de 184 ppm não seria recomendada para épocas de chuva intensa, sendo assim, faz-se necessária a realização de novos estudos durante a estação chuvosa para a determinação de uma concentração apropriada a essa condição climática.

No presente trabalho o melhor desempenho do extrato foi observado no período de seca, com maior temperatura e exposição direta à luminosidade. Muitos estudos larvicidas têm sido conduzidos com bactérias entomopatogênicas *Bacillus thuringiensis israelensis* (*Bti*), pois a persistência desses produtos nos recipiente é muito alta (PONTES et al., 2005), entretanto essa durabilidade em campo varia de acordo com a exposição à luz, sendo que segundo Regis et al. (2000) a eficiência da *Bti* em pastilha é mantida acima de 70% até 40 dias na sombra e 25 dias no sol. Essas bactérias podem ser usadas seguramente com outros agentes de controle biológico, além disso, o uso de mais de um tipo de inseticida reduz a probabilidade do desenvolvimento de resistência (REGIS et al 2000), levando em consideração essas informações seria interessante a realização de estudos relacionados ao uso conjunto de inseticidas biológicos a base de *Bti* e de produtos naturais, tais como o extrato de *P. alatabaccum*.

Novos trabalhos relacionados à utilização do extrato, frações ou substâncias isoladas de *P. alatabaccum* e novas formas de veiculação para aumentar o efeito larvicida e a residualidade podem melhorar bastante o potencial do uso de *P. alatabaccum* no controle larval, uma alternativa para estender o efeito residual de produtos naturais é a microencapsulação (KANIS et al., 2011), que permite a proteção das substâncias sensíveis à

temperatura, oxidação, umidade e reações indesejáveis favorecendo a utilização do produto (GONÇALVES et al., 2009).

## 5. CONCLUSÃO

O estudo fitoquímico de *Piper alatabaccum* permitiu isolar do extrato etanólico o alcalóide piplartina e a flavona 5',7-trimetoxi-3',4'-metilenodioxiflavona, enquanto que do extrato hexânico isolou-se o dilapiol. A análise do óleo essencial das folhas revelou que os componentes majoritários são o dilapiol e o óxido de cariofileno. No extrato etanólico das folhas foi possível detectar a presença de alcalóides, flavonóides, saponinas e esteróides, no extrato etanólico das raízes a presença de terpenos e alcalóides.

O extrato etanólico das folhas, o óleo essencial, a piplartina e a 5',7-trimetoxi-3',4'-metilenodioxiflavona apresentaram baixa atividade larvicida contra larvas de *Aedes aegypti* com valor de  $CL_{50}$  muito alto, não sendo viáveis para a utilização como larvicida. O dilapiol e o extrato etanólico das raízes apresentaram alta atividade larvicida com  $CL_{50}$ 's compatíveis com o que se é esperado de uma substância potencialmente inseticida. O extrato das raízes foi o que apresentou melhor atividade larvicida e apresentou residualidade de 8 dias em condições controlada de laboratório e de 6 dias em ensaios realizados em condições climáticas ambientais.

Os testes de residualidade em condições de campo simulado indicaram que o extrato etanólico das raízes de *Piper alatabaccum* à concentração de 184 ppm seria melhor aproveitado em locais que contenham lixos domiciliares. Para a aplicação em locais com acúmulo de pneus provavelmente será necessário o aumento da concentração utilizada. A aplicação deste produto alcançará melhor resultado se feita em condições climáticas de seca, com pouca chuva e alta temperatura, aproveitando-se do fato de que o aumento de temperatura influencia positivamente nas taxas de mortalidade. Em todos os casos a aplicação do larvicida deverá ser sucedida do acondicionamento correto do material evitando novos acúmulos de água que propiciem infestações do mosquito.

Estudos relacionados ao isolamento do componente ativo do extrato etanólico das raízes de *P. alatabaccum*, à atividade dessa substância contra inimigos naturais, e aos métodos de aplicação que maximizem o efeito do larvicida nos locais de criação de *Aedes aegypti*, inclusive em períodos de chuvosos, serão necessários para o desenvolvimento de um produto larvicida com a vantagem de não acumular no meio ambiente por de ser biodegradável.

## 6. REFERÊNCIAS

ADAMS R. P., **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry**. Allured Publ. Corp., Carol Stream, IL (1995).

AHMAD, F. B. and TAWAN, C. **Phytochemical studies on *piper umbellatum* L.** *Review of Biodiversity and Environmental Conservation*. 2002.

ALMEIDA, RRP. **Isolamento, purificação e isomerização do dilapiol, componente majoritário do óleo essencial de *P. aduncum* para comprovação de sua atividade biológica.** *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal do Pará, Curso de Pós-Graduação em Química, Belém. 2004.

ALPIREZ, I. P. V. **Atividade inseticida e leishmanicida de *Piper alatabaccum* Trel & Yuncker (Piperaceae).** Trabalho de conclusão de curso (Graduação). Fundação Universidade Federal de Rondônia. 2006.

ALVES, HELIO DE MATOS. **A diversidade química das plantas como fonte de Fitofarmacos.** *Química Nova na Escola*. Nº 3. pag. 10-15. Maio de 2001.

AMER, A., MEHLHORN, H. **Larvicidal effects of various essential oils against *Aedes*, *Anopheles*, and *Culex* larve (Diptera, Culicidae).** *Parasitol. Res.* 99: 466-472. 2006.

ARAÚJO-JÚNIOR, J.X., CHAVES, M.C.O., CUNHA, E.V.L., GRAY, A.I. **Cepharanone B from *Piper tuberculatum*.** *Biochemical Systematics and Ecology*, 27: 325-327. 1999.

AUTRAN, E. S., NEVES, I. A., CÂMARA, C. A. G., NAVARO, D. M. A. F. **Bioensaio larvicida e de ovoposição do óleo essencial das folhas do *Piper marginatum* frente às larvas do *Aedes aegypti*.** Sociedade Brasileira de Química. 2007.

BENEVIDES, P. J.C., SARTORELLI, P. KATO, M.J. **Phenylpropanoids and neolignans from *Piper regnellii*.** *Phytochemistry*. 52(2): 339- 343. 1999.

BESERRA, E. B., CASTRO Jr., F. P., SANTOS, J. W., SANTOS, T. S., FERNANDES, C R. M. **Biologia e exigências térmicas de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) provenientes de quatro regiões bioclimáticas da Paraíba.** *Neotropical entomology*. 35 (6): 853- 860. 2006b.

BESERRA, E. B., FREITAS, E. M., SOUZA, J. T., FERNANDES, C. R. M., SANTOS, K. D. **Ciclo de vida de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera, Culicidae) em águas com diferentes características.** *Iheringia, Sér. Zoo.*, 99 (3): 281-285. 2009.

BEZERRA, D. P. et al. ***In vivo* growth- inhibition of Sarcoma 180 by pipartine and piperine, two alkaloid amides from Piper.** *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* 39: 801- 807. 2006a.

BEZERRA, D.P., MILITÃO, G.C.G., CASTRO, F.O., PESSOA, C., MORAES, M.O., SILVEIRA, E.R., LIMA, M.A.S., ELMIRO, M.J.F., COSTA-LOTUFO, L.V. **Piplartine induces inhibition of leukemia cell proliferation triggering both apoptosis and necrosis pathways.** *Toxicology in Vitro*, 21: 1–8. 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE – CENTRO NACIONAL DE EPIDEMIOLOGIA. . *Guia de vigilância epidemiológica.* 1998.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Dengue: aspectos epidemiológicos, diagnóstico e tratamento.** *Fundação Nacional de Saúde.* – Brasília: 2002.

BRASIL. **Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde,** *Guia de vigilância epidemiológica.* Série A. Normas e Manuais Técnicos. 2005.

BRASIL. **Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde,** *Informe epidemiológico da dengue.* Semana epidemiológica de 1 a 39 de 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Nota técnica nº 162/2010.

CALIXTO, J. B. **Efficacy, safety, quality, control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents).** *Braz. J. Med. Biol. Res.* pag. 33: 179-189, 2000.

CALIXTO, J.B. **Biodiversidade como fonte de medicamentos.** *Cienc. Cult.* 55 (3): 37-39. 2003.

CAMARGO, M. F. et al. **Avaliação da ação residual do larvicida temephós sobre o *Aedes aegypti* (Díptera, Culicidae) em diferentes tipos de recipientes.** *Revista de Patologia Tropical.* 27 (1): 65-70. 1998.

CARVALHO, J. C. T., GOSMANN, G., SCHENKEL, E. P. **Compostos fenólicos simples e heterosídeos.** In: SIMÕES, C. M. O. *Farmacognosia: da planta ao medicamento.* Ed. UFRGS, 4 ed., Porto Alegre, p. 833, 2002.

CARVALHO, M. S. L., CALDAS, E. D., DEGALLIER, N., OLIVEIRA, C., KNOX, M. B. **Susceptibilidade do *Aedes aegypti* ao inseticida temephos no Distrito Federal, em 2000.** *Informe Epidemiológico do SUS.* 10 (supl. 1): 41-43. 2001.

CASEIRO, M. M. ; ETZEL, A., QUEIROZ, A. C., OLIVEIRA, H. S., VECCHIO, V. D., OLIVEIRA, V. L. **DENGUE**. *Revista Brasileira de Medicina*. São Paulo, v. 60, p. 716-724, 2003.

CAVALCANTE, E. S. B., MORAIS, S. M., LIMA, M. A. A., SANTANA, E. W. P. **Larvicidal activity of essential oils from Brazilian plants against *Aedes aegypti***. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*. 99 (5): 541-544. 2004.

CHAITHONG, U., CHOOCHOTE, W., KAMSUK, K., JITPAKDI, A., TIPPAWANGKOSOL, P., CHAIYASIT, D., CHAMPAKAEW, D., TUETUN, B., PITASAWAT, B. **Larvicidal effect of pepper plants on *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae)**. *Journal of Vector Ecology*. 31 (1): 138-144. 2006.

CHAVES, M.C.O., OLIVEIRA, A.H., SANTOS, B.V.O. **Aristolactams from *Piper marginatum* Jacq. (Piperaceae)**. *Biochemical Systematics and Ecology*, 34: 75-77. 2006.

CHEN, C. C., HUANG, Y.L., OU, J. C. **Constituents of the stem of *Bauhinia championii***. *Chinese Pharmaceutical Journal* (Taipei, Taiwan), 46(6): 485-9.1994.

CHEN, C. C., CHEN, Y. P., HSU, H. Y., CHEN, Y. L. **New flavones from *Bauhinia championii* Benth.** *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. 32(1): 166-9. 1984.

CHEN, Y. P., CHEN, C. C., HSU, H. Y., **Pharmacological activities of the flavonoids of *Bauhinia championii* and *Millettia reticulata***. *Progress in Clinical and Biological Research*, 213(Plant Flavonoids Biol. Med.), 297-300. 1986.

CHEYNIER V. **Polyphenols in foods are more complex than often thought<sup>1-2</sup>**. *Am J Clin Nutr*. 81(1 Suppl):223S-9S. 2005.

COITINHO, R. L. B., OLIVEIRA, J. V., JÚNIOR, M. G. C. G., CÂMARA, C. A. G. **Persistência de óleos essenciais em milho armazenado, submetido à infestação de gorgulho do milho**. *Ciência Rural*. 40 (7): 1492-1496. 2010.

COITINHO, R. L. B., OLIVEIRA, J. V., JÚNIOR, M. G. C. G., CÂMARA, C. A. G. **Efeito residual de inseticidas naturais no controle de *Sitophilus zeamais* Mots. em milho armazenado**. *Caatinga (Mossoró, Brasil)*. 19 (2): 183-191. 2006.

CONSOLI, R. A. G. B., OLIVEIRA, R. L. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. 1. Ed. Rio de Janeiro: Fiocruz. 1998.

CORRÊA, A. G., VIEIRA, P. C. **Produtos naturais no controle de insetos**. 2. ed. São Carlos: EdUFSCar, 2007.

COSTA, E. N.; DA SILVA, R. F. P.; FIUZA, L. M. **Efeitos, aplicações e limitações de extratos de plantas inseticidas.** Acta biológica Leopoldensia. V.26, n. 2, p. 173- 185. 2004.

COSTA, M. G.J., RODRIGUES, G. F. F., ANGÉLICO, E. C., SILVA M. R., MOTA, M. L., SANTOS, N. K.A., CARDOSO, A. L. H., LEMOS, T. L. G. **Estudo químico-biológico dos óleos essenciais de *Hyptis martiusii*, *Lippia sidoides* e *Syzigium aromaticum* frente às larvas do *Aedes aegypti*.** Brazilian Journal of Pharmacognosy. 15(4): 304-309. 2005.

CRAVEIRO, A. A.; QUEIROZ, D. C. **Óleos Essenciais e Química Fina.** Química Nova, v. 16, n. 3, p. 224-228, 1993.

DEQUECH, S. T. B., RIBEIRO, L. P., SAUSEN, C. D., EGEWARTH, R., KRUSE, N. D. **Fitotoxicidade causada por inseticidas botânicos em feijão-de-vagem (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivado em estufa plástica.** Revista da FZVA. 15 (1): 71-80. 2008.

DILL, L. S. M. **Estudo fitoquímico dos constituintes voláteis de *Piper hispidum* SW. E avaliação da atividade leishmanicida e antiplasmodial *in vitro*.** [Dissertação] Universidade Federal de Rondônia. Pós- graduação em Biologia Experimental. 2009.

DODSON, C. D., DYER, L.A., SEARCY, J., WRIGHT, Z., LETOURNEAU, D. K. **Cenocladamide, a dihydropyridone alkaloid from *Piper cenocladum*.** Phytochemistry. 53: 52-54. 2000.

DYER, L. A., RICHARDS, J., DODSON, C. D. **Isolation, synthesis, and evolutionary ecology of *Piper* amides.** Pages 117-139 In: Dyer, L. A. and A. N. Palmer (eds.). *Piper*. A model genus for studies of evolution, chemical ecology, and trophic interactions. Kluwer Academic Publishers, Boston. 2004.

EMBRAPA. **Avaliação de diferentes larvicidas para controle do *Aedes aegypti* em simulação das condições de campo.** Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento. ISSN 1676-1340. Junho, 2006.

EMBRAPA. **Bt-horus, um biolarvicida à base da *Bacillus thuringiensis* para controle de larvas de *Aedes aegypti*.** Boletim de pesquisa e desenvolvimento. ISSN 0102-0110. Setembro, 2008.

ESTRELA, J. L.V, FAZOLIN, M., CATANI, V., ALÉCIO, M. R., LIMA, M. S. **Toxicidade de óleos essenciais de *Piper aduncum* e *Piper hispidinervum* em *Sitophilus zeamais*.** Pesq. agropec. bras., Brasília, v.41, n.2, p.217-222. 2006.

FACUNDO, V. A., MORAIS, M. S., BRAZ FILHO, R. **Constituintes químicos de *Ottonia corcovadensis* Miq. Da floresta Amazônica – Atribuição dos deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênio e carbono.** *Quim. Nova*, v. 27, n 1, p 79-83. 2004.

FACUNDO, V. A., SILVEIRA, A. S. P., MORAIS, S. E. **Constituents of *Piper alatabaccum* Trel & Yuncker (Piperaceae).** *Biochemical Systematics and Ecology*. 33: 753-756. 2005.

FACUNDO, V.A.; POLLI, A.L.; RODRIGUES, R.V.; MILITÃO, J.S.L.T.; STABELLI, R. G.; CARDOSO, C. T. **Constituintes químicos fixos e voláteis dos talos e frutos de *Piper tuberculatum* Jacq. e das raízes de *P. hispidum* H. B. K.** *Acta Amazônica*, v.38, n.4, p. 733-742, 2008.

FAZOLIN, M., ESTRELA, J. L. V., CATANI, V., ALPECIO, M. R., LIMA, M. S. **Propriedade inseticida dos óleos essenciais de *Piper hispidinervum* C. DC.; *Piper aduncum* L. e *Tanaecium nocturnum* (Barb. Rodr.) Bur. & K. Shum sobre *Tenebrio molitor* L., 1758.** *Ciências Agrotecnicas*. 31(1): 113-120. 2007.

FAZOLIN, M.; ESTRELA, J. L. V.; CATANI, V.; LIMA, M. D.; ALÉCIO, M. R.. **Toxicidade do óleo de *Piper aduncum* L. a adultos de *Cerotoma tingomarianus* Bechyne (Coleoptera: Chrysomelidae).** *Neotropical Entomology*. 34(3): 485-489. 2005.

FELIPE, F. C. B. et al. **Piplartine, an amide alkaloid from *Piper tuberculatum*, presents anxiolytic and antidepressant effects in mice.** *Phytomedicine*. 14: 605-612. 2007.

FERREIRA, C.P., YANG, H.M., 2003. **Estudo Dinâmico da População de Mosquito *Aedes aegypti*.** *TEMA Tend. Mat. Apl. Comput.* 4(2), 187-196.

FORATTINI, O. P. **Culicidologia Médica.** v1. São Paulo: editora da universidade de São Paulo. 1996

FORATTINI, O. P., KAKITANI, I., UENO, H. M. **Emergência de *Aedes albopictus* em recipientes artificiais.** *Rev. Saúde Pública* 35(5): 456-460. 2001.

FURTADO, R. F., LIMA, M. G. A., NETO, M. A., BEZERRA, J. N. S. SILVA, M. G. **Atividade larvicida de óleos essenciais contra *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae).** *Neotropical Entomology* 34 (5): 843-847. 2005.

GEMTCHÚJNICOV, I. D. **Manual de Taxonomia Vegetal: Plantas de Interesse Econômico.** São Paulo, Ed. Agronômica Ceres, 1976.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. **Plantas Medicinais: Fatores de Influência no Conteúdo de Metabólitos Secundários.** *Química Nova*. Vol. 30. Nº 2. pag. 374-381, 2007.

GONÇALVES, J. K. M. C., COSTA, A. M. B., SOUSA, D. P., CAVALCANTI, S. C. H., NUNES, R. S. **Microencapsulação do óleo essencial de *Citrus sinensis* (L) Osbeck pelo método da coacervação simples.** *Scientia Plena.* v5, n 11. 2009.

HELDT, H.-W., PIECHULLA, B. **Plant – Biochemistry.** *Elsevier editorial.* 4º edition. p 404. San Diego, Califórnia- USA. 2011.

JARAMILLO, A. MANOS, P. S, ZIMMER, E. A. **Phylogenetic relation of perianthless Piperales: reconstructing the evolution of floral development.** *Journal Plant science.* 165(30): 403-417, 2004.

JOLY, A. B., **Botânica Introdução à Taxonomia Vegetal.** 11. Ed. São Paulo-SP: Companhia editora nacional. p 308. 1993.

JUDD, W. S., CAMPBELL, C. S., KELLOGG, E. A., STEVENS, P. F., DONOGHUE, M. J. **Plant Systematics: a phylogenetic approach.** 2 ed. Sunderland, Massachusetts U.S.A: Sinauer associates, Inc. p 237. 2002.

KANIS, L. A., PROPHIRO, J. S., VIEIRA, E. S., NASCIMENTO, M. P., ZEPON, K. M., GUERREIRO, I. C. K., SILVA, O. S. **Larvicidal activity of *Copaifera* sp. (Leguminosae) oleoresin microcapsules against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae.** *Parasitol Res.* v108. N5. 2011.

KUMAR, S., WARIKOO, R., WAHAB, N. **Relative larvicidal efficacy of three species of peppercorns against dengue fever mosquito, *aedes aegypti* L.** *J. Entomol. Res. Soc.* 13 (2): 27-36, 2011.

LEYVA, M., MARQUETTI, M. C., TACORONTE, J. E., SCULL, R., TIOMMO, O., MESA, A., MONTADA, D. **Actividad larvicida de aceites esenciales de plantas contra *aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae).** *Ver. Biomed.* 20: 5-13. 2009.

LOPES, R. M., NAGEM, T. J., PINTO, A. S. **Flavonóides- Farmacologia de flavonóides no controle hiperlipidêmico em animais experimentais.** *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento.* p18-22. 2003.

MACORIS, M. L. G., ANDRIGHETTI, M. T. M., TAKAKU, L., GLASSER, C. M., GARBELOTO, V. C., CIRINO, V. C. B. **Alteração de resposta de suscetibilidade de *Ades aegypti* a inseticidas organofosforados em municípios do Estado de São Paulo, Brasil.** *Revista de Saúde Pública.* 33 (5): 524-522. 1999.

MAIA, J. G. S., SILVA, M. L., LUZ, A. I. R., ZOGHBI, M.G. B., RAMOS, L. S. **Espécies de *Piper* da Amazônia ricas em safrol.** *Química nova.* 10 (3): 201-04. 1987.

MAIA, J. G. S.; SILVA, M. L.; LUZ, A. I. R.; ZOGHBI, M. G. B.; RAMOS, L. S. **Espécies da Amazônia ricas em Safrol.** *Química Nova*, v. 3, n. 10, p. 200- 204, 1987.

MAIA, J.G.S., ZOGHBI, M.G.S., ANDRADE, E.H.A., SANTOS, A.S., SILVA, M.L., LUZ, A.I.R. & BASTOS, C.N. **Constituents of the essential oil of *Piper aduncum* L. growing in the Amazon Region.** *Flavour and Fragrance Journal* 13:269-272. 1998.

MARTÍN, J. L. S., BRATHWAITE, O., ZAMBRANO, B., SOLÓRZANO, J. O., BOUCKENOOGHE, A., DAYAN, G. H., GRUZMÁN, M. G. **The epidemiology of Dengue in the Americas over the last three decades: A Worrisome Reality.** *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 82(1): 128-135. 2010.

McFERREREN, M. A. e RODRIGUEZ, E. **Piscicidal properties of piperovatine from *Piper piscatorum*. (Piperaceae).** *Journal of Ethnopharmacology*. 60: 183-187. 1998.

McFERREREN, M. A., CORDOVA, D., RODRIGUEZ, E., RAUH, J. J. **In vitro neuropharmacological evaluation of piperovatine, na isobutylamide from *Piper piscatorum* (Piperaceae).** *Journal of Ethnopharmacology*. 83: 201-207. 2002.

MESQUITA, J. M. O., CAVALEIRO, C., CUNHA, A.P., LOMBARDI, J. A., OLIVEIRA, A. B. **Estudo comparativo dos óleos voláteis de algumas espécies de Piperaceae.** *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 15(1): 6-12.2005.

MIRANDA, J. E., OLIVEIRA, J. E. M., ROCHA, K. C. G., BORTOLI, S. A., NAVICKIENE, H. M. D., KATO, M. J., FURLAN, M. **Potencial do extrato de *Piper tuberculatum* (Piperaceae) sobre *Alabama argillacea* (Huebner, 1818) (Lepidoptera: Noctuidae).** *Revista Brasileira de Oleaginosas*. 6(2): 557-563. 2002.

MOHAN, D. R., RAMASWAMY, M. **Evaluation of larvicidal activity of the leaf extract of a weed plant, *Argentina adenophora*, against two important species of mosquitoes, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*.** *African Journal of Biotechnology*. 6(5):631-638. 2007.

MONNERAT, R. G.; DUMAS, V. F.; ROSA, F. R.; PIMENTEL, L. W.; NUNES, A. C.; MEDEIROS, P. T.; SUJII, E. R.; VILARINHOS, P. T. R. **Avaliação de diferentes larvicidas para controle do *Aedes aegypti* em simulação das condições de campo.** Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento. Brasília, DF: Embrapa recursos genéticos e biotecnologia, 2006.

MORAIS, S.M., FACUNDO, V.A., BERTINI, L.M., CAVALCANTI, E.S.B., JUNIOR, J.F.A., FERREIRA, S.A., et al. **Chemical composition and larvicidal activity of essential oils from Piper species.** *Biochemical Systematics Ecology*. 35: 670-675. 2007.

- NAVICKIENE, H. M. D., ALÉCIO, A. C., KATO, M. J., BOLZANI, V. S., YOUNG, M. C. M., CAVALHEIRO, A. J., FURLAN, M. **Antifungal amides from *Piper hispidum* and *Piper tuberculatum*. *Phytochemistry*. 55: 621-626. 2000.**
- PARK, I.K., LEE, S.G., SHIN, S.C., PARK, J.D. & AHN, Y.J. **Larvicidal activity of isobutylamides identified in *Piper nigrum* fruits against three mosquitospecies. *J. Agric. Food Chem.*, 50 (7): 1866 -1870. 2002.**
- PARMAR, V. S.; JAIN, S. C.; BISHT, K. S.; JAIN, R.; TANEJA, P.; JHA, A.; TYAGI, O. M.; PRASAD, A. K.; WENGEL, J.; OLSEN, C. E.; BOLL, P. M. Phytochemistry of genus *Piper*. ***Phytochemistry* 46: 597-673, 1997.**
- PAULA, L. G., QUADROS, I. P. S., D'ALMAIDA, S. C. G., FALCON, J. E. T., SOARES, D. M. M., CARVALHO, J. R., COSTA, A. V. et al. **Efeito moluscicida de extratos de pimenta-do-reino (*Piper nigrum*) em caramujo (*Biomphalaria tenagophila*) hospedeiro intermediário do *Schistosoma mansoni*. XIII Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e IX Encontro Latino Americano de Pós-Graduação-Universidade do Vale do Paraíba. 2011.**
- PEREIRA, A. C. R. L., OLIVEIRA, J. V., GONDIM JUNIOR, M. G. C., CÂMARA, C. A. G. **Atividade de óleos essenciais e fixos sobre *Callosobruchus maculatus* (FABR., 1775) (Coleoptera: Bruchidae) em grãos de caupi [*Vigna unguiculata* (L.) WALP.]. *Ciências Agrotécnicas*. 32(3): 717-724. 2008.**
- PERES, E. P. L. **In: Metabolismo secundário**. São Paulo: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2004.
- PIMENTA, F. G., SILVA, H. S. B. **Noções básicas sobre a dengue**. Informe Epidemiológico do SUS. Editorial.7p. 2001.
- POHLIT, A. M. et al. **Screening of plants found in the State of Amazonas, Brazil for larvicidal activity against *Aedes aegypti* larvae. *Acta Amazônica*. 34 (1) : 97-105. 2004.**
- PONTES RJ, REGAZZI AC, LIMA JW, KERR-PONTES LR. **Efeito residual de apresentações comerciais dos larvicidas temefos e *Bacillus thuringiensis israelensis* sobre larvas de *Aedes aegypti* em recipientes com renovação de água. *Rev Soc Bras Med Trop* 38: 316-321. 2005.**
- PORTO, K. R. A., ROEL, A. R., SILVA, M. M., COELHO, R. M., SCHELEDER, E. J. D., JELLER, A. H. **Atividade larvicida de *Anacardium humile* Saint Hill sobre *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 41(6): 586-589. 2008.**

POTZERNHEIM, M. C. L., BIZZO, H. R., VIEIRA, R. F. **Análise dos óleos essenciais de três espécies de *Piper* coletadas na região do Distrito Federal (Cerrado) e comparação com óleos de plantas procedentes da região de Paraty, RJ (Mata Atlântica).** *Revista Brasileira de Farmacognosia* 16(2): 246-251. 2006.

PRIDGEON, J. W., PEREIRA, R. M., BECNEL, J. J., ALLAN, S. A., CLARK, G. G., LINTHICUM, K. J. **Susceptibility of *Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus* Say, and *Anopheles quadrimaculatus* Say to 19 Pesticides with different modes of action.** *J. Med. Entomol.* 45 (1): 82-87. 2008.

QUADROS, D. S., TADEI, W. P., NONUMURA, S. M. **Estudo da relação da estrutura química de fenilpropanóides limonóides e flavonóides e a atividade larvicida contra vetores de doenças tropicais.** *XIX jornada de iniciação Científica PIBIC INPA.* Manaus. 2010.

QUIGNARD et al. **Medial lethal concentrations of Amazonian plant extracts in the brine shrimp assay.** *Pharmaceutical Biology.* 42 (3): 253-257. 2004.

RAFAEL, M. S., HEREIRA-ROJAS, W. J., ROPER, J. J., NUNOMURA, S. M., TADEI, W. P. **Potential controlo of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) with *Piper aduncum* L. (Piperaceae) extracts demonstrated by chromosomal biomarkers and toxic effects on interphase nuclei.** *Genet. Mol. Res.* 7 (3): 772-781. 2008.

RAPADO, L. N., KATO, M. J., KAWANO, T. **Efeito moluscicida de extratos de Piperaceae sobre no vetor da esquistossomose *Biomphalaria glabrata*.** *BAPA. Boletim Epidemiológico Paulista.* Vol.6 no 63 São Paulo. 2009.

REGASINI, O. L., CONTINGUIBA, F., MORANDIM, A. A., KATO, M. J., SCORZONI, L., MENDES-GIANNINI, M. J., BOLZANI, V. S., FURLAN, M. **Antimicrobial activity of *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum* (Piperaceae) against opportunistic yeasts.** *African Journal of Biotechnology.* 8(12): 2866-2870. 2009a.

REGASINI, O. L., CONTINGUIBA, F., PASSERINI, G. D., BOLZANI, V. S., CICARELLI, R. M. B., KATU, M. J., FURLAN, M. **Trypanocidal activity of *Piper arboreum* and *piper tuberculatum* (Piperaceae).** *Revista Brasileira de Farmacognosia.* 19 (1): 199-203. 2009b.

REGIS, L., SILVA, S.B., MELO-SANTOS, M. A. **The use of bacterial larvicides in Mosquito and Black Fly control programmes in brazil.** *Mem Inst Oswaldo Cruz,* Vol. 95, Suppl. I: 207-210, 2000.

REY, L. **Bases da parasitologia médica.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1992.

REZENDE A. A.; SILVA, M. L. A.; CUNHA, W. R. **The effect of the dibenzylbutyrolactolic lignan (-)-cubebin on doxorubicin mutagenicity and recombinogenicity in wing somatic cells of *Drosophila melanogaster*.** *Food and Chemical Toxicology* 49, 1235-41.2011.

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

RIDTITID, W., RATTANAPROM, W., THAINA, P., CHITTRAKARN, S., SUNBHANICH., M. **Neuromuscular blocking activity of methanolic extract of *Piper sarmentosum* leaves in the rat phrenic nerve-hemidiaphragm preparation.** *Journal of Ethnopharmacology*. 61: 135-142. 1998.

ROEL, A. R.; VENDRAMIM, J. D.; FRIGHETTO, R. T. S.; FRIGHETTO, N. **Efeito do extrato acetato de etila de *Trichilia pallida* Swartz (Meliaceae) no desenvolvimento e sobrevivência da Lagarta-do-cartucho.** *Bragantia* - Campinas, 59(1), 53-58, 2000.

ROZENDAAL, J.A. **Vector Control: Methods for Use by Individuals and Communities.** *World Health Organization, Geneva*. 1997.

RUAS-NETO, A. L.; SILVEIRA, S. M.; COLARES, E. R. A. C. Mosquito control base don larvicides in the State of Rio Grande do Sul, Brazil: choice of the control agent. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 10, n. 2, p. 222-230, 1994.

RUKACHAISIRIKUL, T., SIRIWATTANAKIT, P., SUKCHAROENPHOL, K., WONGVEIN, C., RUTTANAWEANG, P., WONGWATTANAVUCH, P., SUKSAMRARN, A. **Chemical constituents and bioactivity of *Piper sarmentosum*.** *Journal of Ethnopharmacology* 93: 173-176. 2004.

RUPPERT, E.E., D.R. BARNES. **Zoologia dos Invertebrados.** São Paulo, Rocca, 6ª ed. 1996.

SALEHZADEH A, JABBAR A, JENNENS L, LEY SV, ANNADURAI RS, ADAMS R & STRANG RH. **The effects of phytochemical pesticides on the growth of cultured invertebrate and vertebrate cells.** *Pest Management Science* 58: 268-276.2002.

SANTIAGO, G. M. P., VIANA, F. A., PESSOA, O. D. L., SANTOS, R. P., POULIQUEN, Y. B. M., ARRIAGA, A. M. C., ANDRADE-NETO, M., BRAZFILHO, R. **Avaliação da atividade de saponinas triterpênicas isoladas de *Pentaclethra macroloba* (Willd.) Kuntze (Fabaceae) e *Cordia piauhiensis* Fresen (Boraginaceae) sobre *Aedes aegypti*.** *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 15 (3): 187- 190. 2005.

SANTOS, B. V. O., CHAVES, M. C. O. **2,4,5-Trimethoxypropiofenone from *Piper marginatum*.** *Biochemical Systematics and Ecology*. 27: 539-541. 1999.

SCHATZMAYR, Hermann. **As incógnitas do dengue. NEXO: Revista da Faperj**, Rio de Janeiro, n.2, p.28-29, fev.2003.

SENGUPTA, S.; RAY, A.B.; *Fitoterapia*, 3, 147. 1987.

SHAALAN, E.A.S., CANYON, D., YOUNES, M. W. F. WAHAB, H. A., MANSOUR, A. H. **A review of botanical phytochemicals with mosquitocidal potential.** *Environment International*, v.31, p.1149 -66, 2005.

SILVA, H. H. G., SILVA, I. G., SANTOS, R. M. G., FILHO, E. R., ELIAS, C. N. **Atividade larvicida de taninos isolados de *Magonia pubescens* St. Hil. (Sapindaceae) sobre *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae).** *Revista da sociedade brasileira de medicina tropical*. 37(5): 396-399. 2004.

SILVA, I. G., GUIMARÃES, V. P., LIMA, C. G., SILVA, H. H. G., ELIAS, C. N., MADY, C. M., SILVA, V. V. M., NERY, A. P., ROCHA, K. R., ROCHA, C., ISAC, E. **Efeito larvicida do extrato bruto etanólico da casca do caule de *Magonia pubescens* sobre *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae), em criadouros artificiais.** *Revista de Patologia Tropical*. 32 (1): 73-86. 2003.

SILVA, I. G., SILVA, H. H. G., GUIMARÃES, V. P., LIMA, C. G., PEREIRA, A. L., RODRIGUES FILHO, E., ROCHA, C. **Prospecção da atividade de plantas do Cerrado, visando o combate do *Aedes aegypti*.** *Informe Epidemiológico do SUS*. 10 (Supl. 1): 51-52. 2001.

SILVA, M. A. **Estudo fitoquímico das raízes de *piper alatabaccum* Trel & Yuncker (Piperaceae).** Trabalho de conclusão de curso (Graduação). Fundação Universidade Federal de Rondônia. 2009.

SILVA, R. V., NAVICKIENE, H. M. D., KATO, M. J., BOLZANI, V. S., MÉDA, C. I., YOUNG, M. C. M., FURLAN, M. **Antifungal amides from *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*.** *Phytochemistry*. 59: 521-527. 2002.

SILVA, W.C., RIBEIRO, J.D'ARC, SOUZA, H.E.M., CORRÊA, R.S. **Atividade inseticida de *Piper aduncum* L. (Piperaceae) sobre *Aetalion* sp. (Hemiptera: Aetalionidae), praga de importância econômica no Amazonas.** *Acta Amazonica*, 37(2): 293-298. 2007.

SIMAS, N. K., LIMA, E. C., CONCEIÇÃO, S. R., KUSTER, R. M., OLIVEIRA FOLHO, A. M. **Produtos naturais para o controle da transmissão da dengueatividade larvicida de *Myroxylon balsamum* (óleo vermelho) e de terpenóides e fenilpropanóides.** *Química Nova*. 27(1): 46-49. 2004.

SIMAS, N. K.; LIMA, E. C.; KUSTER, R. M.; LAGE, C. L. S.; DE OLIVEIRA FILHO, A. M. **Potencial use of *Piper nigrum* ethanol extract against pyrethroidresistant *Aedes aegypti* larvae.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* 40 (4): 405-407, 2007.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; DE MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R.. ***Farmacognosia: da planta ao medicamento.*** 5. Ed. Porto Alegre - Florianópolis: UFRGS/ UFSC, 2004.

SOLOMONS, T. W. G., FRYHLE, C. B. **Química orgânica 2.** 8.Ed. Rio de Janeiro: LTC, 2006.

SOUTO RNP. **Avaliação das atividades repelente e inseticida de óleos essenciais de *Piper* da Amazônia em *Anopheles marajoara*, *Stegomyia aegypti* e *Solenopsis saevissima*.** Belém, 221p. *Tese de doutorado: Curso de Pós-Graduação em Zoologia, Universidade Federal do Pará e Museu Paraense Emílio Goeldi.* 2006.

SOUZA, J. P. I.; ARRUDA, A. C.; ARRUDA, M. P. S. **Highly-methoxylated flavones from *Neoraputia paraensis*.** *Fitoterapia.* 66(5): 465-6.1995.

SOUZA, V. C., LORENZI, H. **Botânica Sistemática Guia Ilustrado para Identificação da Flora Brasileira, baseado em APGII.** Nova Odessa- SP: Instituto Plantarum de Estudo da Flora LTDA. p 89. 2005.

TREVISAN, M. T. S., BEZERRA, M. Z. B., SANTIAGO, G. M. P., FEITOSA, C. M. **Atividades larvicida e anticolinesterásica de plantas do gênero *Kalanchoe*.** *Quim. Nova.* 29 (3): 425-418. 2006.

TRINDADE, T. T. F., STABELI, R. G., FACUNDO, V. A., CARDOSO, C. T., SILVA, M. A., GIL, L. H. S., JARDIM, I. S., SILVA, A. A. **Evaluation of larvicidal activity of the methanolic extracts os *Piper alatabaccum* branches and *P. tuberculatum* leaves and compounds isolated against *Anopheles darling*.** *Rev. Bras. Farmacogn.* 2012.

VASCONCELOS, PF. C., TRASSOS DA ROSA, E. S., TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S., FREITAS, R. B., DÉGALLIER, N., RODRIGUES, S. G., TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A. **Epidemia da febre clássica de dengue causada pelo sorotipo 2 em Araguaína, Tocantis, Brasil.** *Rev. Med. Trop. São Paulo.* 35(2): 141-148. 1993.

VAZEILLE, M. ROSE, L., MOUSSON, L. FAILLOUX, A. **Low oral receptivity for dengue type 2 viruses of *Aedes albopictus* from Southeast Asia compared with of *Aedes aegypti*.** *An. J. Med. Hyg.,* 68 (2): 203-208. 2003.

WEBERLING, F., SCHWANTES, H. O. **Taxonomia vegetal**. São Paulo; EPU, p 64. 1986.

WHO- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicidas. 2005.

WHO- World Health Organization. **Dengue Bulletin**. Volume 34, December 2010.

WIESBROOK, M.L. **Natural indeed: are natural insecticides safer and better than conventional insecticides?** *Illinois Pesticide Review*, Urbana, v.17, n.3, p.1-3, 2004.

WU, Q. L., WANG, P. S., TU, G. Z., FENG, Y. X., YAHG, J. S. **Alkaloids from *Piper puberullum***. *Phytochemistry*. 44 (4): 727-730, 1997.

YANG, D., MICHEL, L., CHAUMONT, J.P., CLERC, J.M. **Use of caryophyllene oxide as an antifungal agent in an *in vitro* experimental model of onychomycosis**. *Mycopathologia*, 148:79- 82. (1999).

YANG, Y.C., LEE, S.G., LEE, H.K., KIM, M.K., LEE, S.H. & LEE, H.S. **A piperidine amide extracted from *Piper longum* L. fruit shows activity against *Aedes aegypti* mosquito larvae**. *J. Agric. Food. Chem.* 50 (13): 3765- 3767. 2002.

ZHANG, H., MATSUDA, H., NAKAMURA, S., YOSHIKAWA, M. **Efecta of amide constituents from pepper on adipogenesis in 3T3-L1 cells**. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 18: 3272- 3277. 2008.