

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

Alguns aspectos químicos envolvidos na interação
Hypsipyla grandella* (broca-do-mogno) e *Swietenia
***macrophylla* (Mogno)**



MARISI GOMES SOARES*

597.3
S 676 aa

Tese apresentada como parte
dos requisitos para a obtenção do
título de DOUTOR EM CIÊNCIAS
(Área QUÍMICA ORGÂNICA)

Orientador: Dr. João Batista Fernandes

*** Bolsista Fapesp**

SÃO CARLOS

2002



COAÇÃO
DE. *Autors*.....
EM. *15/04/03*.....
VALOR EST. *R\$ 20,00*.....

Clas. *T547.3*
Cutt. *S676aa*
e.1
Tombo: *134558*

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar

S676aa Soares, Marisi Gomes.
Alguns aspectos químicos envolvidos na interação
Hypsipyla grandella (broca-do-mogno) e *Swietenia*
macrophylla (Mogno) / Marisi Gomes Soares . -- São Carlos
: UFSCar, 2003.
133 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos,
2002.

1. Produtos naturais. 2. *Hypsipyla grandella*. 3. *Swietenia*
macrophylla. 4. Óleos voláteis. I. Título.

CDD: 547.3 (20^a)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Departamento de Química
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
Curso de Doutorado

*Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou o exame de tese de doutorado da candidata **Marisi Gomes Soares** realizado em 08 de novembro de 2002:*



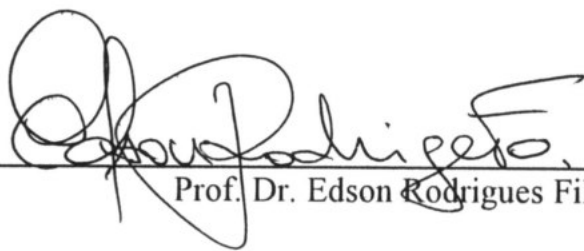
Prof. Dr. João Batista Fernandes



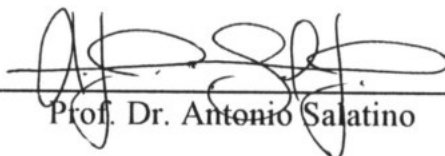
Prof. Dra. Maria Luiza Faria Salatino



Prof. Dr. Paulo Cezar Vieira



Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho



Prof. Dr. Antonio Salatino

Dedico este trabalho a todos brasileiros que sonham com uma vida melhor, e batalham por ela de forma honrada. Mesmo não tendo as oportunidades que merecem, ainda assim não desistem e são felizes.

Agradecimentos

A Universidade Federal de São Carlos por mais esta oportunidade;

Ao meu orientador, prof. Dr. João Batista Fernandes, pela orientação, disponibilidade em aceitar idéias novas e pela amizade;

A CEPLAC sementes, Marituba, PA, pelos brotos do mogno e por toda discussão sobre a ecologia do mogno

Ao Eng^o florestal Sr. Evaristo Terezo, que colaborou de forma decisiva para que meu trabalho no Pará pudesse se tornar viável, e pelo conhecimento transmitido sobre mogno e idéias discutidas.

Aos amigos do grupo de Produtos Naturais por toda amizade e companheirismo.

Aos professores do Grupo PN Dra. Fátima, pelo incentivo e colaboração com este trabalho e ao Dr. Edson Rodrigues Filho e Dr. Paulo Cezar Vieira.

A Dra. Luciane Batista pela colaboração efetiva com os ensaios de eletroantogramas.

A Michael Murgu pela colaboração com os trabalhos de CL/EM e principalmente pela amizade.

A Eng^o florestal Ms Anadilza Valente Baima, pelas valiosas discussões sobre manejo florestal.

A minha família: meus pais Eulair e Dely e meus irmãos: Dely, Dirce, Herculano, Márcio e Délio pelo apoio incondicional.

A João Paulo, por todo amor, colaboração, dedicação e compreensão dispensados.

A Dirlane e Doriguetto, amigos e colaboradores de sempre.

A Neide, Zete, Nete, Leto pela amizade e apoio constantes.

A todos meus amigos, pois todos foram e serão essenciais para que a vida se torne mais leve.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas.....	i
Lista de tabelas.....	ii
Lista de Figuras.....	vi
Lista de Fluxogramas.....	x
Resumo.....	xi
Abstract.....	xiii
1 – INTRODUÇÃO.....	1
1.1- A Família Meliaceae.....	1
1.2 - <i>Swietenia macrophylla</i> King.....	2
1.3 - Produção e comercialização de madeira de <i>Swietenia macrophylla</i> King na Amazônia tropical.....	5
1.4 - Distribuição geográfica de <i>Swietenia macrophylla</i> King.....	7
1.5 - <i>Hypsipyla grandella</i>	10
1.6 - Métodos de controle.....	12
Controle Químico.....	13
Controle Físico.....	13
Controle Silvicultural.....	13
Controle comportamental.....	14
Ensaio em laboratório.....	15
1.7 - A Evolução dos estudos dos Inseticidas.....	16
1.8 - <i>Spodoptera frugiperda</i> J. E. Smith, 1797 - Noctuidae e <i>Anticarsia Gemmatallis</i> Hueb., 1818 – Noctuidae.....	17
2 - OBJETIVOS.....	19
2.1 - Objetivo geral.....	19

2.2 - Objetivos específicos.....	19
3 - MATERIAL.....	21
3.1 - Material de laboratório.....	21
3.2 - Material Biológico.....	22
4 - PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	24
4.1 - Estudo das folhas de <i>Swietenia macrophylla</i>	25
4.1.1 - Estudo dos subextratos das Folhas de <i>Swietenia macrophylla</i>	26
4.1.1.1 - Fracionamento do subextrato Hexânico – SMFH.....	26
4.1.1.2 - Subextrato Acetoetílico – SMFA.....	26
4.1.1.2.1 - Sub-fração acetoetílica (SMFAcAc).....	27
4.1.1.2.2 - Sub-fração acetoetílica-metanólica (SMFACM).....	28
4.2 - Estudo dos galhos de <i>Swietenia macrophylla</i>	28
4.3 - Análise por CL-EM dos extratos de folhas de <i>S. macrophylla</i> em diferentes estágios de maturação.....	30
4.4 - Óleos voláteis.....	30
4.4.1 Brotos, Folhas maduras e Folhas senescentes de <i>S. macrophylla</i>	30
4.4.2 - Coleta de brotos de <i>S. macrophylla</i> de diferentes procedências para obtenção dos óleos essenciais e observações de ataque.....	30
4.4.3 - Extração dos óleos voláteis.....	32
4.4.4 - Análise dos óleos voláteis.....	33
4.5 - Testes de eletroantenograma – EAG (<i>Electro AntennoGraphy</i>)... ..	34
4.5.1 - Eletroantenograma.....	34
4.6 – Bioensaios.....	36
4.6.1 Ensaio com <i>Spodoptera frugiperda</i> e <i>Anticarsia gemmatilis</i>	36
4.6.1.1 - Obtenção do material utilizado nos testes biológicos.....	36
4.6.1.2 - Montagem do experimento e preparo das dietas.....	37
4.6.1.3 - Preparo da dieta de <i>S. frugiperda</i>	39
4.6.1.4 - Preparo da dieta de <i>A. gemmatilis</i>	39

4.6.2 - Procedimentos para realização dos ensaios biológicos com <i>Hypsipyla grandella</i> – Realizados em Belém –PA.....	39
4.6.2.1 - Coleta do inseto.....	39
4.6.2.2 - Triagem do material.....	40
4.6.2.3 - Separação das pupas por sexo.....	41
4.6.2.4 - Testes biológicos realizados.....	42
4.6.2.4.1 - Teste de preferência alimentar.....	42
4.6.2.4.2 - Testes usando tubos de penicilina e soluções dos extratos das folhas maduras de <i>S. macrophylla</i>	42
4.6.2.4.3 - Testes com substâncias puras.....	43
5- RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	46
5.1- Identificação estrutural dos flavonóides.....	46
5.1.1 – Identificação estrutural de 1, Quercetina, SMFAC8-14.....	47
5.1.2 – Identificação estrutural de 2 – SMFAC13-21.....	48
5.1.3 – Identificação estrutural de 3 – SMFAC-1	57
5.1.4 - Identificação estrutural de 4 - SMFAC-25-48.....	63
5.2 - Identificação estrutural das cumarinas.....	68
5.2.1 - Identificação estrutural de 5.....	68
5.2.2 - Identificação estrutural de 6.....	70
5.3 - Estudo comparativo entre componentes dos brotos, folhas maduras e senescentes de <i>Swietenia macrophylla</i> utilizando técnicas de CL/EM e RMN ¹ H.....	73
5.4 - Estudo comparativo entre componentes voláteis dos brotos e de brotos, folhas maduras e senescentes de <i>Swietenia macrophylla</i> utilizando CL/EM e EAG.....	83
5.4.1 - EAG- <i>Electroantennography</i>	83
5.4.2 - Análise das respostas das antenas de machos de <i>H.</i> <i>grandella</i> relacionadas aos óleos voláteis de <i>S. macrophylla</i> (Mogno)....	84
5.4.3 - Análise das respostas das antenas de fêmeas de <i>H. grandella</i> relacionadas aos óleos voláteis de <i>S. macrophylla</i> (Mogno).....	85
5.4.4 - Respostas dos Experimentos de eletroantenograma-GC-EAD...	87

5.4.4.1 - Gas Chromatography - Electroantenna Detection.....	87
5.4.5 - Análise do óleo volátil dos brotos, folhas maduras e senescentes de <i>S. macrophylla</i>	91
5.5 - Estudo comparativo entre componentes dos óleos voláteis de <i>Swietenia macrophylla</i> de diferentes procedências utilizando CL/EM	94
5.6 - Influência de extratos de <i>Swietenia macrophylla</i> na biologia de <i>Spodoptera frugiperda</i> e <i>Anticarsia gemmatalis</i> (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)	105
5.6.1 - Influência de extratos de <i>Swietenia macrophylla</i> na biologia de <i>Spodoptera frugiperda</i> e <i>Anticarsia gemmatalis</i> (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)	105
5.7 - Influência de substâncias isoladas de folhas maduras de <i>Swietenia macrophylla</i> na biologia de <i>Hypsipyla grandela</i>	108
5.7.1 - Flavonóides	108
5.8 - Influência de substâncias obtidas do cavalo de enxerto de <i>Toona ciliata</i> sobre <i>Cedrela odorata</i> (cedro) na biologia de <i>H. grandela</i>	117
6 - CONCLUSÕES	128
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	129

Lista de Abreviaturas e Siglas

CC	Cromatografia em Coluna
CCD	Cromatografia em Camada Delgada de Sílica
CG/EM	Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas
CLAE	Cromatografia Líquido de Alta Eficiência
CLAE-R	Cromatografia Líquido de Alta Eficiência Reciclante
d	Dubleto
dd	Duplo Dubleto
dl	Dubleto Largo
DMSO	Dimetilsulfóxido
EAG	Electroantennography
EM	Espectrometria de Massas
FAB	Bombardeio com átomos Acelerados
GC-EAD	Gas Chromatography - Electroantenn Detection
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
<i>J</i>	Constante de acoplamento
LSIMS	Espectrometria de massas de íons secundários em fase líquida
m	Multiplete
<i>m/z</i>	Relação massa/carga
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
s	Singleto

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Principais países importadores madeira serrada de <i>Swietenia macrophylla</i> King no período de 1993 a 1997.....	7
Tabela 2	- Dieta Artificial para <i>Spodoptera frugiperda</i>	38
Tabela 3	- Dieta Artificial para <i>Anticarsia gematalis</i>	38
Tabela 4	- Dados de RMN ^1H de 1 (quercetina).....	48
Tabela 5	- Dados de RMN de ^1H de 2, DMSO, 400 MHz.....	50
Tabela 6	- Dados de RMN ^{13}C de 2.....	56
Tabela 7	- Dados de RMN de ^1H de 3, DMSO , 400 MHz.....	59
Tabela 8	- Dados de RMN de ^{13}C de 3, DMSO , 400 MHz.....	62
Tabela 9	- Dados de RMN de ^1H de 4, 400 MHz, DMSO.....	65
Tabela 10	- Dados de RMN ^{13}C de 4, 400 MHz, DMSO.....	67
Tabela 11	- Dados de RMN ^1H dos flavonóides 1 – 4.....	80
Tabela 12	- Respostas eletroantegráficas das antenas de machos de <i>Hypsipylla grandella</i> para os óleos essenciais obtidos de mogno.....	84
Tabela 13	- Respostas eletroantegráficas das fêmeas de <i>Hypsipylla grandella</i> para os óleos essenciais obtidos de mogno.....	86
Tabela 14	- Substâncias identificadas nos brotos, folhas maduras e senescentes de <i>S. macrophylla</i> , índice de Kovat (obtidos e literatura) e as porcentagens relativas das mesmas nos óleos essenciais estudados.....	92

Tabela 15	- Substâncias comuns aos óleos essenciais dos brotos, folhas maduras e senescentes de <i>S. macrophylla</i> , índice de Kovat (obtidos e literatura) e as porcentagens relativas das mesmas.....	93
Tabela 16	- Dados de observações de ataques a mognos de diferentes regiões plantados na Fazenda Tramontina, em Aurora do Pará, PA.....	94
Tabela 17	- Componentes do óleo essencial de brotos de procedência de Santarém.....	96
Tabela 18	- Componentes do óleo essencial de brotos de procedência de Juína.....	97
Tabela 19	- Componentes do óleo essencial de brotos de procedência de Castelo dos Sonhos.....	98
Tabela 20	- Componentes do óleo essencial de brotos de procedência de Urueu-uau-uau (RO)	99
Tabela 21	- Componentes do óleo essencial de brotos de procedência de Vila Progresso.....	100
Tabela 22	- Compostos coincidentes em pelo menos três óleos essenciais de <i>S. macrophylla</i> de diferentes origens.....	100
Tabela 23	- Principais componentes dos óleos essenciais de brotos de <i>S. macrophylla</i> (Concentração superior a 1%).....	101
Tabela 24	- Componentes gerais presentes nos óleos essenciais de brotos de <i>S. macrophylla</i> de diferentes origens.	102
Tabela 25	- Duração (dias) da fase larval de <i>S. frugiperda</i> sob a ação do extrato bruto (1000 ppm) das folhas de <i>S. macrophylla</i> incorporado na sua dieta artificial.	106
Tabela 26	- Resultados dos ensaios do extrato bruto (2000 ppm) das folhas de <i>S. macrophylla</i> na biologia de <i>S. frugiperda</i> criada em dieta artificial.	107

Tabela 27	- Resultados dos ensaios com os sub-extratos das folhas de <i>S. macrophylla</i> (2000 ppm) na biologia de <i>A. gemmatalis</i> criada em dieta artificial.....	107
Tabela 28	- Datas das mortes e empupamento relativas ao controle (solvente), com Postura em 24/03/01, Eclosão em 26/03/01, Inoculação em 30/03/01.....	109
Tabela 29	- Datas das mortes relativas ao tratamento com 1 (quercetina), com postura em 1/4/01, Eclosão em 4/4/01 e Inoculação em 9/4/01.	110
Tabela 30	- Datas das mortes relativas ao tratamento com 2, com postura em 24/3/01, Eclosão em 26/3/01e Inoculação em 30/3/01.	111
Tabela 31	- Datas das mortes relativas ao tratamento com 4, com postura em 24/3/01, Eclosão em 26/3/01 e Inoculação em 30/3/01.	112
Tabela 32	- Datas das mortes relativas ao tratamento com 3, com postura em 27/3/01, Eclosão em 29/3/01 e Inoculação em 2/4/01.	113
Tabela 33	- Dados estatísticos obtidos para o tratamento de <i>H. grandella</i> com 1 (quercetina).....	114
Tabela 34	- Dados estatísticos obtidos para o tratamento de <i>H. grandella</i> com 2.....	114
Tabela 35	- Dados estatísticos obtidos para o tratamento de <i>H. grandella</i> com 4.....	114
Tabela 36	- Dados estatísticos obtidos para o tratamento de <i>H. grandella</i> com 3.....	115
Tabela 37	- Datas das mortes e empupamento relativas ao controle (solvente), com Postura em 24/03/01, Eclosão em 26/03/01, Inoculação em 30/03/01.....	117
Tabela 38	- Datas das mortes relativas ao tratamento com HB4, com postura em 28/3/01, Eclosão em 30/3/02 e Inoculação em 3/4/01.	118

Tabela 39	- Datas das mortes relativas ao tratamento com PR12, com postura em 28/3/01, Eclosão em 30/3/02 e Inoculação em 3/4/01.	119
Tabela 40	- Datas das mortes relativas ao tratamento com HC8, com postura em 28/3/02, Eclosão em 31/3/01 e Inoculação em 4/4/01.	120
Tabela 41	- Datas das mortes relativas ao tratamento com HC76, com postura em 1/4/01, Eclosão em 4/4/01 e Inoculação em 8/4/01.	121
Tabela 42	- Datas das mortes relativas ao tratamento com Cedrelona, com postura em 1/4/01, Eclosão em 4/4/01 e Inoculação em 9/4/01.....	122
Tabela 43	- Dados estatísticos obtidos para o tratamento com HC8.....	123
Tabela 44	- Dados estatísticos obtidos para o tratamento com HC76.....	123
Tabela 45	- Dados estatísticos obtidos para o tratamento com PR12.....	124
Tabela 46	- Dados estatísticos obtidos para o tratamento com Cedrelona.....	124
Tabela 47	- Dados estatísticos obtidos para o tratamento com HB4	124

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Estrutura da azadiractina.....	2
Figura 2	- Árvore de <i>S. macrophylla</i> localizada no Sul do Pará.....	3
Figura 3	- Gráfico do volume de <i>Swietenia macrophylla</i> King exportado pelo Estado do Pará no período de 1991 a 1997.	6
Figura 4	- Distribuição geográfica de <i>Swietenia macrophylla</i> King na faixa de ocorrência proposta por (LAMB 1966), desde o México até os países das Américas Central e do Sul.....	8
Figura 5	- Ocorrência de <i>Swietenia macrophylla</i> King na Amazônia brasileira.....	10
Figura 6	- Larva de <i>H. grandella</i>	11
Figura 7	- Larva de <i>H. grandella</i> se alimentando no interior do broto (Foto realizada no campo em Mãe do Rio-PA).....	11
Figura 8	- <i>H. grandella</i> na fase de mariposa e ovos férteis.....	12
Figura 9	- Coleta de brotos de diferentes procedências na fazenda Tramontina.....	31
Figura 10	- Sistema de extração do tipo <i>Clevenger</i> modificado.....	33
Figura 11	- Esquema de um eletrodo usado nos experimentos de EAG.	35
Figura 12	- Esquema de funcionamento de um equipamento de EAD....	36
Figura 13	- Foto mostrando o procedimento de eclosão de ovos.....	41
Figura 14	- Ensaio biológico utilizando frascos do tipo penicilina.....	44
Figura 15	- Aplicação das soluções nas folhas de <i>S. macrophylla</i>	44
Figura 16	- Espectro de RMN 1H ampliado de 1 (quercetina), DMSO, 400MHz.....	47
Figura 17	- Espectro de RMN 1H de 2, DMSO, 400 MHz, programa ZG	49

Figura 18	- Espectro de RMN 1H de 2, DMSO, 400 MHz, programa ZGPR.....	49
Figura 19	- Correlações observadas através do espectro de COSYGR para o 2.	50
Figura 20	- Espectro de RMN 1H COSYGR de 2., DMSO, 400MHz.....	51
Figura 21	- Espectro de RMN HSQC de 2, DMSO, 400 MHz.....	52
Figura 22	- Correlações observadas através do espectro de HSQC-GR de 2.....	52
Figura 23	- Espectro de RMN HMBC de 2, DMSO, 400 MHz.....	55
Figura 24	- Espectro de RMN 13C de 2, DMSO, 400MHz.....	55
Figura 26	- Ampliação da região δ 3,0-7,7 do espectro de RMN 1H de 3, obtido com pré-saturação do sinal da água.....	59
Figura 27	- Espectro de 1HX1H COSYGR de 3, 400 MHz, DMSO.....	60
Figura 28	- Espectro de massas – “Eletrospray” de 3.....	61
Figura 29	- Espectro de RMN 13C de 3, 400 MHz, DMSO.....	61
Figura 30	- Espectro de RMN 1H de 4, 400 MHz, DMSO.....	64
Figura 31	- Ampliação da região aromática do espectro de RMN 1H de 4, 400 MHz, DMSO.....	65
Figura 32	- Espectro de RMN 13C de 4, 400 MHz, DMSO.....	66
Figura 33	- Espectro de RMN 1H de 5, CDCl ₃ , 400 MHz.....	69
Figura 34	- Cromatograma de íons totais e EM de 5.....	69
Figura 35	- Interpretação do espectro de massas de 5.....	70
Figura 36	- Espectro de RMN 1H de 6, , 400 MHz.....	71
Figura 37	- EM de 6.	71
Figura 38	- Interpretação dos principais íons do espectro de massas 6..	72
Figura 40	- CLAE-UV para a amostra de brotos.....	75
Figura 41	- CLAE-UV para a amostra de folhas maduras.....	76
Figura 42	- CLAE-UV para a amostra de folhas senescentes.....	76
Figura 43	- Espectro de massas dos principais picos apresentados nas janelas de 15,5 e 17,5 minutos para extratos de broto, folhas maduras e senescentes.	77

Figura 44	- Cromatograma de massas do íon m/z 300 para extratos de brotos, folhas maduras e senescentes.....	78
Figura 45	- Espectro de MS/MS dos íons pais de m/z 300.....	79
Figura 46	- Ampliação do espectro de 1H do extrato bruto de brotos de <i>S. macrophylla</i> , DMSO, 400MHz.....	81
Figura 47	- Ampliação do espectro de 1H do extrato bruto de folhas maduras de <i>S. macrophylla</i> , DMSO, 400MHz.....	81
Figura 48	- Ampliação do espectro de 1H do extrato bruto de folhas velhas de <i>S. macrophylla</i> , DMSO, 400MHz.....	82
Figura 50	- Valores médios das porcentagens de respostas de machos de <i>H. Grandella</i> aos óleos essenciais de <i>Swietenia macrophylla</i>	85
Figura 51	- Valores médios das porcentagens de respostas de fêmeas de <i>H. Grandella</i> aos óleos essenciais de <i>Swietenia macrophylla</i>	86
Figura 52	- Valores médios das porcentagens respostas de fêmeas e machos de <i>H. Grandella</i> aos óleos essenciais de <i>Swietenia macrophylla</i>	87
Figura 53	- Resposta eletroantenográfica do óleo essencial de brotos de Mogno (0,1 mg/mL) em antena de macho de <i>Hypsipyla grandella</i> (segunda escotofase).....	88
Figura 54	- Resposta do óleo essencial de folhas maduras de Mogno (0,1 mg/mL) em antena de fêmea de <i>Hypsipyla grandella</i> (segunda escotofase).....	89
Figura 55	- Resposta do óleo essencial de folhas maduras de Mogno (0,1 mg/mL) em antena de fêmea de <i>Hypsipyla grandella</i> (segunda escotofase).....	90
Figura 56	- Resposta do óleo essencial de folhas maduras de Mogno (0,1 mg/mL) em antena de macho de <i>Hypsipyla grandella</i> (segunda escotofase).....	91

Figura 57	- Gráfico relacionando os flavonóides testados e o número de dias de sobrevida das lagartas.	116
Figura 58	- Gráfico relacionando os flavonóides testados e o número de dias de sobrevida das lagartas.....	116
Figura 59	- Comparação de lagarta de <i>H. grandella</i> se alimentado em folhas tratadas com Cedrelona (menor) e o controle (maior).	122
Figura 60	- Gráfico relacionando os terpenóides testados e o número de dias de sobrevida das lagartas.....	125
Figura 61	- Gráfico relacionando os terpenóides testados e o número de dias de sobrevida das lagartas.....	126
Figura 62	- Gráfico relacionando os flavonóides e terpenóides testados com o número de dias de sobrevida das lagartas.....	126
Figura 63	- Estruturas dos terpenóides e da cedrelona testados em <i>H grandella</i>	127

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1	- Esquema geral para a obtenção dos extratos das partes aéreas da planta.....	24
Fluxograma 2	- Fracionamento por partição das folhas de <i>Swietenia macrophylla</i>	25
Fluxograma 3	- Metodologia usada para isolar os constituintes do subextrato hexânico (SMFH).....	26
Fluxograma 4	- Metodologia usada para isolar os constituintes do subextrato acetoetílico (SMFA). CCS = cromatografia em coluna de sílica gel	27
Fluxograma 5	- Metodologia usada para isolar os constituintes dos galhos de <i>S. macrophylla</i>	29

RESUMO

“Alguns aspectos químicos envolvidos na interação *Hypsipyla grandella* (broca do mogno) e *Swietenia macrophylla* (Mogno)” foram estudados com o objetivo de compreender os aspectos químicos e ecológicos envolvidos nesta interação. *H. grandella* é uma broca que ataca os brotos de mogno, levando a grandes prejuízos em reflorestamentos, principalmente quando usados em monoculturas. Neste trabalho foram realizados, também, ensaios biológicos com *Spodoptera frugiperda* e *Anticarsia gemmatalis*, e testadas a atividades de extratos de folhas de *S. macrophylla* sobre a biologia destes insetos. O extrato acetato de etila das folhas maduras de *S. macrophylla*, constituído principalmente por flavonóides, foi o que apresentou maior atividade, levando à morte de todas as larvas de *A. gemmatalis*. Os flavonóides isolados das folhas de *S. macrophylla* foram: quercetina e mais três flavonóides glicosilados, com o mesmo esqueleto da quercetina e substituídos na posição 3 pelos glicosídeos: raminose (2) glicose (3) e galactose (4). Estas substâncias foram testadas em larvas de *H. grandella* e todas apresentaram efeitos tóxicos. Foram submetidos a testes com *H. grandella* terpenóides isolados do cavalo de enxerto de *Cedrela* sobre *Toona*, apresentando resultados semelhantes aos flavonóides. Os flavonóides presentes nos brotos, folhas maduras e senescentes foram estudados através de CL/EM e foi observada apenas a presença do flavonóide 4 nos brotos e nas folhas maduras e senescentes estão presentes os mesmos flavonóide junto com o flavonóide 2. Como apenas os brotos são atacados pela broca, foram realizados ensaios eletroantenográficos para determinar quais os óleos voláteis estavam envolvidos nesta interação, e se poderiam estabelecer algum tipo de resposta de orientação de olfato para escolha da planta hospedeira. Os ensaios eletroantenográficos com óleos essenciais de brotos, folhas maduras e folhas senescentes de mogno mostraram que as repostas foram maiores para brotos que para os demais e também que as repostas foram maiores para antenas de fêmeas que para antenas de machos. Observações em campo mostraram que árvores de *S. macrophylla* plantadas numa mesma região, porém com mudas de diferentes origens, apresentaram suscetibilidades diferentes ao ataque de *H. grandella*. Assim, seus óleos

voláteis foram estudados para se estabelecer quais constituintes seriam responsáveis por esta diferença, porém não foi identificada esta correlação.

ABSTRACT

The interaction between *Hypsipyla grandella* (Mahogany borer) and *Swietenia macrophylla* was studied in order to understand the chemical and ecological aspects involved on this process. *H. grandella* is a shoot borer lepidoptera which attack the shoots of the mahogany causing serious economic problems for large scale plantation of this trees. In this work, it was done biological tests with *Spodoptera frugiperda* and *Anticarsia gemmatalis*, using the crude extracts from mature leaves against. The ethyl acetate extract, which is composed basically by flavonoids, showed the best activity, killing all *A. gemmatalis* larvae. The flavonoids from the *S. macrophylla* mature leaves were: quercetin (1) and three glycosiled flavonoids with quercetin skeleton substituted by rhamnose (2) glucose (3) and galactose (4) in the 3 position. The compounds were also tested against larvae of the *H grandella*, which showed toxicity to its larvae. Terpenoids isolated from down part of graft of *Cedrela-Toona*, was submitted to same test and the results obtained showed the same activity. As the borer attacked only the shoots, eletroantenographic studies were performed in order to determinate if the oils involved in this interaction exercise some kind of olfactory orientation on the process to choice the host plant for this lepidoptera. In the eletroantenographyc study were used volatile oils from the young shoots, mature leaves and senescent leaves of the *S. macrophylla*. The young shoots showed high electrophysiological responses and the female antennas showed better responses than the male one. The main compounds of the young shoot, mature leaves and senescent leaves were studied by LC/MS. Observations in large scale plantations showed that mahogany trees from the same place, but with origin from different place showed different attacks from the *H grandella*. The volatile oils from mahogany of different origin were studied, however no correlation was observed.

1 – INTRODUÇÃO

1.1- A Família Meliaceae

A família Meliaceae, à qual pertence *Swietenia macrophylla* (mogno), compreende 51 gêneros e 1400 espécies de plantas arbóreas de grande porte e de distribuição nos trópicos e subtropicais de ambos os hemisférios, segundo RIZZINI (1971) e BANERJI (1984).

No Brasil estão representados sete gêneros da família Meliaceae, dentre os quais *Swietenia* (mogno), *Carapa* (andiroba) e *Cedrela* (cedro-branco, cedro-rosa, cedro-vermelho) que apresentam grande interesse econômico por parte das indústrias madeireiras.

A característica química da família Meliaceae é a presença de substâncias amargas conhecidas como meliacinas ou limonóides, que apresentam o esqueleto básico de 26 átomos de carbonos que também são encontrados nas famílias Rutaceae e Cneuraceae (CHAMPAGNE, 1992). A grande diversidade de atividades biológicas apresentadas pelos limonóides, principalmente atividade inseticida, é um dos motivos que tornam esta família bastante interessante quimicamente.

Um limonóide chamado Azadiractina, isolado de uma árvore da Índia (*Azadirachta indica*) e conhecida popularmente por Neen, apresenta atividades inseticidas sobre cerca de 200 espécies de insetos. (CHAMPAGNE, 1992, YAMAZAKI et al., 1987). Esta árvore é cultivada no Norte do Brasil com a finalidade de obtenção de inseticida. Geralmente se usa o extrato dos frutos da planta, um macerado que se aplica sobre a lavoura. Como se pode observar, a estrutura de azadiractina (Figura 1) é complexa e de difícil síntese, o que acarreta um preço mais alto do produto. Assim, é mais simples para o agricultor plantar a árvore e aplicar o macerado diretamente sobre a cultura a ser protegida.

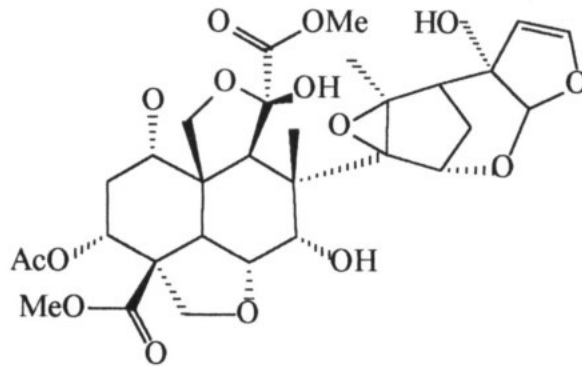


Figura 1- estrutura molecular da azadiractina

1.2 - *Swietenia macrophylla* King

O Mogno (*Swietenia macrophylla* King) (Figura 2) é uma das espécies mais importantes no mercado mundial de madeiras, tem uma extensa distribuição geográfica desde o México até as Amazônias Boliviana e Brasileira.

A árvore do mogno é considerada de grande porte, atingindo até 50 metros de altura, podendo chegar até dois metros de diâmetro (GULLISON et al, 1996), com fuste cilíndrico, reto, sapopemas basais, folhas perenes, com curto período de desfolha por ocasião da maturação das sementes, no período aproximado que vai de julho a outubro na região do Araguaia (VERÍSSIMO et al, 1995). A casca apresenta coloração pardo-avermelhada, escura, rosada internamente, espessa e sulcada. As copas das árvores maduras apresentam folhagens densas, de coloração forte com ramificação pesada e bem distribuída, que variam de 10 m a 20 metros de diâmetro, podendo alcançar até 40 metros de copa com tendência a irregularidades, sendo caracterizadas por poucos galhos primários de grande porte (LAMB, 1966; GULLISON et al, 1996).

No Brasil, a espécie ocorre nas florestas do sul da Amazônia Legal (BARROS et al, 1992; VERÍSSIMO et al, 1995).



Figura 2 – Árvore de *S. macrophylla* localizada no Sul do Pará

A intensa exploração florestal realizada de forma altamente seletiva, ou seja, explorando apenas determinadas espécies, está colocando em risco de extinção algumas espécies de grande importância no mercado internacional, como por exemplo *Swietenia macrophylla* King. O alto valor dessas espécies tem estimulado a exploração descontrolada, sem nenhuma preocupação em desenvolver técnicas de manejo com o intuito de conservá-las.

A importância social e econômica da exploração do mogno é incontestável. No estado do Pará, a atividade madeireira em geral, ocupa o segundo lugar em geração de divisas. Em 1997, as exportações de madeiras somaram 330 milhões de dólares, dos quais 200 milhões foram referentes a madeiras serradas. O mogno contribuiu com cerca de 10% desse total exportado

pelo Estado. Nesse mesmo ano, do total de madeira produzida no Pará (850.000 m³), 7,65% (65.000 m³) foram madeira serrada de mogno para exportação. Estima-se que outros 80.000 m³ são destinados ao mercado interno, e o Pará exporta aproximadamente 45% do mogno produzido, sendo o maior exportador mundial dessa valiosa madeira. A atividade madeireira gera cerca de 15.000 empregos diretos e indiretos no Pará (AIMEX, 1998).

Há também uma preocupação crescente no meio científico, em relação às práticas atuais de extração de mogno, que removem aproximadamente 95% das árvores de tamanho comercial, podendo causar uma redução drástica na variabilidade genética da espécie, colocando o mogno em risco de extinção. Este risco aumenta por tratar-se de uma espécie que apresenta limitações relacionadas tanto com a sua regeneração natural como com a regeneração artificial (plantios). (VERÍSSIMO et al, 1995)

Os plantios, tanto em plena abertura como na forma de enriquecimento das florestas, são seriamente afetados pela broca dos ponteiros (*Hypsipyla grandella* Zeller). (NEWTON, et al. , 1993). A broca recebe este nome porque os brotos jovens dessas plantas sofrem drásticos ataques de larvas do lepdóptero do gênero *Hypsipyla*. Esse ataque chega a provocar a morte dos brotos, estimulando a formação de vários outros brotos laterais, levando à ramificação na copa do vegetal jovem. Como consequência, tem-se a formação de árvores adultas com muitos ramos, de troncos curtos e não homogêneos, chamados de vassoura, perdendo assim o interesse de extração pelas indústrias madeireiras.

Pesquisas realizadas (SNOOK, 1996; GULLISON et al, 1996) mostram que na Bolívia, no Brasil e no México existe pouca ou nenhuma regeneração do mogno após a exploração. No caso do Brasil, são poucos os levantamentos sistemáticos do *status* das populações da espécie.

A falta de conhecimento sobre a ecologia e silvicultura da espécie e o temor pela sua extinção levaram a três tentativas, sem sucesso, de incluir o mogno no Anexo II da CITES (Convention on International Trade in Endangered Species - Convenção sobre o Comércio Internacional de Espécies Ameaçadas da

Fauna e da Flora Silvestre), o que significaria a introdução de sérias restrições à sua exploração e exportação, tornando uma espécie de difícil comércio.

Atualmente, os mognos brasileiro e boliviano encontram-se no Anexo III da CITES. Um dos critérios para que uma espécie seja incluída no Apêndice II da CITES é que ela seja enquadrada sob o Art. II. 1. A, no qual foi estabelecida a inclusão do mogno. Esse artigo chama a atenção para o risco dessas espécies em um futuro próximo se tornarem ameaçadas, para que isto não ocorra, a comercialização de espécimes deve estar sujeita a um regulamento rígido para evitar a utilização incompatível com a sobrevivência delas (SNOOK, 1994; 1996).

O valor econômico nos mercados internacionais é a força que estimula a extração do mogno. O alto valor das árvores individuais constitui um grande incentivo para o corte e o comércio ilegal, ameaçando, com isso os indivíduos situados em parques nacionais e áreas protegidas.

O manejo sustentável, onde se planeja o corte das árvores, levando em consideração todos os fatores ambientais, alternando a exploração e acumulando o volume para uma segunda exploração, seria o ideal. Porém, fatores econômicos desencorajam o manejo sustentável do mogno em florestas nativas considerando que seria mais vantajoso cortar os indivíduos da floresta em uma única vez e reinvestir os benefícios em outro ramo de atividade. (CAMPBELL, 1992).

1.3- Produção e comercialização de madeira de *Swietenia macrophylla* King na Amazônia tropical

O mogno é uma das mais valiosas espécies madeireiras da América tropical. O metro cúbico tipo exportação atinge o preço de US\$ 1,100.00 (VERÍSSIMO & GROGAN, 1998). No mercado nacional, o preço do metro cúbico serrado custa em torno de US\$ 720.00 (SMERALDI & VERÍSSIMO, 1999).

No período de 1991 a 1997, o volume de mogno exportado pelo estado do Pará, considerando o volume total de madeira de todas as espécies diminuiu conforme mostrado no gráfico (Figura 3). As variações ocorrem devido ao sistema

de cotas implementado pelo governo federal, através do IBAMA (AIMEX, 2000), sendo uma medida de contingenciamento de volume de exportação.

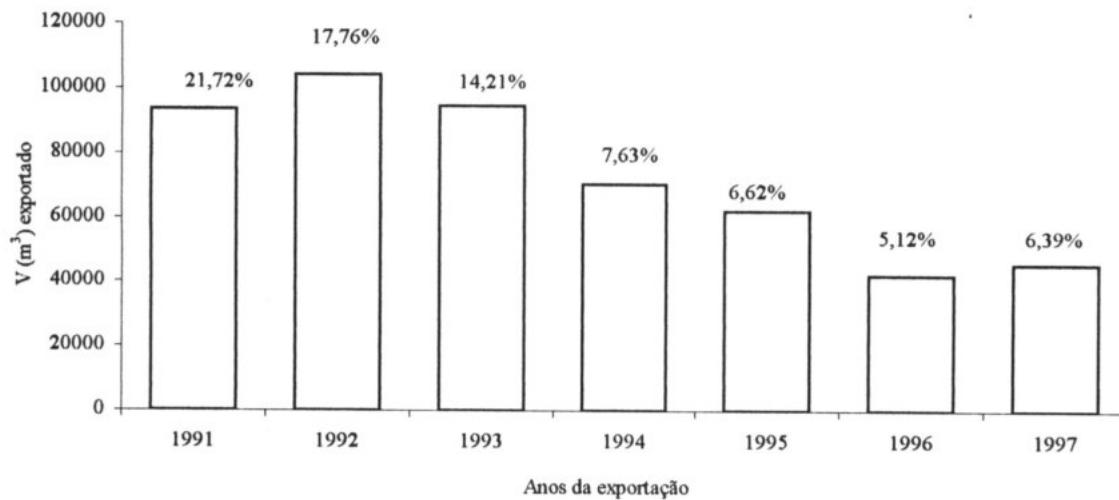


Figura 3 – Gráfico do volume de *Swietenia macrophylla* King exportado pelo Estado do Pará no período de 1991 a 1997.

A Bolívia e o Brasil são os principais países produtores de madeira de mogno, tendo como maiores compradores os Estados Unidos e a Inglaterra (Emenda do Apêndice II, CITES, 1997). Na Bolívia, do total de madeira de mogno exportada em 1996, 20.354 m³, foram para os Estados Unidos; 389 m³ para Republica Dominicana; 250 m³ para a Argentina; 247 m³ para a Espanha; 102 m³ para a Inglaterra; Itália com 32 m³ e para o Chile 28 m³.

De acordo com AIMEX (2000), as exportações de madeira de mogno realizadas pelo estado do Pará para diferentes países, no período de 1993 a 1997, somaram os seguintes volumes apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Principais países importadores madeira serrada de *Swietenia macrophylla* King no período de 1993 a 1997

Países consumidores	Volume m ³
Estados Unidos	120.620 m ³
Inglaterra	78.310 m ³
Espanha	18.059 m ³
Caribe	16.898 m ³
Norte da Europa	14.348 m ³
Ilhas Canárias	6.720 m ³
Irlanda	3.427 m ³
África do Sul	2.988 m ³
Portos do Golfo	125 m ³

Fonte: GASPARETO (1998)

Como é possível observar há um grande desafio e uma necessidade urgente em buscar um método de controle eficiente da broca, para o estabelecimento de plantações de mogno. Essa praga é considerada como o fator limitante para o reflorestamento com o mogno em todo o continente americano. Na Amazônia peruana, o reflorestamento com mogno se tornou impraticável devido aos severos danos causados por essa praga (YAMAZAKI & VASQUES, 1991) que aparece no continente americano. Existem vários trabalhos (BERTI FILHO, 1973; AGOSTINHO et al, 1994; DE PAULA et al, 1997) que abordam o mesmo problema, enfatizando o ataque da broca como um fator limitante ao reflorestamento com Meliaceae, em especial com os gêneros *Carapa*, *Cedrella* e *Swietenia*.

1.4- Distribuição geográfica de *Swietenia macrophylla* King

O mogno (*Swietenia macrophylla* King), apresenta uma extensa distribuição geográfica nos Neotrópicos, indo desde a península de Yucatan, no México, (Latitude 23° N), passando pela costa atlântica da América Central, até

um amplo arco ao sul das Amazônias venezuelana, equatoriana, colombiana, peruana e brasileira, com Latitude máxima de 18° S (LAMB, 1966; PENNINGTON et al, 1981; VERÍSSIMO & GROGAN, 1998) (Figura 4).

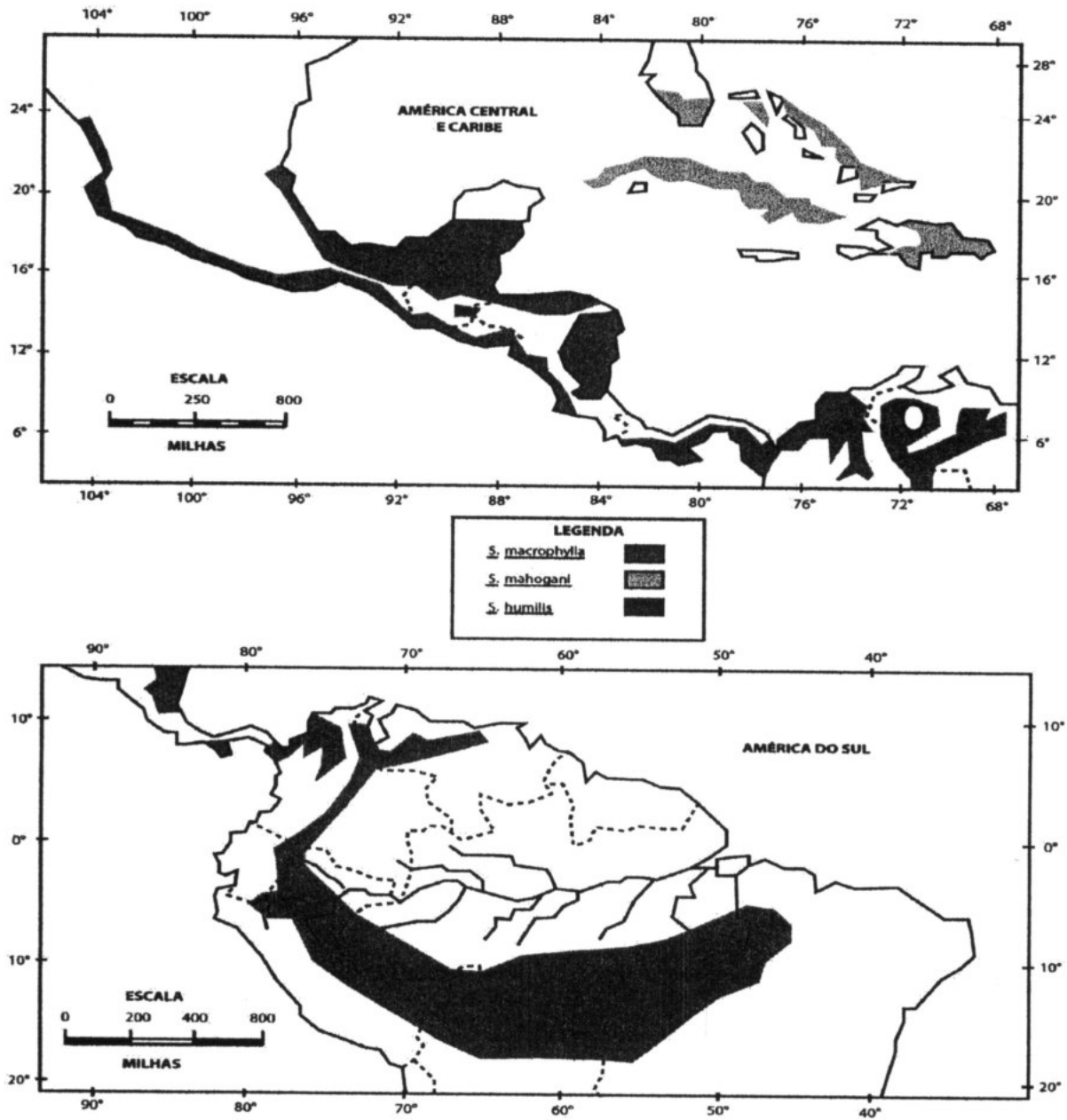
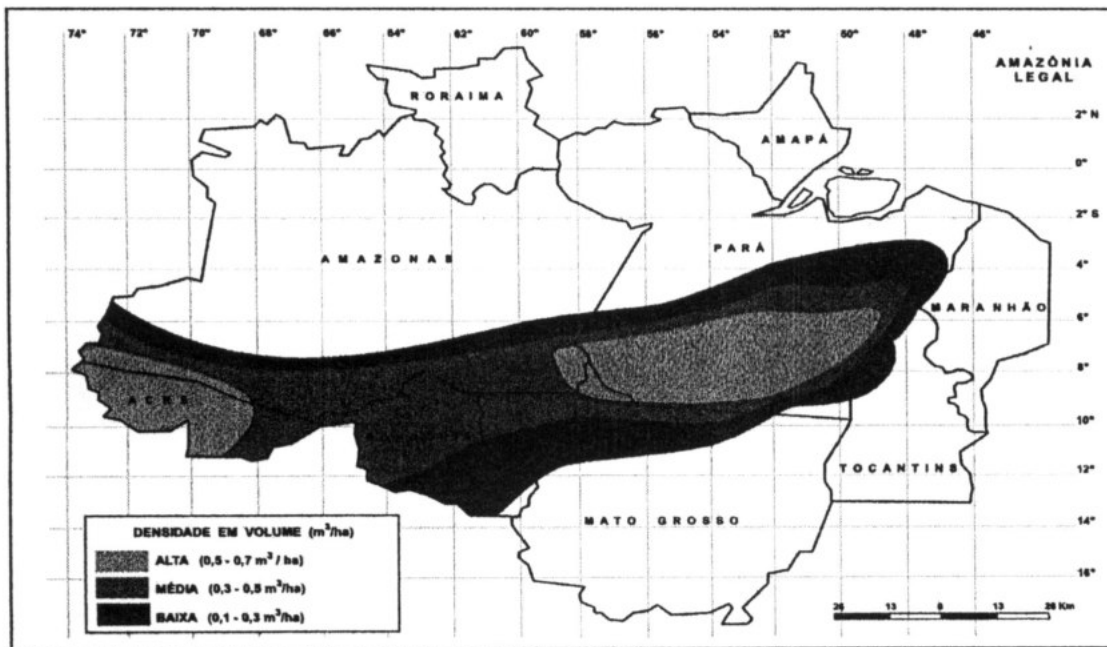


Figura 4 - Distribuição geográfica de *Swietenia macrophylla* King na faixa de ocorrência proposta por (LAMB 1966), desde o México até os países das Américas Central e do Sul.

No Brasil, a espécie ocorre nas florestas do sul da Amazônia LEGAL (LAMB, 1966; BARROS et al, 1992), com uma população superior ao conjunto das populações de todos os outros países onde ocorre, correspondendo a 74% dessa população total (FIGUEROA COLON, 1994).

A área de ocorrência natural de mogno na Amazônia brasileira (Figura 5). abrange principalmente a área da floresta umbrófila aberta e, em menor escala, partes das florestas de transição (áreas de tensão ecológica) entre a floresta aberta e os cerrados (savanas).

O gênero *Swietenia* compreende três espécies: *S. macrophylla*, *S. mahogany* e *S. humilis*, sendo que *Swietenia macrophylla* King tem predominância absoluta nas áreas de ocorrência. Na Amazônia brasileira, a espécie *Swietenia macrophylla* King ocorre naturalmente nos estados do Maranhão (0,85% da área do estado), Tocantins (0,27%), Pará (46,7%), Mato Grosso (23,60%), Rondônia (97,20%), Acre (100,00%) e parte sul do estado do Amazonas (21,40%) (BARROS et al, 1992).



Fonte : BARROS et al, 1992

Figura 5 – Ocorrência de *Swietenia macrophylla* King na Amazônia brasileira

1.5 *Hypsipyla grandella*

Hypsipyla grandella é também chamada de broca pois a larva penetra no interior do broto para se alimentar causando um efeito de tunelamento. (NEWTON et al, 1993). As Figuras 6-8 mostram o inseto em suas diferentes fases.

O ciclo do ataque é iniciado com a postura de ovos na planta hospedeira, geralmente nos pecíolos ou nas nervuras secundárias das folhas da planta, os ovos têm a coloração esbranquiçada e quando férteis se tornam avermelhados. Esse período dura cerca de 24 horas. A partir deste momento, os ovos demoram cerca de três dias para eclodirem. (BECKER, V.O. 1973, BERTI-FILHO, 1973). Após a eclosão, as lagartas se alimentam dos brotos e após cerca de dois dias penetram no interior dos mesmos e começam a se alimentar, causando o efeito chamando de tunelamento.

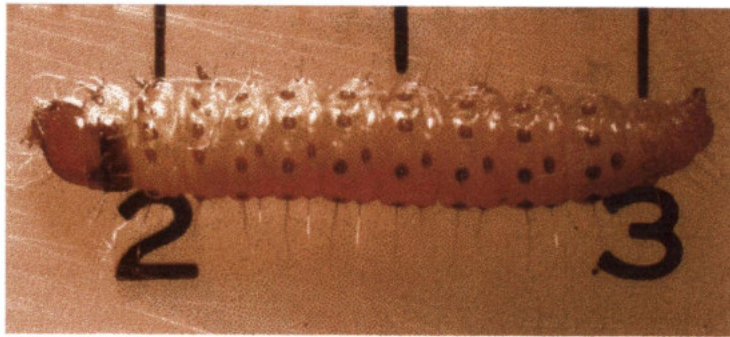


Figura 6- Larva de *H grandella*



Figura 7- Larva de *H. grandella* se alimentando no interior do broto (Foto realizada no campo em Mãe do Rio-PA)



Figura 8- *H. grandella* na fase de mariposa e ovos férteis

Quando o ataque é muito intenso, podem ocorrer várias lagartas por broto. Nestes casos é comum acontecer o canibalismo, onde as lagartas em estágio mais avançado de desenvolvimento se alimentam de pupas encontradas nos brotos. As lagartas vivem cerca de 27 a 35 dias, variando conforme a temperatura, umidade, alimentação (BECKER, V.O. 1973, BERTI-FILHO, 1973).

As lagartas em último estágio de desenvolvimento se alimentam muito pouco, diminuem seus movimentos e começam a tecer seus casulos, dentro dos quais elas irão permanecer durante a fase de pupa. (BECKER, V.O. 1973, BERTI-FILHO, 1973).

As lagartas recém eclodidas têm uma coloração marrom clara que vai se escurecendo chegando a verde azulada nos últimos estágios de lagarta. Essa coloração é dependente da alimentação, uma vez que em ensaios de laboratório, com testes de dieta artificiais, a lagarta não passa por esta coloração.

As mariposas emergidas têm uma coloração parda acinzentada, a cabeça é branca acinzentada e o tórax é pardo acinzentado. As fêmeas são maiores que os machos.

As mariposas têm hábitos noturnos, comportamento típico destes insetos. O acasalamento ocorre entre 20 horas e meia-noite e a oviposição entre as 21 horas e meia-noite. A fase de crisálida dura entre 4 e 20 dias.

Existem três espécies de lepdópteros associados a *Swietenia*, *Carapa*, e *Cedrela*. Dois desses, *Hypsipyla grandella* (Zeller) e *H. ferralis* (Hampson) são os mais freqüentes (AGOSTINHO, 1996).

1.6- Métodos de controle

Alguns métodos de controle da praga já foram ou estão sendo implantados no controle de *H. grandella*, mas nenhum método definitivo ainda existe. Alguns destes são citados a seguir:

Controle químico

O controle de *H. grandella* com inseticidas tradicionais é um tratamento muito questionável, além de dispendioso. Devido ao fato do ciclo de vida do inseto ser pequeno, cerca de 25 dias e o das Meliaceae longo, são necessárias constantes pulverizações. Ainda existe um outro fator, que é o curto período no qual a lagarta permanece nas folhas jovens, ou seja o tempo que a lagarta se alimenta da folha até crescer o suficiente para penetrar no broto onde se desenvolve (BECKER, V.O. 1973, BERTI-FILHO, 1973).

Neste caso seria necessário avaliar o período de maior infestação e neste período aplicar cerca de 2 vezes por semana o produto, o que seria difícil numa plantação extensa. Além disso, existe o problema dos resíduos deixados pelos inseticidas, que causam danos irreparáveis ao homem e ao meio ambiente.

Uma outra forma de controle químico associado ao físico é o uso de inseticidas impregnados a uma cola e aplicado sobre os brotos jovens das árvores. Esta metodologia tem a vantagem de não precisar aplicar com a mesma freqüência que o inseticida e também a garantiria da permanência do produto nos brotos, não sendo lixiviado pelas chuvas constantes na região Norte do País, por exemplo, onde há maior produção de mogno. Este tipo de controle vem sendo estudado pelo prof. Dr. Orlando Shigueo Ohashi, da Faculdade de Ciências Agrárias do Pará.

Controle Físico

O controle físico mais conhecido, é o uso de armadilhas luminosas, onde BERTI-FILHO (1973) observou que as mariposas eram atraídas pela luz ultravioleta ou negra. Este controle, porém não foi muito bem sucedido.

Controle Silvicultural

Este tipo de controle vem sendo usado no Brasil pelas empresas e pelo governo que é o manejo adequado do mogno. Pode-se destacar por exemplo o uso de culturas consorciadas com pasto, com outras madeiras-de-lei, com café, uma vez que os fazendeiros utilizam a terra para outros fins, ao mesmo tempo em

que ocorre o plantio e desenvolvimento das árvores de mogno sem prejuízo para a cultura consorciada. Este controle permite também obter lucros com o uso da terra antes dos oriundos da venda de mogno, uma vez que a árvore de mogno necessita de cerca de 30 anos para ter um crescimento adequado. Este método é usado por pequenos fazendeiros em Rondônia-RO (BROWDER, 1996). O método é interessante não só pelo fato de que a terra vai sendo utilizada, mas também porque se pode fazer um espaçamento maior entre as árvores, o que também é uma forma de minimizar os ataques.

Outra forma fazer este tipo de controle é a coleta dos insetos, a partir da observação de quais brotos foram atacados, através dos resíduos deixados pela lagarta ao perfura-lo, podá-lo e recolher todos estes brotos e queimá-los. Esses procedimentos são lentos e baratos, porém é complicado quando se a área é extensa.

Controle comportamental

Essa metodologia talvez seja a mais desejável, uma vez que não causa nenhum dano à natureza e depois de bem estabelecido, geralmente é de fácil aplicação e economicamente viável. O controle por método comportamental está baseado no fato que os insetos são atraídos até as plantas por substâncias voláteis que elas emitem, ou no fato que o macho é atraído pela fêmea por feromônios. Como pode ser observado, são duas as formas de atrair o inseto através de voláteis. Quando se usa feromônios da fêmea para atrair os machos, dispersando-os do feromônio da fêmea, levando o macho à não encontrar com a fêmea e como consequência, a reprodução é interrompida ou muito reduzida.

Os ensaios eletroantenográficos usados para selecionar os possíveis feromônios, extraídos das glândulas de fêmeas e tendo como detector a antena do macho foi realizado para *H. grandella* por BOREK, 1991, porém sua aplicação não foi bem sucedida.

Observa-se que em muitos casos de feromônios dos insetos ou óleos voláteis emitidos pelas plantas, geralmente há mais de uma substância que são

ativas, ou seja, um conjunto de substâncias numa proporção definida exerce tal função.

Ensaio em laboratório

Poucos trabalhos são desenvolvidos em laboratório com *H. grandella* pelo fato que ainda não existe uma dieta artificial eficiente que permita obter estes insetos em laboratório e realizar mais testes com os mesmos. Entre estes poucos trabalhos, o do Instituto de pesquisas da Costa Rica, Catie (MANCEBO, 2000) onde foram realizados testes com extratos de *Quassia amara* (Simaroubaceae), propõe que provavelmente os quassinóides, que estão presentes nestes extratos, sejam os responsáveis pela atividade inseticida apresentada.

Ensaio de preferência alimentar, por escolha, usando-se brotos de *Toona ciliata* var. *australis*, *Cedrela odorata*, *Swietenia macrophylla* King, *Khaya ivorensis* e larvas de *H. grandella* foram desenvolvidos. Observou-se que *Swietenia* e *Cedrela* apresentaram porcentagem de escolha elevada. Isto é um indício de que essas espécies nativas devem apresentar substâncias atraentes ao inseto, provavelmente voláteis, de maior eficiência do que as presentes nas duas espécies exóticas (GRIPMA et al. 1975). Este resultado era previsível, uma vez que estes insetos se alimentam dos brotos destas espécies. O estudo destes voláteis é de suma importância para a compreensão da interação *Hypsipyla-Meliaceae*.

O cedro australiano, *Toona ciliata* var. *australis*, Meliaceae, é uma espécie susceptível a *Hypsipyla robusta* (COSTA, 2000) e apresenta-se livre de ataques de *H. grandella* (GRIJPMAN & ROBERTS, 1973; 1975; AGOSTINHO ET AL, 1994; VILA, 1996; DE PAULA et al, 1997). Essa espécie foi testada em plantações mistas com *Swietenia macrophylla* King. (COSTA, 2000), ao ser introduzida no Brasil, mostrou excelente crescimento e ausência de ataque (VILA, 1996).

Diversos métodos de controle da broca já foram tentados, porém nenhum se mostrou completamente eficiente.

Como se pode perceber, além da importância de se estudar a família Meliaceae devido à sua característica de produção de metabólitos apresentando atividades biológicas de grande importância, há também o fato que esta família produz madeiras de lei de grande valor comercial. Cita-se, ainda que aquelas fornecedoras de madeira de lei estão correndo risco de extinção se o reflorestamento não for bem sucedido, e para isto é necessário obter uma solução urgente para esta broca dos ponteiros.

1.7 A Evolução dos estudos dos Inseticidas

Desde o início das civilizações, os insetos têm se constituído um dos mais sérios problemas para o homem, o controle químico para combater os agentes biológicos prejudiciais à saúde pública e a agricultura foi um dos primeiros a ser utilizados e continua até hoje.

Embora sejam conhecidas cerca de 2000 espécies de plantas com propriedades inseticidas, comercialmente somente algumas, como aquelas contendo piretrinas, rotenona ou nicotinas foram usadas como fonte de inseticidas.

Até a II guerra mundial, o piretro, a nicotina e a rotenona eram os principais produtos de origem vegetal utilizados no controle de insetos (HIRATA,1995). Em 1939 houve a descoberta do inseticida DDT e em 1942 a descoberta do herbicida 2,4-D, que causaram uma revolução na agricultura, exemplificando para o homem a possibilidade de se sintetizar compostos para o controle de pragas. Houve, portanto, a partir daí um grande desenvolvimento no campo das pesticidas sintéticas, substituindo os inseticidas naturais e nascia uma nova ciência a da "proteção às plantas" (HIRATA,1995).

Em 1962 surge a publicação "silent spring" de Rachel Carson onde se criticava os pesticidas sintéticos e recomendava o uso do piretro. Este foi o marco na história moderna do piretro e a imediata retomada do interesse por este inseticida (HIRATA,1995).

O piretro de uso comercial, obtido das flores de *Chrysanthemum cinerariifolium* é conhecido desde o primeiro século da era cristã. O uso das flores

para extração do inseticida originou-se na Pérsia (Irã), onde o pó do piretro era conhecido como Pó da Pérsia. Ele foi introduzido na Europa no início do século XIX.

A preocupação com o meio ambiente e também com a toxicidade dos inseticidas é de fundamental importância quando se planeja trabalhar com tais compostos. As tentativas de se trabalhar com métodos comportamentais se devem principalmente a este fator.

1.8- *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith, 1797 - Noctuidae e *Anticarsia Gemmatallis* Hueb., 1818 - Noctuidae

Um dos interesses em produtos naturais está voltado para o uso de substâncias naturais como fonte ou modelos de novos agentes controladores de insetos que causam doenças ou atacam plantações, devendo ser estes inseticidas mais seletivos, menos persistentes no ambiente, biodegradáveis e não deixarem resíduos tóxicos.

O potencial de atividade inseticida das plantas usadas popularmente com esse propósito ou selecionadas por quimiosistemática, pode ser analisado por vários tipos de ensaios. Existem espécies de insetos que são tomados como insetos modelos, pois se tratam de insetos de fácil manipulação e que se adaptam facilmente às condições de laboratório. Dois exemplos são os lepdópteros da família Noctuidae: *Spodoptera frugiperda* (Lagarta-do-cartucho-do-milho) e *Anticarsia Gemmatallis* (lagarta da soja). São insetos que causam grandes problemas na América do Sul.

O milho (*Zea mays* L.) é largamente utilizado na alimentação humana e animal, devido ao seu alto valor nutricional. No Brasil a cultura do milho ocupa cerca de 13 milhões de hectares, com uma produção anual superior a 30 milhões de toneladas. Apesar da extensa área cultivada, a produtividade do milho é muito baixa, tendo como um dos fatores responsáveis a ocorrência de pragas, as quais podem acarretar perdas estimadas em cerca de 680 milhões de dólares. Entre as diversas pragas que atacam a cultura do milho, a lagarta-do-cartucho-do-milho,

Spodoptera frugiperda destaca-se como a mais importante, provocando reduções de até 34% na produção. No Brasil, esta praga apresenta uma ampla distribuição, devido a extensa área de plantio de milho e, principalmente, ao seu hábito polífago, hospedando-se, muitas vezes, em outras culturas na ausência da gramínea. *S. frugiperda* tem como nomes comuns: Lagarta-do-cartucho-do milho, lagarta dos milharais e lagarta militar. Ela destrói o cartucho do milho. (GALLO, 1970).

A soja, assim como o milho, é uma cultura muito utilizada pela população mundial e o Brasil possui larga produtividade deste grão. *Anticarsia gemmatalis* (Noctuidae), cujo nome comum é Lagarta da soja, se constitui em uma das principais pragas desta cultura e pode atacar ainda alfafa, amendoim, ervilha, feijoeiro, mucuna (ZUCCHI, 1993, GALLO, 1970).

Os ensaios com estes insetos além de fornecerem dados para se obter possíveis inseticidas para estas pragas, podem fornecer subsídios para iniciar os ensaios com outros insetos cujo trabalho seja dificultado por outros fatores, como no caso dos ensaios com *H. grandella* que ainda não existe dieta artificial para mantê-la em laboratório.

2 - OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Estudar a interação entre *Hypsipylla grandella* e *Swietenia macrophylla*.

2.2 Objetivos específicos

- Realizar o estudo fitoquímico de *Swietenia macrophylla* visando o isolamento de substâncias para ensaios biológicos e contribuir para a quimiosistemática de Meliaceae.
- Realizar ensaios biológicos com *Spodoptera frugiperda* e *Anticarsia gemmatalis*, como insetos modelos, visando testar a atividade de extratos de *S. macrophylla* sobre a biologia destes insetos.
- Realizar ensaios biológicos visando obter informações que levem à compreensão da relação inseto-planta, *H. grandella* x *S. macrophylla*.
- Estudar através de CL/EM e RMN ¹H os principais componentes químicos de brotos, folhas maduras e senescentes de mogno, uma vez que *H. grandella* alimenta-se apenas dos brotos, observando assim quais seriam os possíveis componentes responsáveis por esta escolha.
- Estudar os óleos essenciais de *S. macrophylla* plantadas numa mesma região, porém com mudas de diferentes origens, uma vez que foi observado que nestes plantios, em quadras distintas, o ataque do lepdóptero foi diferenciado.
- Estudar os óleos essenciais de brotos, folhas maduras e senescentes de *S. macrophylla*, através de CL/EM, visando determinar possíveis responsáveis pela interação inseto planta.

- Testar os óleos essenciais de brotos folhas maduras e velhas de *S. macrophylla*, através das técnicas de EAG e EAD, observando o comportamento das antenas de *H. grandella* frente a esses óleos e possíveis responsáveis pela escolha dos brotos para ataque.
- Testar em *H. grandella*, substâncias isoladas do cavalo de enxerto *Cedrela odorata* sobre *Toona ciliata* (Meliaceae).

3 – MATERIAL

3.1 Material de laboratório

Usou-se Sílica Gel de fase normal (230-400 mesh ASTM) e sistema de baixa pressão com ar comprimido (CC do tipo "flash") em todos os fracionamentos por cromatografia em coluna (CC) descritos a seguir, com exceção para o caso de mistura com florisil. Normalmente, usou-se um sistema de eluição gradiente de polaridade, mediante a utilização de diferentes proporções de diclorometano, acetato de etila e metanol. Os solventes utilizados foram previamente tratados e destilados no laboratório de Produtos Naturais.

As frações obtidas das colunas foram analisadas mediante cromatografia em camada delgada (CCD), usando sílica com F_{254} (revelador no UV) e os agentes reveladores I_2 e reativo de vanilina.

Em todas as separações por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) usou-se uma bomba LC-6AD, válvula reciclante e um detector SPD-6AV da Shimadzu. Usou-se a coluna com suporte sólido de resina polimérica Asahipak GS-310 P (2,15 x 50.0 cm), com detecção no UV a 254 nm, exceto nos casos onde esse comprimento de onda não se mostrou eficiente e será detalhado ao longo da parte experimental. Usou-se como solvente metanol, exceto para os casos detalhados ao longo da parte experimental.

Para a análise dos flavonóides por CL/EM foi utilizado o espectrômetro CL/EM da Micromass operando em *Electrospray* com fluxo de 0,7 mL /min.

Para a análise dos óleos voláteis, utilizou-se o Cromatógrafo à gás acoplado ao espectrômetro de massas de baixa resolução CG/EM Shimadzu QP 5000 – equipado com coluna DB5 L= 25M ϕ = 0,20 mm.

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear foram obtidos à temperatura ambiente em um espectrômetro BRUKER DRX400 equipado com um probe multinuclear e um probe para detecção inversa de 5mm, com frequência de 400,135 MHz para o 1H (9,8T) e uma sonda específica para experimentos com

gradiente de campo. Utilizou-se também um equipamento ARX200 equipado com um probe multinuclear e um probe para detecção inversa de 5 mm, com frequência de 200 MHz para o ^1H (4,9 T). Os espectros de hidrogênio foram obtidos usando geralmente uma janela espectral de aproximadamente 10 ppm, programa ZG, e em alguns casos específicos usou-se o programa de pré-saturação ZGPR. O número de experimentos variou entre 8 a 16, dependendo da quantidade de material. Os espectros de RMN ^{13}C foram obtidos usando geralmente o programa ZGPG30 e D1 (tempo de espera entre os pulsos) de 0.1 s.

Para as análises eletroantegráficas foi usado um eletroantegráfico Syntech Original Research Equipment Micro Manipulator Type MP-12 equipado com lupa Leca LZ6.

3.2 Material Biológico

Os insetos usados como modelos na fase inicial do trabalho foram *Anticarsia gemmatalis* e *Spodotera frugiperda*, obtidos no laboratório de Entomologia da ESALQ de Piracicaba USP e mantidos no laboratório de ensaios do DQ-UFSCar.

As folhas usadas no preparo de extratos foram coletadas em plantios com idade de aproximadamente 8 anos na fazenda experimental da EIDAI do Brasil S.A localizada no município de Igarapé-Açú, localizado no nordeste do Pará-Brasil, distante a 136 KM de Belém.

As folhas jovens, b rotos de mogno, usados para alimentar as lagartas durante os testes foram coletadas na CEPLAC-Sementes no município de Marituba-PA.

As lagartas usadas nos experimentos foram coletadas na fazenda Tramontina S.A. no município de Mãe do Rio-PA.

Os ensaios biológicos foram realizados no laboratório de entomologia do departamento de biologia vegetal e fotossanidade Faculdade de Ciências Agrárias do Pará (FCAP), Belém-Pará. A média de temperatura no laboratório foi de 28 °C

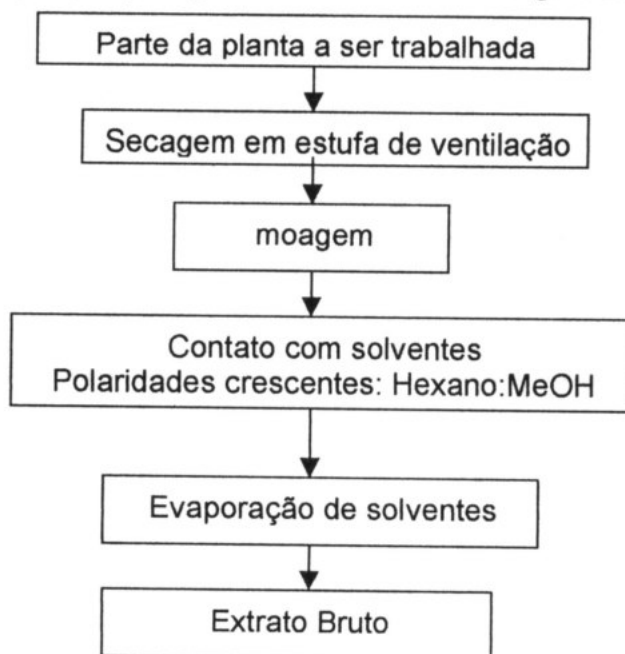
± 2 e umidade relativa (U.R.) $80 \% \pm 10$ que foram medidas com termohigrômetro digital.

As substâncias usadas para os ensaios foram isoladas a partir dos extratos de folhas maduras de *Swietenia macrophylla* (mogno) e também terpenóides isolados do cavalo de enxerto *Cedrela odorata* sobre *Toona ciliata* (Meliaceae), por José Realino de Paula (1996).

4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

As partes aéreas de *Swietenia macrophylla* foram coletadas no município de Igarapé-Açu a 136 Km de Belém do Pará, junto à Estação Experimental de Reflorestamento da Eidai do Brasil Madeiras S.A, em agosto de 1997, a idade da árvore era de 8 anos. As folhas maduras foram coletadas da parte mais baixa da copa, a 3 ou 4 m de altura. A planta foi identificada pelo Prof. Dr. Orlando Shigueo Ohashi.

Estas partes da planta foram secas em estufa com sistema de ventilação, trituradas e moídas, em seguida foram extraídas à temperatura ambiente usando solventes em gradiente de polaridade, iniciando com hexano, diclorometano e por fim metanol. O processo durou cerca de 15 dias. Realizou-se três extrações para cada parte da planta com cada solvente e concomitantemente procedeu-se a evaporação em rotaevaporador dos mesmos. Reuniu-se os extratos obtidos em cada extração, como mostra o Fluxograma 1 e obteve-se um extrato único (denominado neste trabalho como extrato bruto) para cada parte da planta. Este procedimento visou diminuir o número de extratos a serem trabalhados, assim como, evitar trabalhar com extratos quimicamente muito parecidos. Estes extratos finais foram trabalhados através de separação por partição como mostra o Fluxograma 2.



Fluxograma 1- Esquema geral para a obtenção dos extratos das partes aéreas da planta.

As massas iniciais de cada parte de *S. macrophylla* e de extratos obtidos a partir destas foram as seguintes:

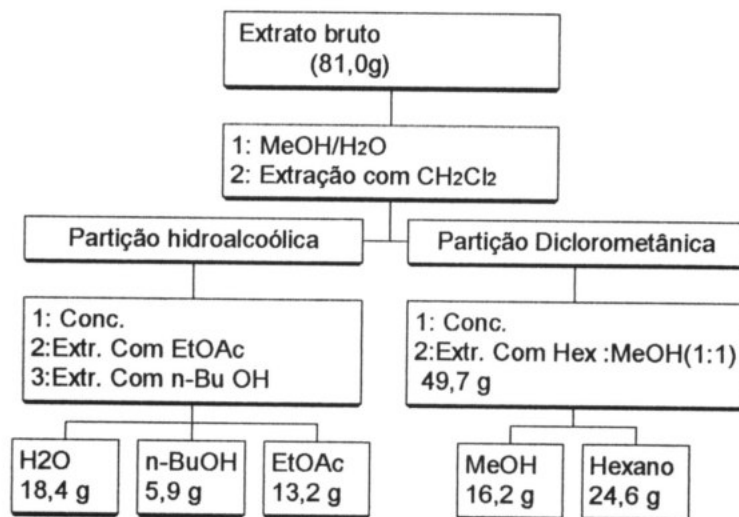
Folhas 0,810Kg kg (inicial) e 81 g (Extrato)

Galhos: 0,360Kg (inicial) e 14 g (Extrato)

Cascas: 1,685 Kg (inicial) e 32 g (Extrato)

4.1 Estudo das folhas de *Swietenia macrophylla*

Para se agrupar as substâncias em grupos com coeficientes de partição semelhantes, o extrato das folhas de *Swietenia macrophylla* foi submetido a uma partição líquido-líquido, fornecendo os subextratos: metanólico, acetoeílico, aquoso, hexânico e butanólico, os quais foram submetidos à sucessivas separações cromatográficas. Em alguns casos, usou-se também cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), no final do processo de purificação. O extrato aquoso não foi liofilizado, portanto sua massa contém água.

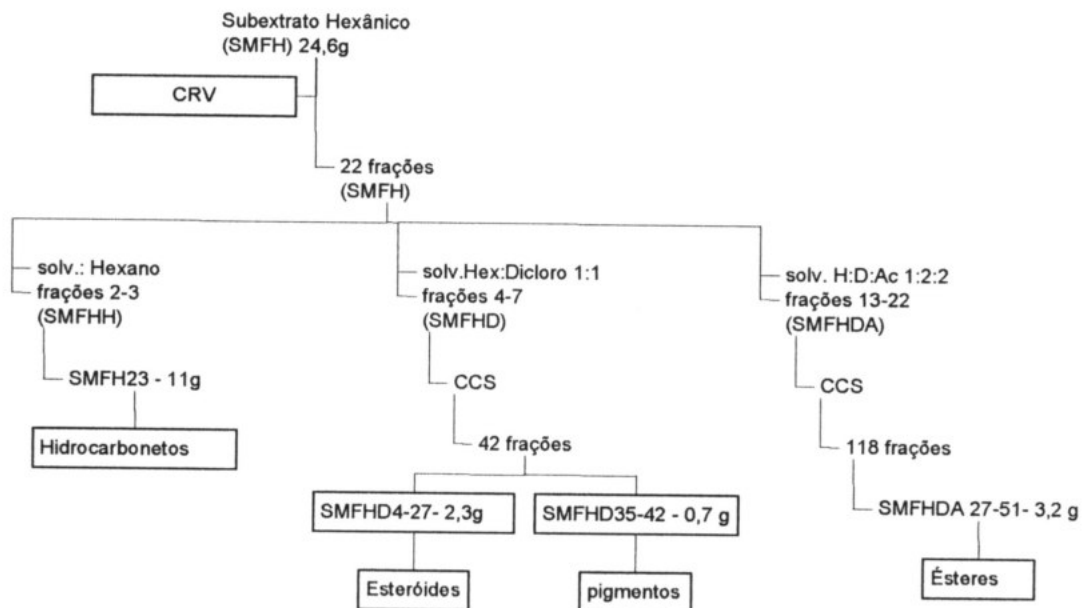


Fluxograma 2- Fracionamento por partição das folhas de *Swietenia macrophylla*

4.1.1 Estudo dos subextratos das Folhas de *Swietenia macrophylla*

4.1.1.1 Fracionamento do subextrato Hexânico - SMFH

Este extrato foi submetido à cromatografia rápida sob vácuo (CRV) através de funil de placa sinterizada, usando como suporte sílica gel comum e como fase móvel, um gradiente de polaridade crescente de solventes desde hexano até Acetato de etila. Foram obtidas 22 frações de 200 mL que foram reunidas em 4 de acordo com análise por CCDA. A seguir foram trabalhadas conforme mostra o Fluxograma 3.

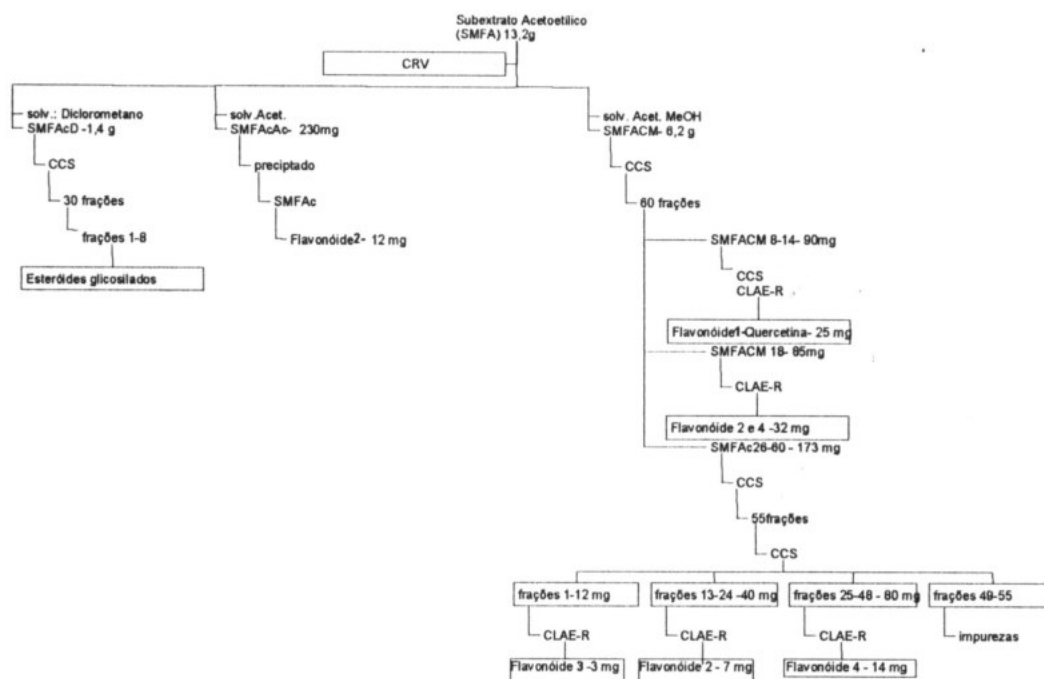


Fluxograma 3 – Metodologia usada para isolar os constituintes do subextrato hexânico (SMFH).

4.1.1.2 Subextrato Acetoetílico - SMFA

Este subextrato foi submetido a uma nova cromatografia rápida sob vácuo com funil de placa sinterizada, com sílica gel comum, e tendo como fase estacionária um gradiente de solventes, fornecendo assim, 3 subfrações:

diclorometânica, acetoetílica e acetoetílica-metanólica, que foram trabalhadas como mostra o Fluxograma 4.



Fluxograma 4 - Metodologia usada para isolar os constituintes do subextrato acetoetílico (SMFA). CCS = cromatografia em coluna de sílica gel.

4.1.1.2.1 Sub-fração acetoetílica (SMFACAc)

Foi adicionado acetato de etila a esta fração e formou-se uma suspensão (ou colóide) que foi centrifugada e a análise do comportamento em camada delgada de sílica mostrou tratar-se de uma substância pura, amarelo-ouro a olho nu e vermelho ao ser revelada em vanilina (SMFAC-1). A análise do espectro de RMN ¹H mostrou-se tratar de um flavonóide glicosilado, flavonóide 3.

4.1.1.2.2 Sub-fração acetoetilica-metanólica (SMFACM)

A observação do espectro de RMN ^1H desta fração, ainda impura, forneceu informações interessantes: apresentou vários sinais na região aromática, sinais típicos de glicosídeos na região entre 3,5 δ - 4,5 δ e vários sinais típicos de metilas na região alifática, esta fração foi submetida à cromatografia em coluna de celulose, como objetivo de reter algumas impurezas. Foram obtidas 60 frações, agrupadas por CCD.

As frações iniciais (SMFACM8-14) foram trabalhadas em coluna de sílica gel do tipo *flash* e isolado um composto de cor amarela muito parecida com os demais, porém de menor polaridade, que foi identificado posteriormente como um flavonóide não glicosilado, a quercetina (1).

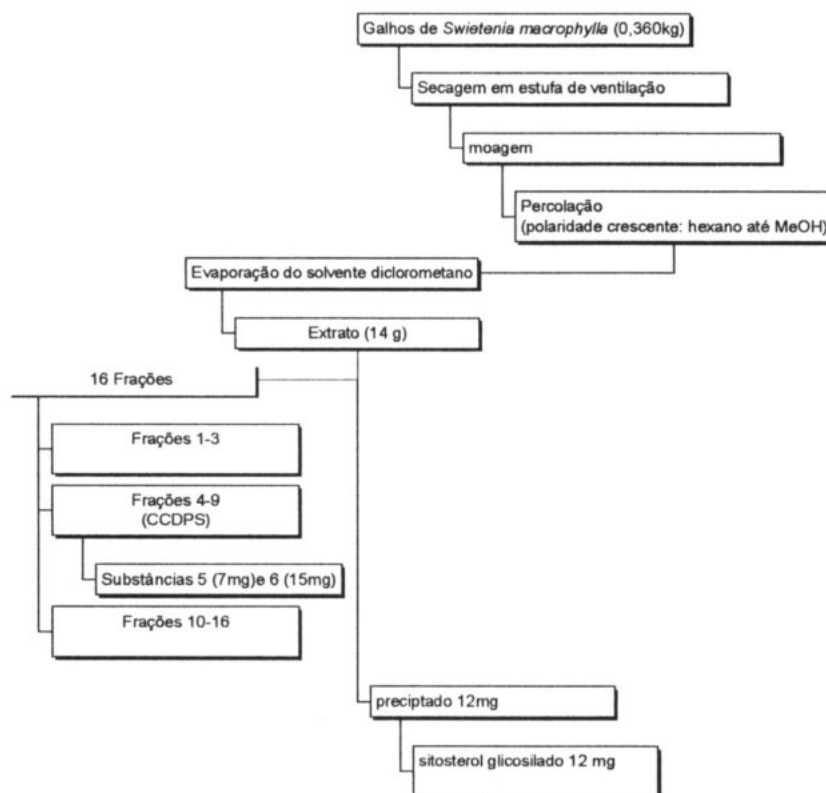
A fração de número 18 foi trabalhada através de CLAE-R, utilizando como fase móvel metanol, fluxo de 7 mL/min e os componentes foram identificados como flavonóides 2 e 4.

As frações 26-44 se mostraram muito parecidas, foram agrupadas, e a análise do espectro de RMN ^1H mostrou sinais característicos de flavonóides glicosilados. Estas frações, foram novamente submetidas à outra cromatografia em coluna, desta vez, utilizando sílica gel 230-400 "mesh" e como eluente, diclorometano : acetato de etila : metanol 4:4:1. Foram obtidas 55 frações que foram agrupadas, porém, ainda havia algumas poucas impurezas, sendo, por esse motivo que elas foram posteriormente submetidas a CLAE reciclante. Para isto, análises de absorção no ultravioleta foram realizadas com o objetivo de se escolher o λ mais adequado para detecção. Observou-se que todas as amostras apresentavam duas bandas de absorção predominantes em cerca de 280 e 360 nm. Após CLAE-R, usando como solvente metanol e fluxo de 7 mL/min, obteve-se as substâncias puras, em um total de sete frações, que foram avaliadas através de RMN ^1H , e identificadas como os flavonóides 2 - 4.

4.2 - Estudo dos galhos de *Swietenia macrophylla*

O extrato dos galhos de *Swietenia macrophylla*, foi submetido inicialmente a uma cromatografia rápida à vácuo, através de funil de placa sinterizada, usando como suporte sílica gel comum e como fase móvel, um

gradiente de polaridade crescente de solventes desde hexano até metanol 100%. A partir deste, obteve-se 16 frações de 20 mL que foram reunidas em 4 de acordo com análise por CCDA. Conforme mostra o Fluxograma 5.



onde: CCDPS- Cromatografia em camada Delgada Preparativa de Sílica

Fluxograma 5 – Metodologia usada para isolar os constituintes dos galhos de *S. macrophylla*.

As frações 4-9 foram reagrupadas por apresentarem manchas azuis fluorescentes quando submetidas à luz UV em λ 360 nm. A seguir, elas foram trabalhadas, usando cromatografia em camada delgada preparativa, no sistema de solvente diclorometano 65% acetato de etila 30% e metanol 5%, onde apresentaram resolução de duas manchas, uma verde e outra azul e resultando no isolamento de **5** e **6**.

4.3 Análise por CL/EM dos extratos de folhas de *S. macrophylla* em diferentes estágios de maturação

Os extratos hidroalcolócos de *S. macrophylla* foram obtidos através da trituração em água e metanol de 40 g de folhas maduras, brotos e folhas senescentes. Os três extratos foram posteriormente liofilizados e analisados.

Para que fossem analisados por CL/EM, as amostras passaram por procedimento prévio: foram retiradas alíquotas de 1 mg de cada extrato e essas amostras foram submetidas a uma pré-purificação através de um cartucho de sílica C-18, para que ficassem retidas as substâncias que porventura viessem danificar a coluna ou mesmo dificultar a análise. Posteriormente essas amostras foram injetadas no aparelho no CLAE, coluna de ODS e fluxo de 0,7 mL/min. As substâncias isoladas foram automaticamente transferidas para o espectrômetro de massas, operando por "eletrospray" e obtidos os espectros de massas.

4.4 Óleos Voláteis

4.4.1 Brotos, Folhas maduras e Folhas senescentes de *S. macrophylla*

As folhas de mogno maduras, assim como os brotos (folhas jovens) e as folhas senescentes, foram coletadas em plantios com idade de aproximadamente oito anos na fazenda experimental da EIDAI do Brasil S.A. localizada no município de Igarapé-Açú, localizada no nordeste do Pará-Brasil, distante a 136 KM de Belém.

As folhas das plantas recém coletadas foram rapidamente colocadas em sacos plásticos e enviadas, via transporte aéreo, para São Carlos, onde foram imediatamente guardadas em freezer até a extração dos voláteis por um tempo máximo de uma semana.

4.4.2 Coleta de brotos de *S. macrophylla* de diferentes procedências para obtenção dos óleos voláteis e observações de ataque.

A plantação destas árvores de mogno está localizada na fazenda Tramontina, no município de Mãe do Rio, a 300 Km de Belém. A plantação está distribuída em talhões que são áreas de 12,5 ha com povoamento misto contendo 70 árvores, ou seja, diversas espécies de madeiras são plantadas aleatoriamente juntamente com mogno, com predominância de Paricá, Freijó, Faveira e raros Jacarandás do Pará. Para os talhões não foi feito nenhum esquema de plantio, a não ser o espaçamento entre plantas de 4 m x 3 m e a presença de mognos de uma única procedência.

Os brotos (folhas jovens) foram coletados em plantios com idade de aproximadamente três anos.

Os brotos das plantas foram coletados de forma aleatória em várias árvores da mesma procedência (Figura 9) em quantidade aproximada de 500g, para se obter uma boa amostragem. Em seguida foram rapidamente colocados em sacos plásticos e enviados, via transporte aéreo, para São Carlos, onde imediatamente foram guardadas em freezer até a extração dos voláteis, por um tempo máximo de uma semana.

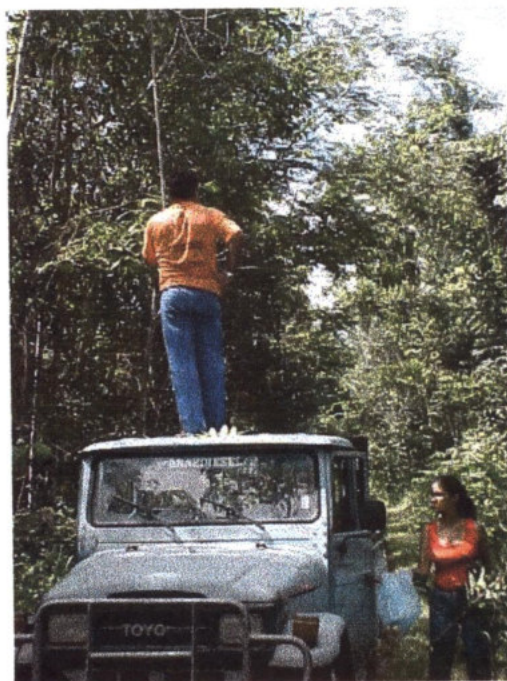


Figura 9 – Coleta de brotos de diferentes procedências na fazenda Tramontina.

As árvores tiveram suas procedências das seguintes localidades: reserva indígena de Urueu-wau-wau de Rondônia que está localizada em Latitude 11° 25' Longitude 62° 38'; Morada do Sol, localizada nas proximidades de Belém de acordo com as coordenadas: Latitude 5° 40' e Longitude 51° 37'; Juína MT; Vila Progresso, PA; Santarém, PA; Castelo dos Sonhos, PA.

Para cada procedência foram contadas, pelos funcionários da fazenda, todas as árvores atacadas e não atacadas para se ter o percentual exato de ataque em cada árvore de diferente procedência.

4.4.3. Extração dos óleos voláteis

A extrações das substâncias voláteis das folhas destas plantas estudadas foram realizadas por arraste a vapor d'água, utilizando-se o aparelho tipo Clevenger modificado. Para isto, montou-se o sistema de extração composto por uma manta de aquecimento de dois litros e um balão de duas bocas de dois litros. Adicionou-se água ao balão até o nível da manta e preencheu-se com água o tubo de retorno ao balão.

As folhas previamente moídas em liquidificador foram adicionadas ao balão e iniciou-se o aquecimento do sistema de extração do tipo Clevenger modificado (Figura 10). O sistema foi mantido em refluxo por quatro horas. Após o término da extração, deixou-se o sistema em repouso durante dez minutos e então mediu-se o volume do óleo volátil extraído.

Adicionou-se pequena quantidade de éter etílico no extrator para que o óleo volátil não ficasse retido em suas paredes. Esta solução foi transferida a um frasco previamente pesado. Evaporou-se o solvente utilizando um fluxo de gás nitrogênio e pesou-se o óleo volátil puro.

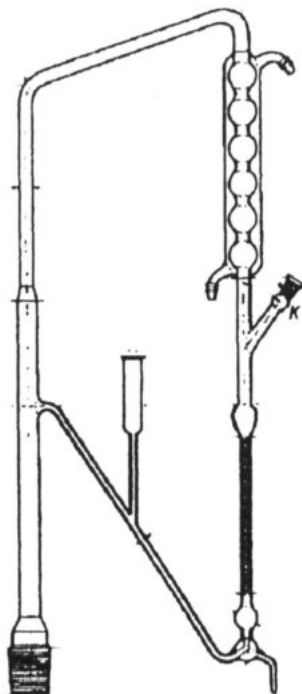


Figura 10- Sistema de extração do tipo Clevenger modificado

4.4.4 Análise dos óleos voláteis

A análise dos óleos voláteis foi feita por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de massas (CG/EM), no aparelho Shimadzu QP 5000. As condições de análise utilizadas foram:

Temperatura do injetor: 225 °C

Temperatura do detector: 250 °C

Coluna: DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm)

Programação de temperatura: 60 °C (2 min), 3 °C/min, 240 °C, 10 °C/min, 280 °C

Velocidade linear: 46,4 cm/s

Pressão da cabeça da coluna: 100,0 kPa

Fluxo de gás: 1,6 mL/min (a 60 °C)

Tempo entre as varreduras (scans/s): 0,50

Intervalo de massas: 40,5 a 500 uma

Os óleos voláteis puros foram injetados primeiramente e em seguida foram injetados com misturas de padrões de hidrocarbonetos. Esta mistura de padrões foi previamente preparada com os seguintes n-alcenos: C9/C10/C12/C14/C16/C18/C20 e C/22.

Os óleos voláteis de plantas são constituídos principalmente por produtos naturais secundários da classe dos terpenóides: mono-, sesqui- e di-terpenos, e também por vários álcoois, cetonas e aldeídos de terpenóides.

Atualmente com os avanços da instrumentação analítica e com o desenvolvimento de colunas capilares com reprodutibilidade nos tempos de retenção, a identificação dos componentes dos óleos voláteis pode ser realizada com grande precisão, incluindo os compostos minoritários, através do índice de retenção/espectroscopia de massas/pesquisa computacional (ADAMS, 1995), tendo sido esta técnica usada na identificação dos óleos voláteis de *Swietenia macrophylla*.

4.5 Testes de eletroantenograma – EAG (*Electro AntennoGraphy*)

Foram realizados testes com as antenas de *H. grandella* e os óleos voláteis dos brotos, folhas maduras e folhas senescentes (em estágio mais adiantado de amadurecimento) para se obter informações sobre qual destes exercia maior influência sobre a antena do inseto e que substâncias exerceriam efeito sobre este inseto.

Os insetos foram enviados pelo Prof. Ohashi e obtidos como já descrito anteriormente. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Produtos Naturais da UFSCar.

A primeira etapa foi a separação dos insetos por sexo, segundo HIDALGO-SALVATIERRA, 1971, que pode ser feita através da observação das principais diferenças entre ambos, através de uma lupa estereoscópica.

4.5.1 Eletroantenograma

Os insetos foram levados ao freezer por alguns segundos para que fosse feita a extração da antena, da qual se cortou-se as extremidades. Em seguida, a antena foi colocada em contato com um eletrodo por meio de um

gel com o objetivo de gerar uma diferença de potencial, conforme mostrado na Figura 11. Em seguida, este eletrodo foi conectado ao aparelho para análise.

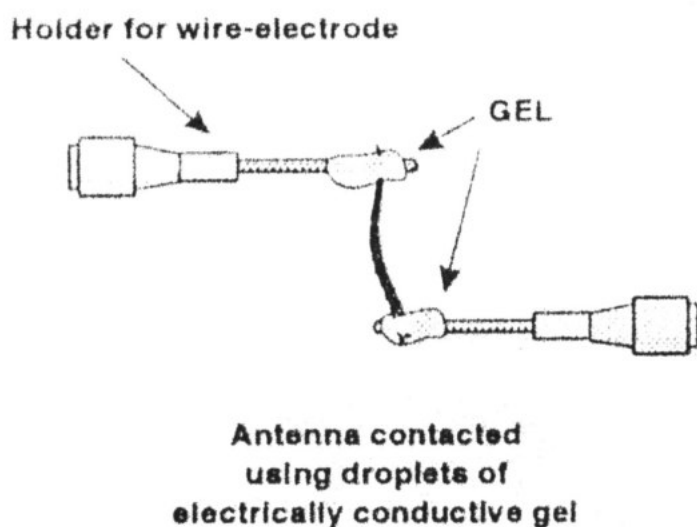


Figura 11 - Esquema de um eletrodo usado nos experimentos de EAG

Primeiramente diluiu-se o óleo essencial em várias concentrações, usando os seguintes códigos:

Ar = Ar sintético; éter = solvente;

FM (folhas maduras de mogno: **1-** 100,0 mg/mL; **2-** 10,0 mg/mL; **3-** 1,0 mg/mL)

FS (folhas senescentes de mogno: **1-** 100,0 mg/mL; **2-** 10,0 mg/mL; **3-** 1,0 mg/mL)

B (brotos de mogno: **1-** 100,0 mg/mL; **2-** 10,0 mg/mL; **3-** 1,0 mg/mL).

Usou-se como solvente para estas diluições éter etílico e estas amostras foram aspergidas sobre papel de filtro usando a quantidade de 5 μ L.

No primeiro experimento foi realizado usando apenas o ar, para se testar a resposta mecânica da antena. Em seguida testa-se o ar passando sobre o solvente. Depois, foram realizados testes usando as concentrações diferentes, distribuídas aleatoriamente, de acordo com SCHNEIDER, 1957. As respostas obtidas são da ordem de mV.

A etapa seguinte foi a realização dos experimentos de EAD (*Electroantenna Detection*), onde o óleo volátil é injetado e submetido a uma cromatografia gasosa. As substâncias isoladas vão passar pela antena do inseto e esta detectará aquelas que forem ativas. A Figura 12 mostra o esquema de funcionamento do aparelho.

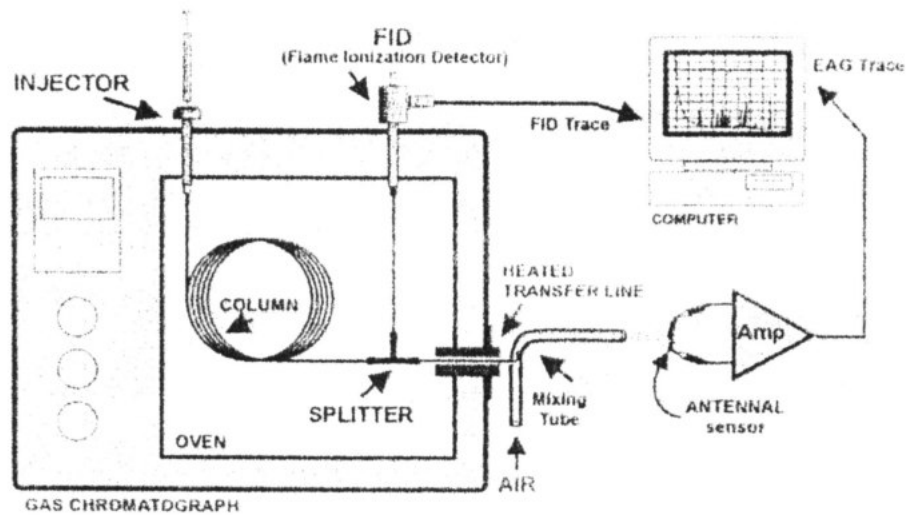


Figura 12- Esquema de funcionamento de um equipamento de EAD.

4.6 Bioensaios

4.6.1 Ensaios com *Spodoptera frugiperda* e *Anticarsia gemmatalis*

4.6.1.1 Obtenção do material utilizado nos testes biológicos

As espécies dos insetos estudados, *Spodoptera frugiperda* e *Anticarsia gemmatalis* foram obtidas do Laboratório de Entomologia da ESALQ-Piracicaba-USP. Mantidas nas condições de laboratório: 25 ± 2 °C e 75 ± 10 % U.R. e a alimentação descrita nas Tabelas 2 e 3.

Os bioensaios para avaliação das alterações no desenvolvimento de *S. frugiperda* e *A. gemmatalis* foram conduzidos no laboratório de bioensaios da Universidade Federal de São Carlos, sob as condições descritas acima.

Inicialmente usou-se o extrato bruto das folhas de *Swietenia macrophylla*, obtido como citado anteriormente (Fluxograma 1) e os insetos usados como modelos foram *Anticarsia gemmatalis* e *Spodoptera frugiperda*.

Sendo adicionado a massa de 200 mg para 50 tubos de dieta, conforme mostram as Tabelas 2 e 3.

4.7.1.2 Montagem do experimento e preparo das dietas

Pesou-se 200 mg do extrato bruto das folhas de *Swietenia macrophylla* e adicionou-se esta massa a dieta recém preparada conforme descrito nas Tabelas 2 e 3. Foi montado também um tubo usado como controle, onde se colocou os mesmos ingredientes da receita, exceto o extrato. Em seguida deixou-se resfriar para eliminar gotículas de água, formadas pelo vapor da dieta quente e adicionou-se a cada tubo, 2 insetos na fase larval, no segundo "instar."

Observou-se durante todo o tempo o desenvolvimento dos insetos e se comparou com o controle.

O ensaio foi iniciado dia 30 de julho de 1999, quando se montou um ensaio com 10 tubos (tubos cilíndricos de vidro, com aproximadamente 7 cm de altura e 3 cm de diâmetro). contendo 2 larvas em cada um. Dia 12 de agosto, já se observou um desenvolvimento menor dos insetos, em comparação com o controle. No dia 17, algumas larvas dos insetos do controle já começavam a empupar, ao passo que as larvas dos ensaios continuavam pequenas e um grande número delas, mortas.

Foram testados ambos os insetos, mas devido ao melhor resultado com *Anticarsia gemmatalis* e também uma maior facilidade em obter-se este inseto, o mesmo foi escolhido como inseto modelo.

A Segunda etapa dos bioensaios foi realizada com as frações obtidas através da partição do extrato bruto das folhas de *S. macrophylla* (Fluxograma 2).

Estas frações foram testadas seguindo o mesmo critério adotado para o extrato bruto, conforme descrito imediatamente acima, ou seja 10 tubos para cada dieta com 100 mg da fração, mais 10 tubos apenas com a dieta.

O fator extremamente importante neste estágio foi a observação diária deste experimento, para se acompanhar todas as mudanças no comportamento destes insetos, uma vez que existe na literatura um único trabalho relacionando *Swietenia macrophylla* com *Spodoptera frugiperda*, onde

MOOTOO, B.S. et al (1999) reportam o efeito de limonóides extraídos das sementes e revelado o efeito antialimentar dos mesmos sobre *Spodoptera frugiperda*. Portanto, esses ensaios preliminares serviram como base para se escolher o efeito a ser analisado. A partir das informações obtidas através dos bioensaios, foram avaliados quais os tipos de ensaios seriam desenvolvidos em acordo com estas respostas fornecidas.

Tabela 2- Dieta Artificial para *Spodoptera frugiperda*

Componentes	50 tubos
Feijão carioca	82,5 g
Germe de trigo	39,6 g
Levedura (cerveja)	25,3 g
Ácido ascórbico	2,6 g
Ácido sórbico	0,8 g
Nipagin	1,1 g
Formaldeído	6,3 mL
Agar	10,3 g
Água	597,5 g

Tabela 3- Dieta Artificial para *Anticarsia gematalis*

Componentes	50 tubos
Feijão preto	37,0 g
Germe de trigo	30,0 g
Proteína de soja	15,0 g
Caseína	15,0 g
Levedura (cerveja)	18,8 g
Solução vitamínica	4,3 mL
Ácido ascórbico	1,8 g
Ácido sórbico	0,9 g
Nipagin	1,5 g
Tetraciclina	56,5 mg
Formaldeído (40%)	1,8 mL
Agar	11,5 g
Água	600,0 mL

4.6.1.3 Preparo da dieta de *S. frugiperda*

Cozinhou-se o feijão em água, com esta água do feijão dissolveu-se o ágar. Bateu-se no liquidificador o feijão, o germe de trigo e a levedura. Misturou-se tudo no ágar sob aquecimento. Deixou-se a temperatura baixar para 55 °C e acrescentaram-se os ácidos ascórbico e sórbico, o nipagin e o formaldeído. Ainda quente colocou-se nos tubos. Tampou-se os tubos com algodão hidrófobo e deixou-se 24 h de repouso.

4.6.1.4 Preparo da dieta de *A. gematalis*

Cozinhou-se bem o feijão em água, bateu-se no liquidificador o feijão, o germe de trigo, a proteína de soja, a caseína e a levedura. Misturou-se tudo no ágar já dissolvido em água sob aquecimento. Deixou-se a temperatura baixar para 55 °C e acrescentaram-se os ácidos ascórbico e sórbico, o nipagin e o formaldeído. Verificou-se a consistência e ainda quente colocou-se nos tubos. Tampou-se os tubos com algodão hidrófobo e deixou-se 24 h de repouso.

4.6.2 - Procedimentos para realização dos ensaios biológicos com *Hypsipyla grandella* – Realizados em Belém -PA

4.6.2.1 - Coleta do inseto

Os ramos e brotações de *S. macrophylla* atacados pelas lagartas de *H. grandella*, foram coletados em plantios com idade aproximada de 8 anos, na fazenda experimental da EIDAI do Brasil S.A., localizada no município de Igarapé-Açú, e posteriormente, devido à pequena quantidade de material obtida, foram coletadas no município de Mãe do Rio a 300 Km de Belém do Pará, junto à Empresa Tramontina S.A.

Foram coletados os ramos e brotações mais jovens que apresentavam sinais de serragem aderidos ao orifício de entrada da lagarta, utilizando-se uma tesoura de poda, O corte foi realizado bem abaixo da parte atacada evitando-se assim, o ferimento da lagarta no interior da planta.

Cada ramo cortado passou por uma limpeza, eliminando-se assim as folhas, em seguida eram armazenados em sacos de polietileno.

4.6.2.2 - Triagem do material

No laboratório, os ramos atacados foram examinados individualmente para verificação do estágio em que se encontrava o inseto no interior do mesmo. Neste processo, realizou-se um corte com estilete no orifício de entrada da lagarta e em seguida, abriu-se manualmente o ramo em duas partes, de forma a não machucar a(s) lagarta(s). Foi coletada uma quantidade muito grande de lagartas para se ter uma margem segura de quantidade de material para se trabalhar, esse foi um fator determinante pelo qual se coletou insetos na fazenda Tramontina, que apesar de ser mais distante, possuía uma plantação muito maior de mogno, portanto, um número de insetos muito grande.

Após este processo, as lagartas foram selecionadas e escolhidas apenas as que estavam em último estágio de lagarta, ou seja, se transformariam em pupa em um ou dois dias. Isso era possível observar através do tamanho da lagarta e da sua cor, pois a lagarta em fase de pré-pupa muda da cor marrom para azulada. Essas lagartas foram colocadas no próprio galho de mogno para continuar o seu ciclo e empuparem, mesmo porque, nesta fase elas praticamente não comem mais. Assim que as lagartas entravam em fase de pupa, ou seja, quando começaram a tecer o casulo e se imobilizarem dentro do mesmo, marcou-se a data e após três dias, realizou-se a separação por sexo das crisálidas de acordo com HIDALGO-SALVATIERRA (1971). Com uma tesoura bem amolada, cortou-se uma das extremidades dos casulos de forma a não danificar as crisálidas, retirou-as cuidadosamente, examinou-se as características sexuais com auxílio de um microscópio estereoscópico, colocando-as em seguida numa placa de *Petri*, nas quais se marcava o número de crisálidas e o sexo.

Após a formação de casais, as mariposas eram transferidas para uma gaiola com dimensões 56 x 32 x 32 cm, forradas com um tecido de algodão, denominado murim. Como alimento, colocava-se um chumaço de algodão com mel em forma de solução aquosa (30%), pendurado no centro da gaiola, que diariamente era trocado para evitar fermentação.

As fêmeas começam a ovopositar durante a noite. No dia seguinte da ovoposição, as mariposas foram transportadas para outra gaiola com as

mesmas dimensões da anterior, forrada por um tecido de murim novo, dando continuidade às posturas.

Em seguida, cortou-se o tecido ao redor do ovo e com auxílio de uma pinça, foram colocados em placa de *Petri* e se aguardou a eclosão dos mesmos. Na Figura 13 pode-se observar este procedimento. Na placa de *Petri*, introduziu-se uma folha de *S. macrophylla* no seu interior, pois, assim que os ovos eclodem, as lagartas têm alimento imediato. Desta forma observou-se na folha algumas lagartas e também alguns ovos férteis (pontinhos vermelhos, Figura 7). Quando esses ovos não eram férteis, possuíam uma coloração esbranquiçada, o que acontecia com uma minoria. As lagartas recém eclodidas foram alimentadas com folhas jovens de plantas de mogno obtidas na CEPLAC.



Figura 13 - Foto mostrando o procedimento de eclosão de ovos.

4.6.2.3 Separação das pupas por sexo

A separação das pupas por sexo foi realizada através da visualização das genitálias usando um microscópio estereoscópico. Observa-se que nos machos a genitália pode ser observada como duas protuberâncias paralelas localizadas no sexto segmento distal, ao passo que nas fêmeas, a genitálias pode ser observada como uma fissura fina, transversal aos segmentos

abdominais e localizada no quinto segmento distal. A contagem dos segmentos foi realizada a partir da pseudo-asa da pupa, ou seja onde será a asa na futura mariposa.

A cremáster é formada por ganchos quitinosos curvos em sua extremidade.

Existem também diferenças morfológicas externas apresentadas pelas antenas e órgãos reprodutores que também podem ser observadas ao microscópio.

Nos machos as valvas apresentam uma forma arredondada com pelos e servem para segurar a fêmea no momento da cópula, na fêmea, o órgão reprodutor apresenta um formato cônico e também apresenta pelos.

As pupas foram mantidas em um local fechado porém permeável ao ar e sempre comum algodão umedecido diariamente, com o objetivo de se evitar a desidratação. Todos os cuidados foram tomados para manter o inseto o mais próximo possível de sua condição no campo.

4.7.2.4 – Testes biológicos realizados

4.7.2.4.1 - Teste de preferência alimentar

Utilizou-se uma solução de 2000 ppm de cada extrato (aquoso, acetoetílico, metanólico e hexânico) e o solvente puro e que foram aplicados às folhas jovens, em forma de círculos, segundo Mancebo (2000).

Após a aplicação de cerca de 5 µL de solução nas folhas, previamente recortadas em forma de pequenos círculos, estas foram colocadas em placas de *petri*, à qual foi adicionada uma lagarta no terceiro estágio de desenvolvimento larval. Foram realizadas seis repetições de cada.

4.7.2.4.2 - Testes usando tubos de penicilina e soluções dos extratos das folhas maduras de *S. macrophylla*

Para realização destes ensaios foi necessário utilizar brotações jovens de mogno para alimentação das lagartas. Sobre estes brotos seriam aspergidas as substâncias a serem testadas, porém as árvores existentes na

FCAP haviam sido podadas, impossibilitando assim a retirada de brotos para realização dos ensaios. Este fato tornou necessária a utilização de brotos da CEPLAC, Marituba, município do Pará. Este município é distante de Belém e, devido a este fator, os brotos foram coletados de manhã, colocou-se em saco plástico com água em isopor e trouxe-os para Belém onde foram mantidos em água com o objetivo de conservar a turgescência dos folíolos para serem utilizados até o dia seguinte. Portanto, as coletas foram realizadas em intervalos de um dia, pois assim os ramos ainda se mantiveram frescos e houve tempo para se montar os experimentos.

Em cada frasco do tipo penicilina (9 mL), que foi investigado como sendo o melhor recipiente para se reproduzir *H. grandella* (SARMENTO-JÚNIOR, 2001), colocou-se uma lagarta e um folíolo enrolado em forma de pequeno tubo ao qual havia sido adicionada a solução obtida com solvente acetona : metanol (1:1) do extrato testado.

Foram inicialmente testados os extratos obtidos das folhas adultas de *S. macrophylla*. A concentração de cada extrato foi de 2000 ppm e posteriormente 1000 ppm. Utilizou-se 6 tubos para cada tratamento, contendo 1 lagarta por tubo.

4.7. 2.4.3 - Testes com substâncias puras

No laboratório, em cada frasco do tipo penicilina (9 mL) colocou-se uma lagarta e um folíolo enrolado em forma de pequeno tubo, ao qual foi adicionada a substância a ser testada, conforme mostra a Figura 14.



Figura 14 – Ensaio biológico utilizando frascos do tipo tipo pinicilina

Foram realizadas 4 repetições e cada repetição contida de 5 elementos, ou seja, para cada concentração de substância a ser testada, utilizou-se um total de 20 lagartas. Utilizou-se o mesmo procedimento para o branco, ou seja aplicou-se apenas o solvente em folíolos e foram colocados enrolados nos frascos e adicionada a lagarta, da mesma forma que fora feito com os extratos.

As substâncias (flavonóides) testados foram obtidas das folhas maduras de *Swietenia macrophylla* King, conforme descrito anteriormente.

Os testes foram realizados usando-se concentrações variadas de substâncias. Estas substâncias foram aplicadas sobre as folhas jovens de *S. macrophylla*, com um algodão, conforme mostra a Figura 15, usando-se em média a quantidade de 20 μL da solução.



Figura 15 – Aplicação das soluções nas folhas de *S. macrophylla*.

Foram testadas também substâncias obtidas do cavalo de enxerto de *Cedrela odorata* L. (cedro, resistente) sobre *Toona ciliata* Roem (*Toona*, atacada). Foram isoladas por DE PAULA (1996).

Estas substâncias foram objetos de testes biológicos sobre *H. grandella*, pelo fato de ocorrerem apenas no cavalo de enxerto e não ocorrerem no cedro, o que leva a inferir que estas poderiam ser substâncias que podem conferir a resistência a *Toona*. Foram testadas usando o mesmo número de indivíduos, ou seja, quatro repetições de cinco indivíduos para cada concentração.

5- RESULTADOS E DISCUSSÕES.

5.1- Identificação estrutural dos flavonóides

Os flavonóides se apresentaram como sólidos amorfos de cor amarela. No espectro no infravermelho apresentaram principalmente uma banda característica do estiramento de carbonilas α,β -insaturadas em torno de 1650 cm^{-1} e também uma banda intensa na região de $3500\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$, referente ao estiramento da ligação O-H.

Os espectros de RMN ^1H destes flavonóides são bastante similares, apresentando um singleto em torno de $\delta\ 12,7$, característico das hidroxilas fenólicas queladas, posicionadas em 5. Na região aromática observa-se um singleto em torno de $\delta\ 7,6$ e em alguns casos como um dubleto com uma constante de acoplamento pequena em torno de $2,0\text{ Hz}$ (acoplamento em meta), (H-2'). Observa-se ainda, um dd em torno de $\delta\ 7,4$ ($8,3$ e $2,0\text{ Hz}$, H-6') e um outro dubleto em $\delta\ 6,9$ (H-5', $8,3\text{ Hz}$) e os singletos relativos a H-8 e H-6, em torno de $\delta\ 6,4$ e $\delta\ 6,2$ respectivamente.

Um dubleto em torno de $\delta\ 5,0$ indica a presença do hidrogênio anomérico e também os multipletos, que em alguns casos são sinais alargados, entre de $\delta\ 3,0$ a $\delta\ 4,0$, indicam a presença de substituição por glicosídeo e quando este glicosídeo é a raminose, há presença de um dubleto em torno de $\delta\ 1,0$, relativo à sua metila.

Estas características são confirmadas pelos espectros de RMN ^{13}C , onde se observam, por exemplo, os sinais de deslocamentos químicos em torno de $177,0\ \delta$, característico de carbonilas queladas em flavonóis e nos casos dos glicosídeos destacam-se por exemplo os carbonos em torno de $\delta\ 61,0$ que são característicos da glicose e no caso da raminose o sinal de carbono em $\delta\ 17,0$ (metila), confirma a presença deste glicosídeo.

A atribuição se torna inequívoca, quando complementada, se necessário, através de análise de técnicas de correlações tanto homo quanto heteronucleares e também através de comparações com dados da literatura, como comparação dos deslocamentos químicos de RMN ^{13}C em AGRAWAL, (1989).

5.1.1 - Identificação estrutural de 1, Quercetina, SMFAC8-14

O primeiro flavonóide isolado foi a quercetina, que é bastante conhecida. Ela apresenta o singlete relativo ao OH-5 em δ 12,8; na região dos sinais de hidrogênios aromáticos, observa-se um singlete em δ 7,76 relativo H-2', dois dubletos em δ 7,53 e δ 6,87 com constantes de 8,4 Hz relativos a H6' e H-5' respectivamente, além de dois singletos em δ 6,39 e δ 6,17 relativos a H-8 e H-6 respectivamente, (Tabela 4, Figura 16).

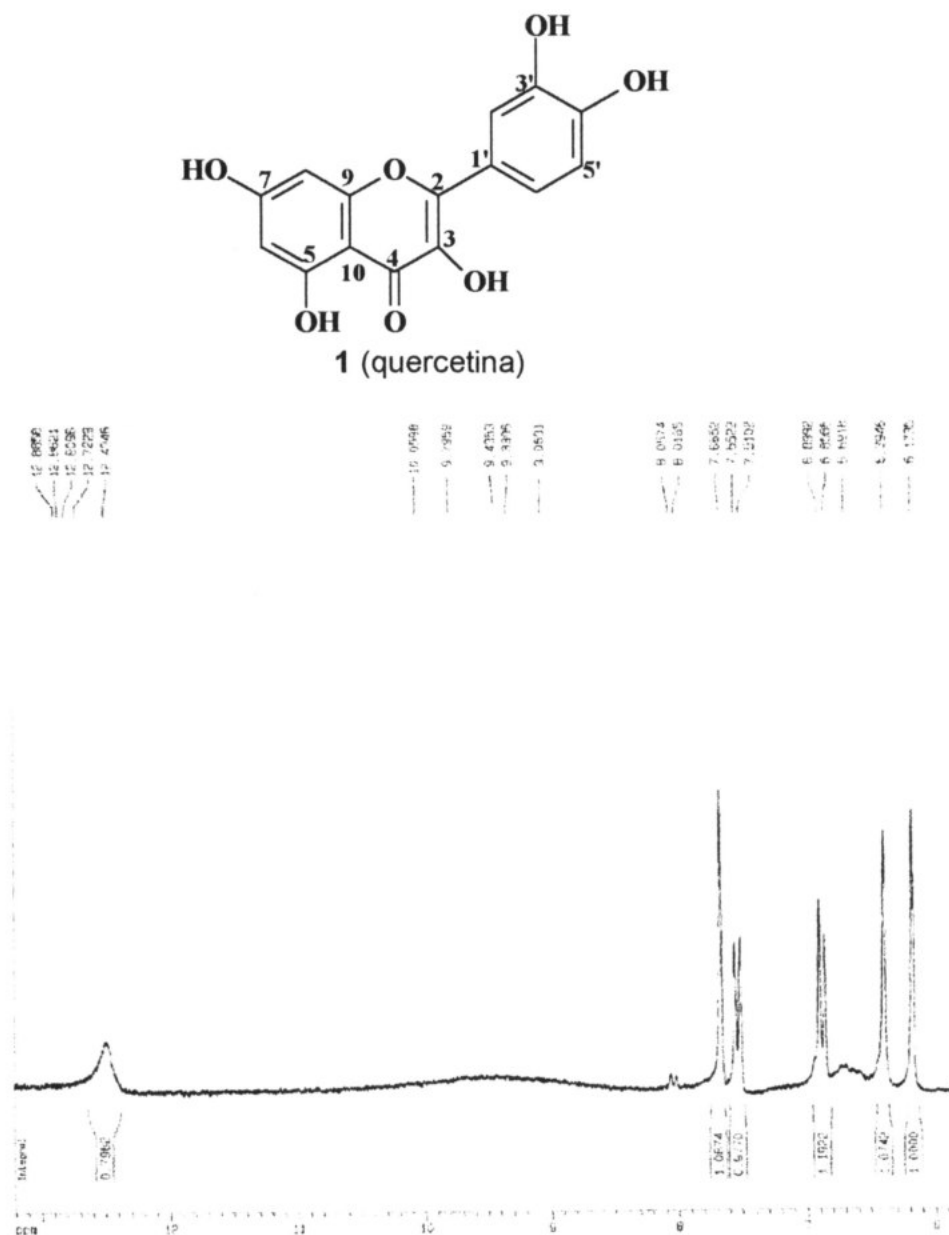


Figura 16 – Espectro de RMN ^1H ampliado de 1 (quercetina), DMSO, 9,8 T.

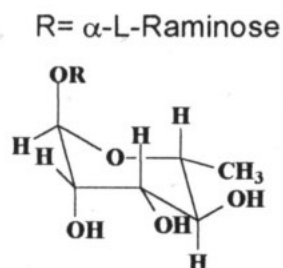
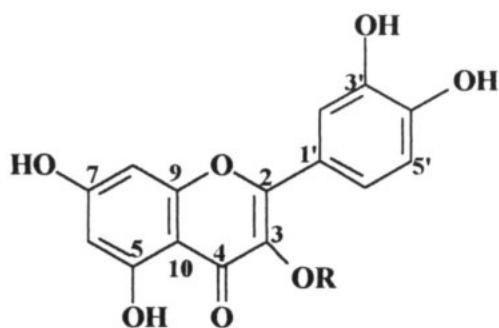
Tabela 4- Dados de RMN ^1H de **1** (quercetina), DMSO, 9,8 T

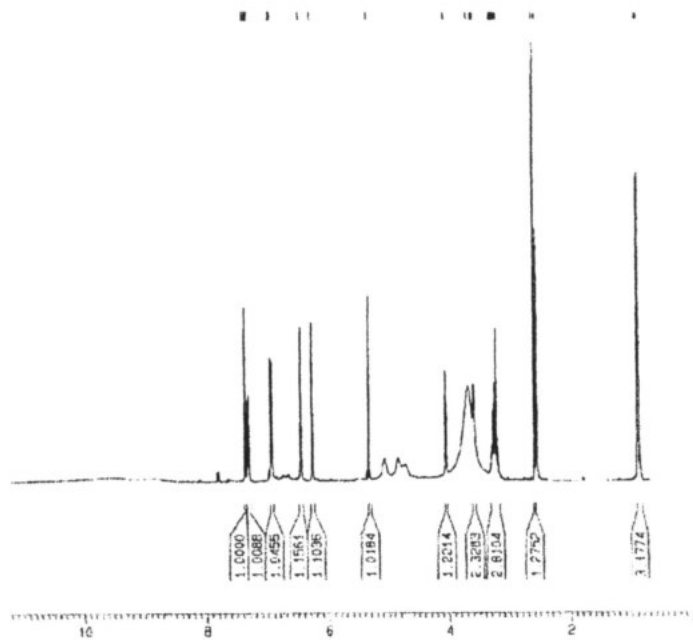
H	δ (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)	δ (ppm) Literatura AGRAWAL (1989).
OH	12,88	s		12,6
H-2'	7,66	s		7,6
H-6'	7,53	d	8,4	7,5
H-5'	6,87	d	8,4	6,8
H-8	6,39	s		6,3
H-6	6,17	s		6,1

5.1.2 - Identificação estrutural de **2** - SMFAC13-21

Através da análise do espectro de RMN ^1H (Figura 17), pode-se observar o sinal de deslocamento químico do hidrogênio em δ 12,6, referente à hidroxila quelada em 5; os sinais dos hidrogênios aromáticos do anel B em δ 7,36 (H-2', d 1,3 Hz), em δ 7,31 (H-6' dd 1,3 Hz e 8,3 Hz); H-5' (d, 8,3 Hz) em δ 6,92 e também dos demais hidrogênios do anel A, H-8 (d, 1,2 Hz) e H-6 (d, 1,2 Hz) em δ 6,44 e δ 6,25 respectivamente.

Através da análise do espectro de RMN ^1H utilizando o programa ZPGR, para pré-saturação da água (Figura 18), foi possível visualizar os sinais de deslocamento químicos de: H-1'' (s, δ 5,31); H-2'' (sl, δ 4,04); H-3'' (δ 3,56; dd 2,8 e 8,7 Hz); H-5'' e H-4'' (δ 3,24, m) e um dubleto em δ 0,86 (5,7 Hz) relativo a metila (Tabela 5), que indicam tratar-se de uma raminose ligada a unidade flavonoídica. Estes dados possibilitaram propor a estrutura de **2**.





2

Figura 17 - Espectro de RMN ¹H de 2, DMSO, 9,8 T, programa ZG.

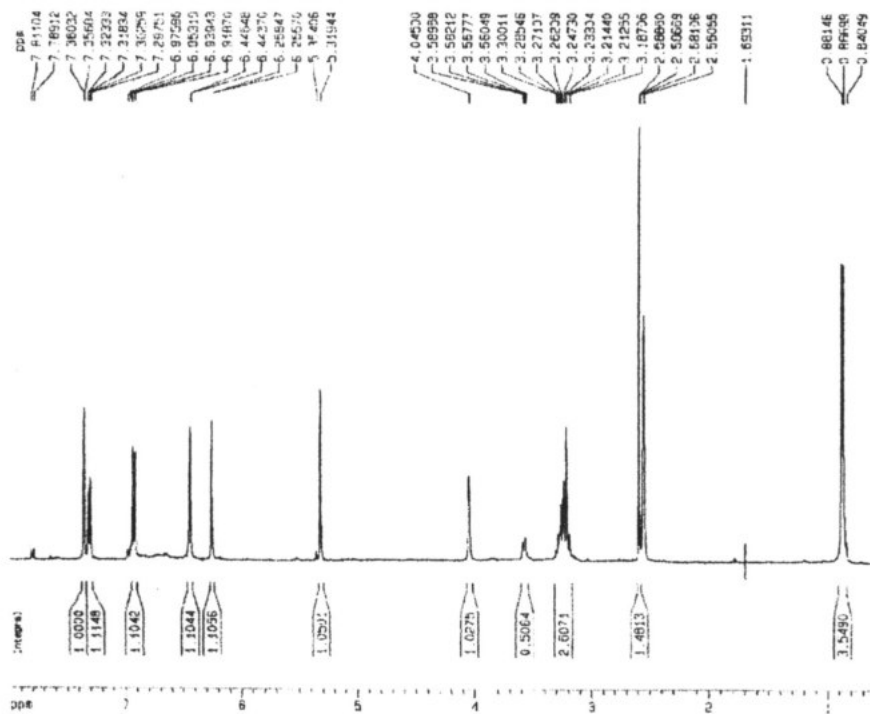
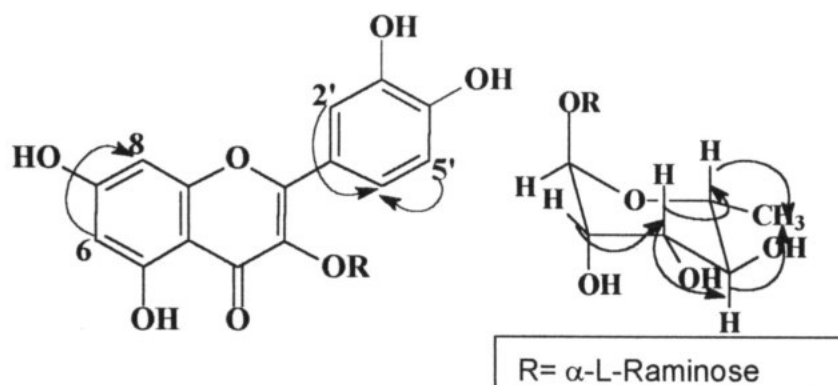


Figura 18 - Espectro de RMN ¹H de 2, DMSO, 9,8 T, programa ZGPR.

Tabela 5 – Dados de RMN de ^1H de **2**, DMSO, 9,8 T

H	Deslocamento Químico (ppm)	Multiplicidade	Constantes de acoplamento (Hz)
OH	12,6	s	
2'	7,36	d	1,3
6'	7,31	dd	1,3; 8,3
5'	6,92	d	8,3
8	6,44	d	1,2
6	6,25	d	1,2
1''	5,31	s	
2''	4,04	sl	
3''	3,56	dd	2,8; 8,7
5'' e 4''	3,24	m	
Me	0,87	d	5,7

As correlações H-H (Figura 19), obtidas a partir do espectro de COSYGR (Figura 20), foram utilizadas para se comprovar as correlações entre os hidrogênios do glicosídeo. O espectro de COSYGR é um experimento que depende de pouquíssimo tempo para sua aquisição, além de diminuir ou até mesmo eliminar os possíveis sinais relativos a solventes ou artefatos ou que surgem devido ao ciclo de fases empregados em experimentos em duas dimensões, quando não utilizado um gradiente de campo.

Figura 19 - Correlações observadas através do espectro de COSYGR para o **2**.

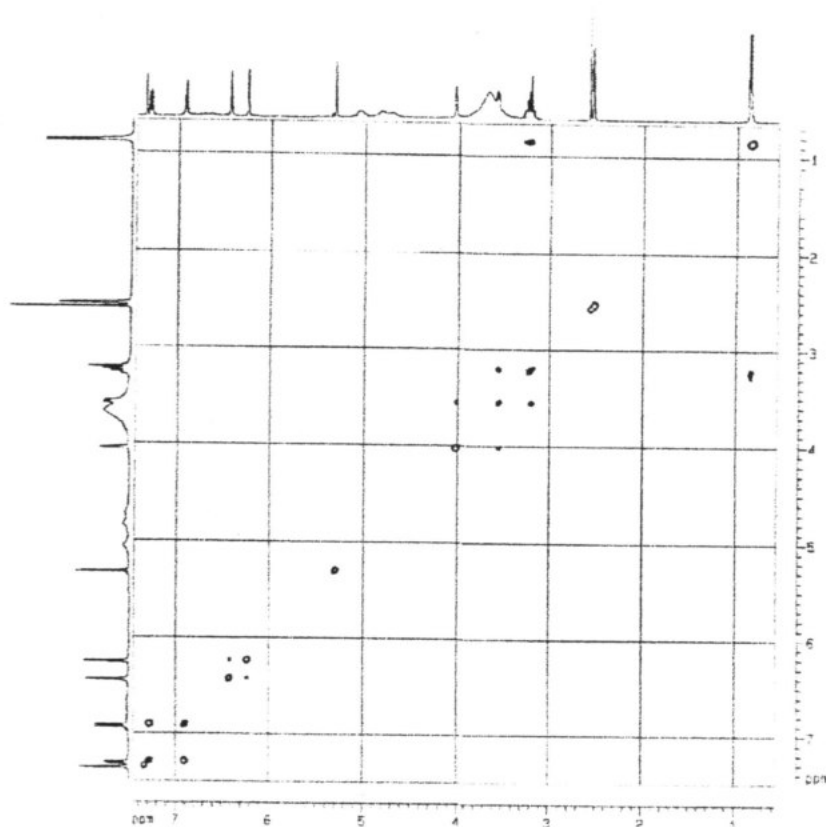


Figura 20- Espectro de RMN ^1H COSYGR de **2**, DMSO, 9,8 T.

O espectro de HSQC (Figura 21), possibilitou observar as correlações entre os hidrogênios diretamente acoplados aos seus respectivos carbonos. Essas correlações são mostradas na Figura 22.

A análise destas correlações permitiu a atribuição exata dos carbonos e também, contribuiu na indicação da forma de substituição do flavonóide.

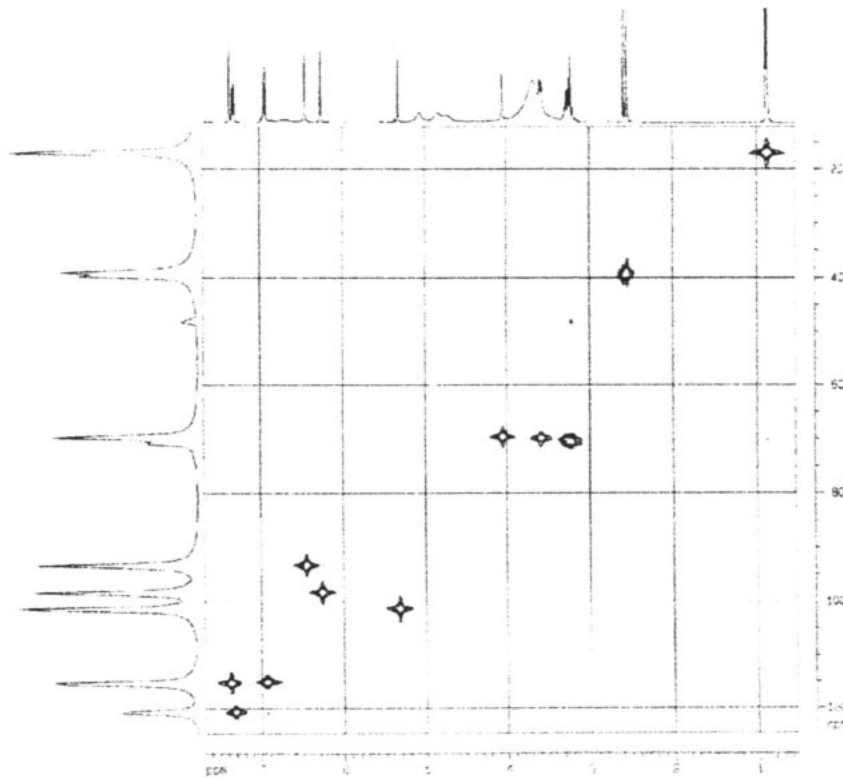
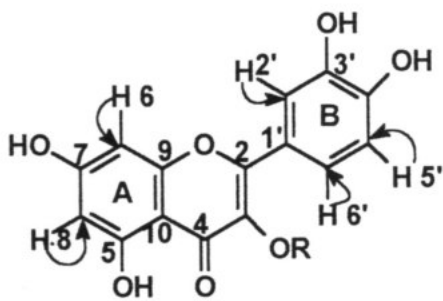
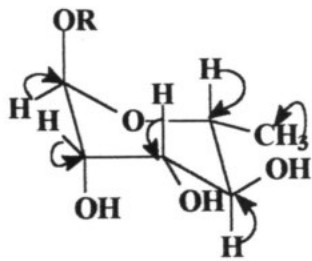


Figura 21 - Espectro de RMN HSQC de 2, DMSO, 9,8 T.



H6 = δ 6,62	\rightarrow	δ 98,0	C6
H8 = δ 6,44	\rightarrow	δ 94,0	C8
H2' = δ 7,36	\rightarrow	δ 116,0	C2'
H5' = δ 6,92	\rightarrow	δ 115,8	C5'
H6' = δ 7,31	\rightarrow	δ 98,0	C6'



R = α -L-Raminose

H1'' = δ 5,31	\rightarrow	δ 102,2	C1''
H5'' = δ 3,24	\rightarrow	δ 70,9	C5''
H3'' = δ 3,56	\rightarrow	δ 70,7	C3''
H4'' = δ 3,24	\rightarrow	δ 71,5	C4''
H2'' = δ 4,04	\rightarrow	δ 70,4	C2''
H6'' = δ 0,88	\rightarrow	δ 17,2	C6''

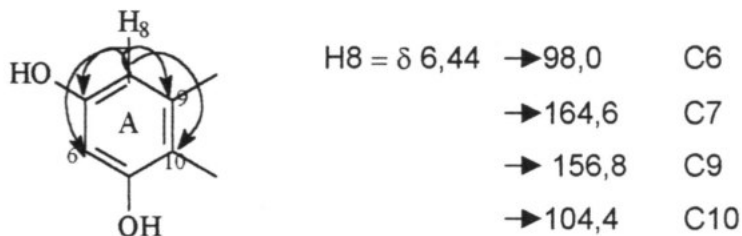
Figura 22 - Correlações observadas através do espectro de HSQC-GR de 2.

O espectro de HMBC (Figura 23), permitiu observar as correlações à longa distância, o que possibilitou confirmar a posição de substituição do glicosídeo. As correlações observadas através do espectro de HMBC são indicadas a seguir:

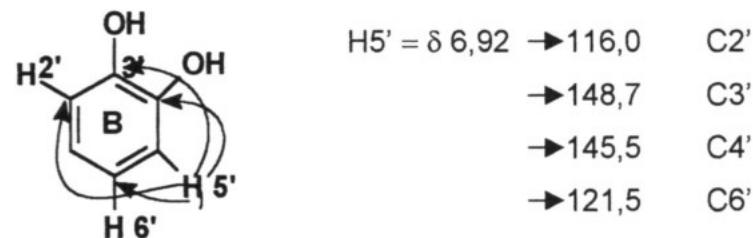
a) Correlações observadas para o hidrogênio 6 com os deslocamentos químicos dos carbonos do anel A:



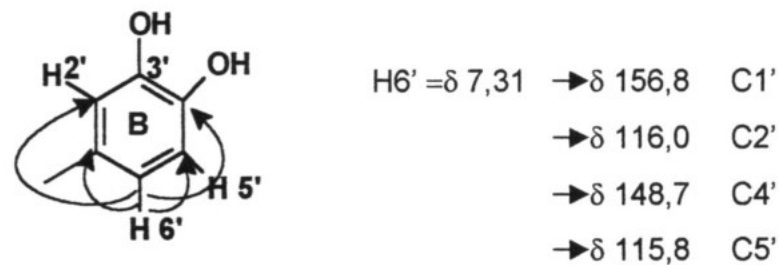
b) Correlações observadas para o hidrogênio 8 com os deslocamentos químicos dos carbonos do anel A:



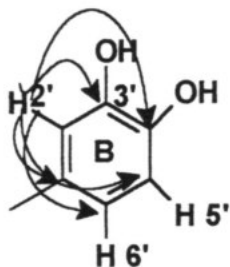
c) Correlações observadas para o hidrogênio 5' com os deslocamentos químicos dos carbonos do anel B:



d) Correlações observadas para o hidrogênio 6' com os deslocamentos químicos dos carbonos do anel B:

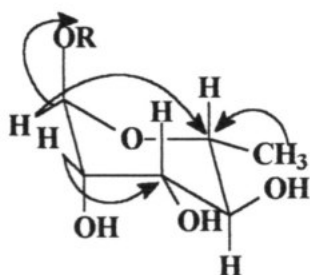


d) Correlações observadas para o hidrogênio 2' com os deslocamentos químicos dos carbonos do anel B:



$H2' = \delta 7,36$	$\rightarrow \delta 156,8$	$C1'$
	$\rightarrow \delta 145,5$	$C3'$
	$\rightarrow \delta 148,7$	$C4'$
	$\rightarrow \delta 115,8$	$C5'$
	$\rightarrow \delta 121,5$	$C6'$

e) Correlações observadas para os hidrogênios do glicosídeo com os carbonos do mesmo.



$H6'' = \delta 0,88 (H6'')$	$\rightarrow \delta 70,9$	$C5''$
$H2'' = \delta 4,04 (H2'')$	$\rightarrow \delta 70,7$	$C3''$
$H1'' = \delta 5,31 (H1'')$	$\rightarrow \delta 102,1$	$C1''$,
	$\rightarrow \delta 134,5$	$C3$
	$\rightarrow \delta 70,9$	$C5''$

Através da análise do espectro de RMN ^{13}C (Figura 24, Tabela 6), observando seus deslocamentos químicos e comparados com os dados de literatura (MARKHAM,1978), pode-se confirmar os carbonos atribuídos indiretamente através dos espectros anteriores de HSQC e HMBC.

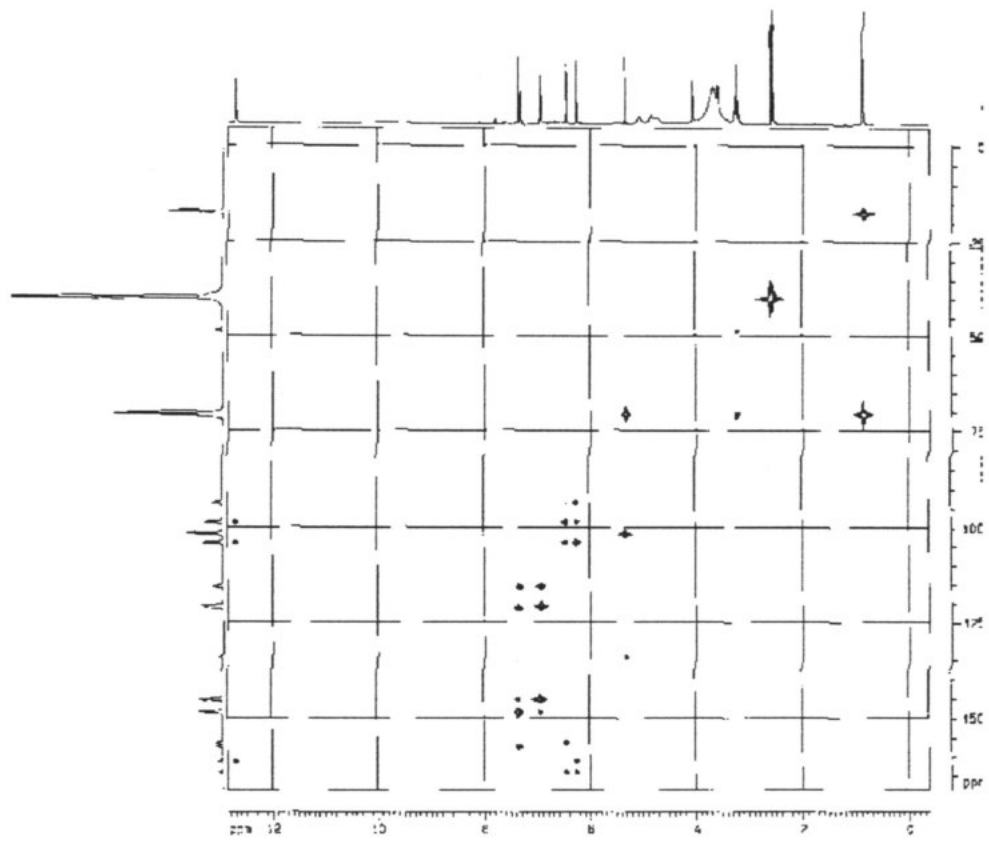


Figura 23 - Espectro de RMN HMBC de 2, DMSO, 9,8 T.

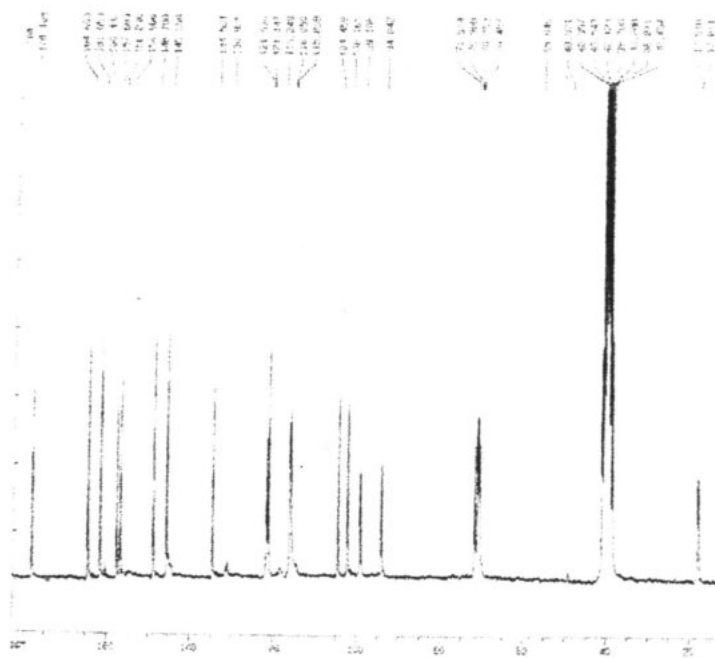
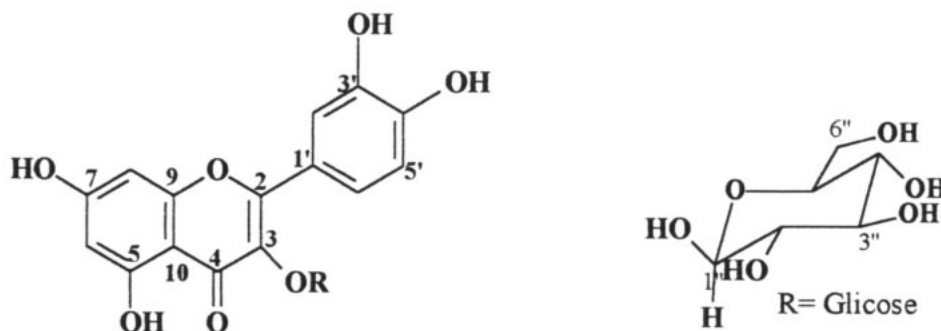


Figura 24 - Espectro de RMN ¹³C de 2, DMSO, 9,8 T.

Tabela 6- Dados de RMN ^{13}C de **2**, 9,8 T

C	Deslocamento químico (ppm) de 2	Deslocamento químico (ppm) literatura (MARKHAM et al, 1978)
2	157,6	156.4
3	134,5	134.4
4	178,1	177.7
5	161,1	161.2
6	98,1	98.6
7	164,6	164.0
8	94,0	93.5
9	156,8	157.0
10	104,4	104.2
1'	121,5	121.0
2'	116,0	115.4
3'	145,5	145.1
4'	148,7	148.3
5'	115,8	115.8
6'	121,1	121.0
1''	102,1	101.9
2''	70,9	70.4
3''	70,7	70.6
4''	71,5	71.5
5''	70,4	70.1
Me(6'')	17,8	17.3

5.1.3 - Identificação estrutural de 3 - SMFAC-1



3

Esta substância foi isolada da subfração acetato de etila, conforme discutido na parte experimental. O espectro de RMN ^1H (Figuras 25 e 26, Tabela 7), mostra o sinal de deslocamento químico do hidrogênio da hidroxila ligada ao carbono 5 em ponte com o oxigênio da carbonila do anel C ($\delta 12,5$). Os deslocamentos químicos dos hidrogênios referentes à unidade flavonoídica de **3** e suas constantes de acoplamentos (Tabela 7) são semelhantes aos de **2**. Aparecem ainda, sinais alargados na região entre $\delta 3,00 - 3,70$ que são característicos de glicosídeos. Um sinal dd em $\delta 7,55$ relativo a H-6' com uma constante de acoplamento $J = 8,50$ Hz (acoplamento em *orto* com H-5') e outra constante de acoplamento pequena ($J = 2,03$ Hz), em *meta*, relativo ao acoplamento com H-2'; um sinal em $\delta 7,42$ d, relativo a H-2' acoplado em *meta* com H-5' com constante $J = 2,03$ Hz e em $\delta 6,70$ um sinal de dubleto relativo a H-5' acoplado em *orto* com H-6' com $J = 8,5$ Hz foram observados e confirmam o modo de substituição do anel C. Observa-se ainda os sinais relativos a H-8 em $\delta 6,29$ e H-6 em $\delta 6,08$ como sendo dubletos e acoplado entre si em *meta* com constantes de acoplamento $J = 1,8$ Hz. Por fim, observou-se sinais alargados entre $\delta 3,0 - 3,7$ relativos ao glicosídeo. Estas multiplicidades são melhores visualizadas na ampliação do espectro de hidrogênio na Figura 26.

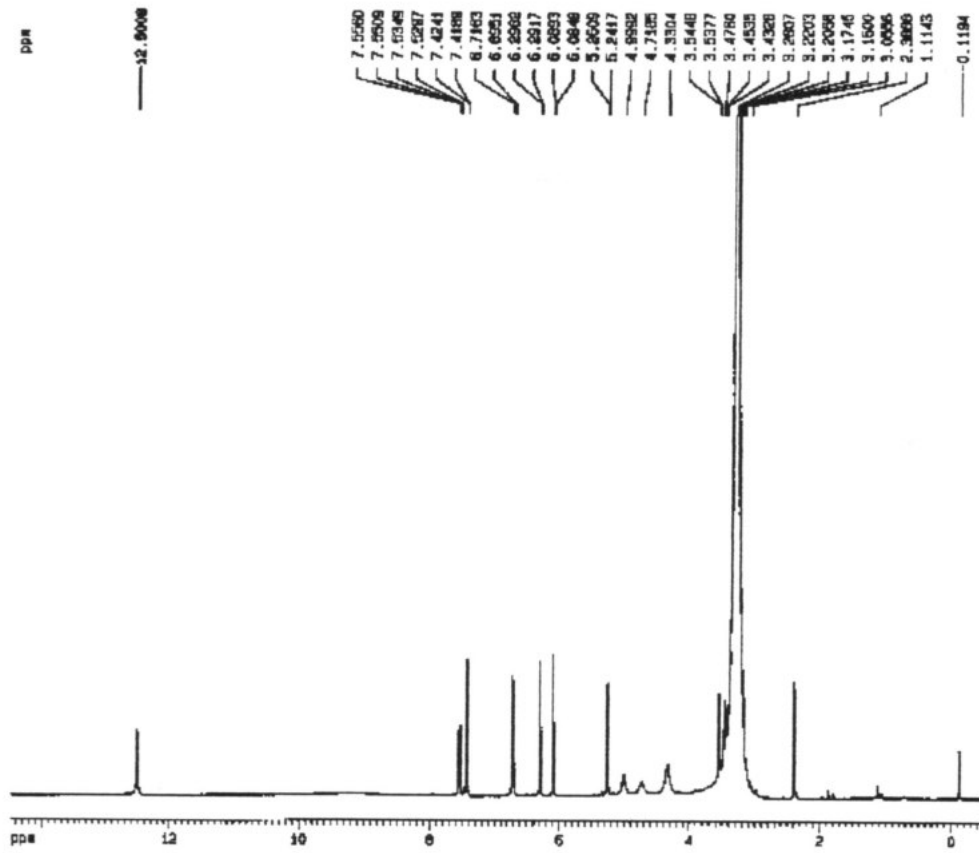


Figura 25 – Espectro de RMN ^1H de 3, DMSO, 9,8 T.

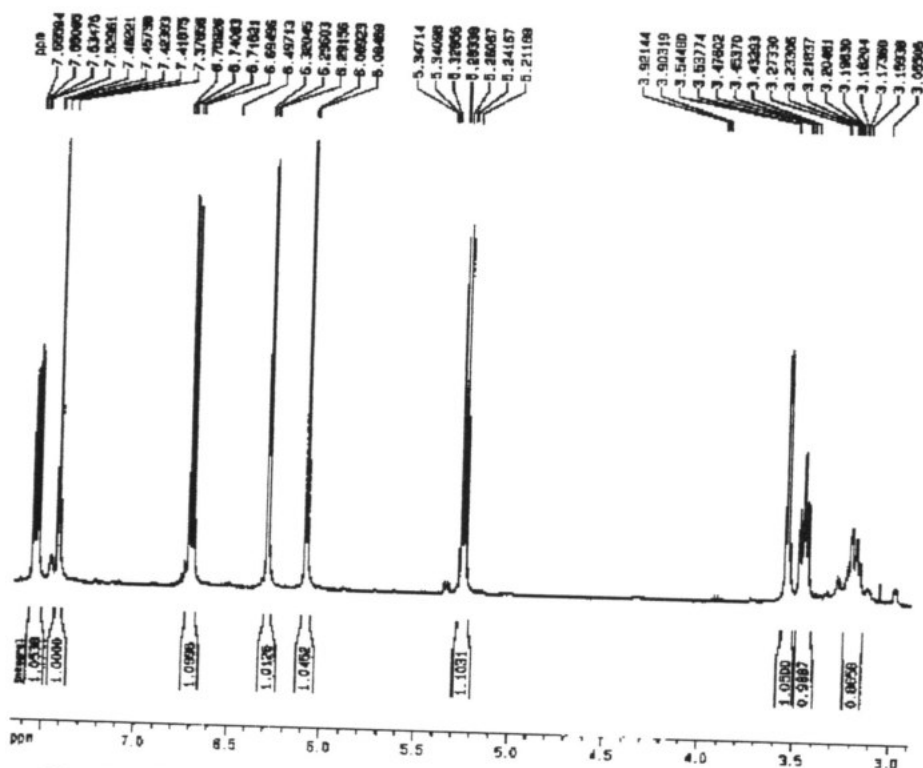


Figura 26 –Ampliação da região δ 3,0 - 7,7 do espectro de RMN ^1H de **3**, obtido com pré-saturação do sinal da água.

Tabela 7- Dados de RMN de ^1H de **3**, DMSO, 9,8 T

H	δ (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)
OH	12,5	s	
H-6'	7,55	dd	2,03; 8,50
H-2'	7,42	d	2,03
H-5'	6,70	d	8,50
H-8	6,29	d	1,80
H-6	6,08	d	1,80
1''	5,25	d	7,68
2'-5'	3,00-3,70	m	

Os acoplamentos são melhores visualizados através das correlações observadas através do espectro de COSYGR (Figura 27), onde se podem

observar as correlações entre H-6' em δ 7,55 e H-2' em δ 7,42 e H-5' em δ 6,70 e H-6'em δ 7,55 e também as correlações entre H-8 em δ 6,29 e H-6 em δ 6,08.

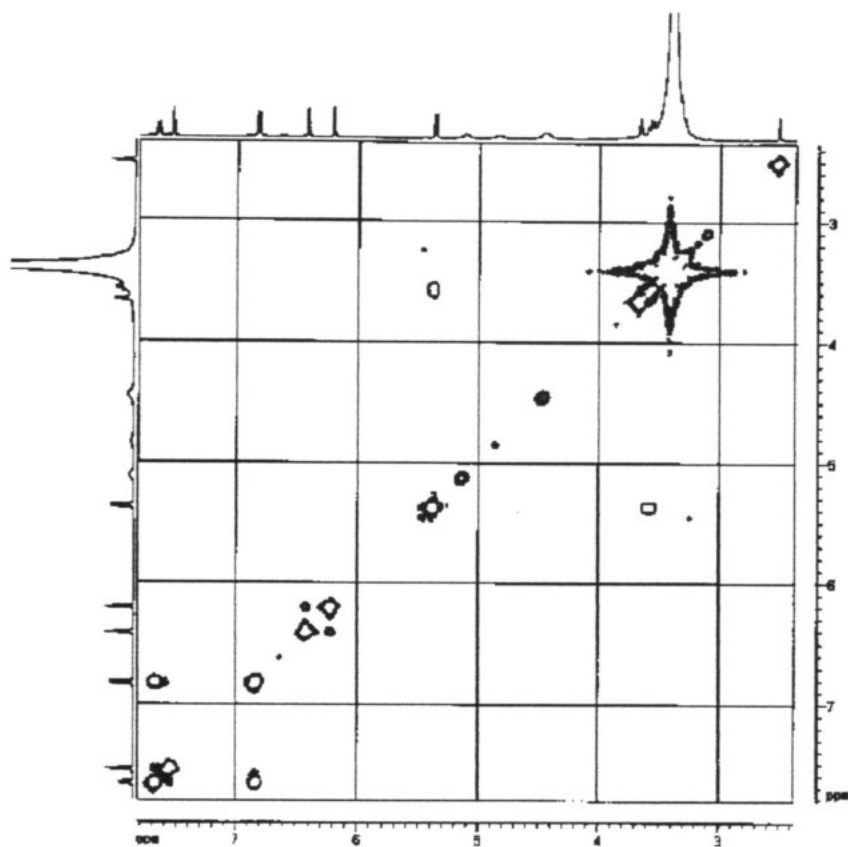


Figura 27 - Espectro de $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ COSYGR de **3**, DMSO, 9,8 T.

Através da análise dos espectros de massas com injeção e modo de ionização "Eletrospray" (Figura 28), verifica-se a perda de 163 u.m.a., sugerindo a perda de uma molécula de água seguida de uma unidade de glicose, indicando o açúcar ligado em C-3 do flavonóide.

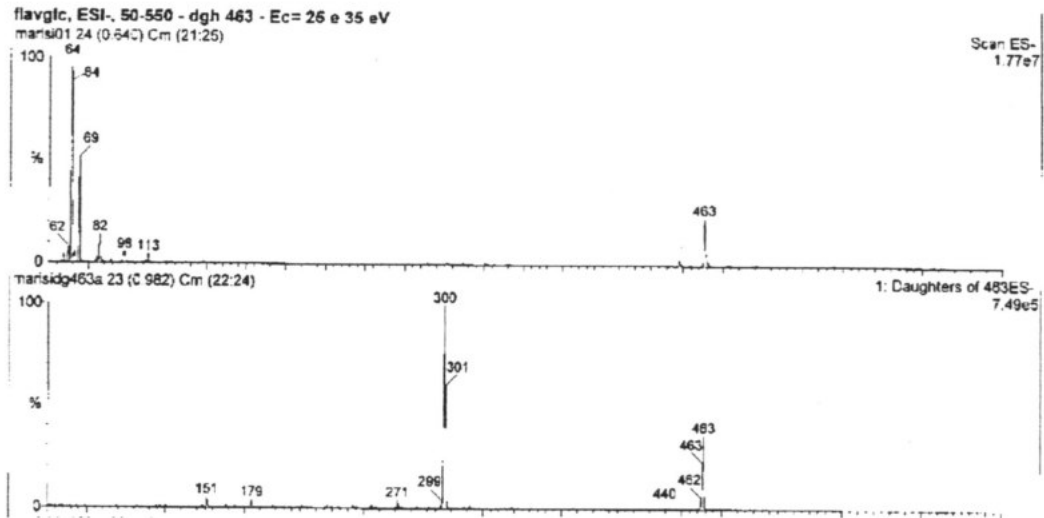


Figura 28- Espectro de massas – “Eletrospray” de **3**

A comparação dos dados de RMN ^{13}C (Figura 29) de **3** com os reportados na literatura, AGRAWAL, 1995, permitiu identificar o açúcar como glicose (Tabela 8).

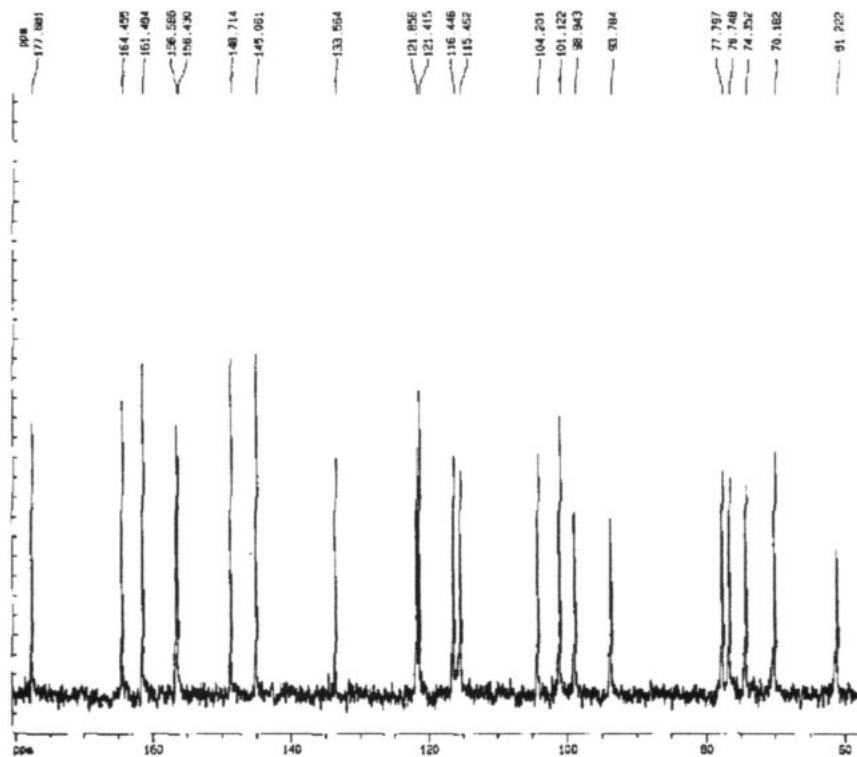
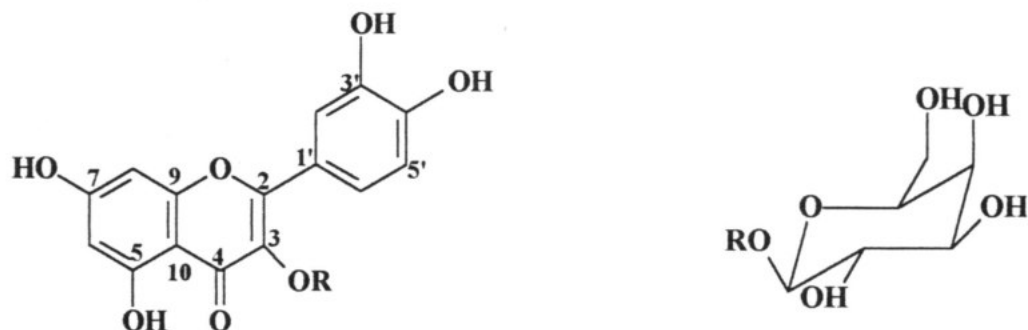


Figura 29 – Espectro de RMN ^{13}C de **3**, DMSO, 9,8 T.

Tabela 8 - Dados de RMN de ^{13}C de **3**, DMSO, 9,8 T

C	Deslocamento químico (ppm)	Deslocamento químico (ppm) literatura AGRAWAL (1989).
2	156,3	156,6
3	133,5	133,6
4	177,6	177,6
5	161,4	161,4
6	98,9	99,0
7	164,4	164,6
8	93,7	93,8
9	156,3	156,4
10	104,1	104,1
1'	121,1	121,7
2'	115,4	115,5
3'	145,0	145,1
4'	148,6	148,7
5'	116,4	116,4
6'	121,8	121,8
1''	101,0	101,1
2''	74,3	74,3
3''	76,7	76,7
4''	70,1	70,2
5''	77,7	77,7
6''	61,2	61,3

5.1.4 - Identificação estrutural de 4 - SMFAC-25-48



R = Galactose

4

O flavonóide **4** apresenta os espectros de RMN ^1H (Tabela 9, Figuras 30 e 31) e de RMN ^{13}C (Figura 32) semelhantes aos anteriores. A partir da análise dos mesmos, principalmente pela comparação dos dados de RMN ^{13}C , pode-se verificar que eles diferenciam apenas pela mudança do glicosídeo, sendo neste caso a galactose (Tabela 10).

O espectro de RMN ^1H (Tabela 9, Figuras 30 e 31) apresenta o sinal de deslocamento químico da hidroxila em δ 12,7, típica quando esta está quelada na posição 5. O sinal em δ 7,72, dd com $J = 1,8$ e 8,4 Hz, relativo ao H-6' tendo uma constante de acoplamento em *orto* relativa ao acoplamento com H-5' (δ 6,86, d, $J = 8,4$ Hz) e a outra constante de acoplamento pequena em *meta* relativa ao acoplamento com H-2' (7,56, d, $J = 1,8$ Hz). Observa-se, ainda, dois sinais dubletos em δ 6,45 e 6,24 relativos a H-8 e H-6 respectivamente, sendo que eles estão acoplado entre si numa relação *meta*, com uma constante de acoplamento pequena, $J = 1,6$ Hz. A região que compreende δ 3,80-3,20 apresenta sinais alargados característicos de glicosídeos. As multiplicidades dos sinais são melhores visualizadas na ampliação do espectro de hidrogênio na Figura 31.

Para elucidação do glicosídeo, se fez necessária a análise do espectro de RMN ^{13}C (Figura 32) e posterior comparação com dados da literatura conforme mostrado na Tabela 10.

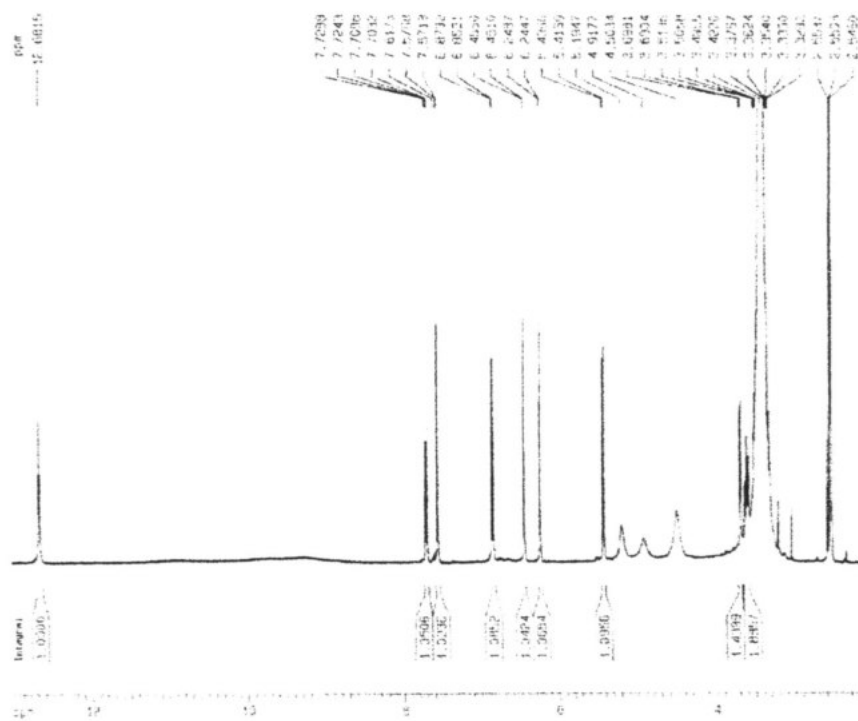


Figura 30 – Espectro de RMN ¹H de 4, DMSO, 9,8 T.

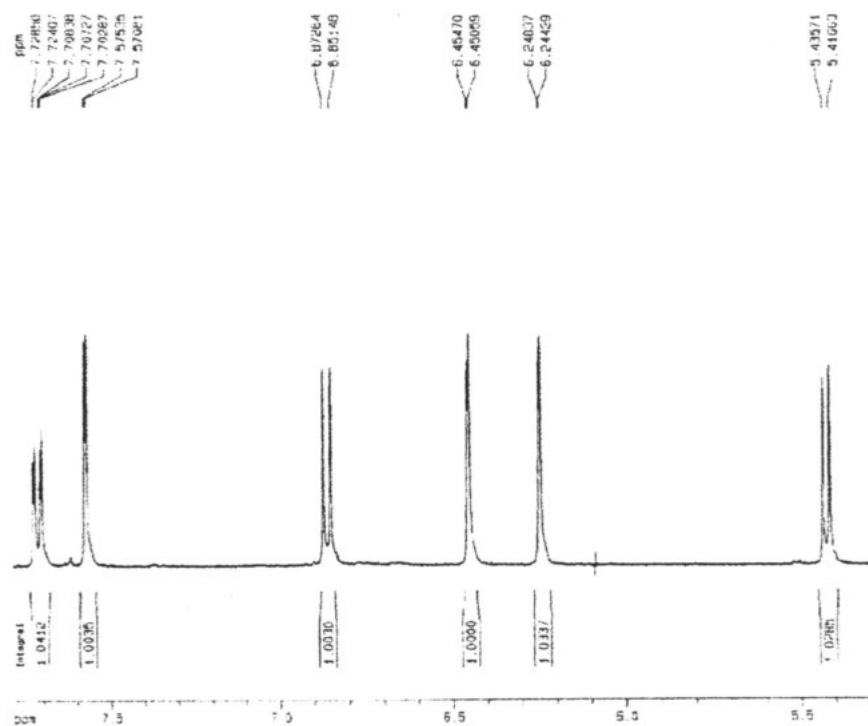


Figura 31 – Ampliação da região aromática do espectro de RMN ^1H de **4**, DMSO, 9,8 T.

Tabela 9 – Dados de RMN de ^1H de **4**, DMSO, 9,8 T

H	Deslocamento Químico (ppm)	Multiplicidade	Constantes de acoplamento (Hz)
OH	12,7	s	
6'	7,72	dd	1,8; 8,4
2'	7,57	d	2,2
5'	6,86	d	8,4
8	6,45	s	1,6
6	6,24	d	1,6
1''	5,42	d	7,6
2''-6''	3,20-3,80	m	

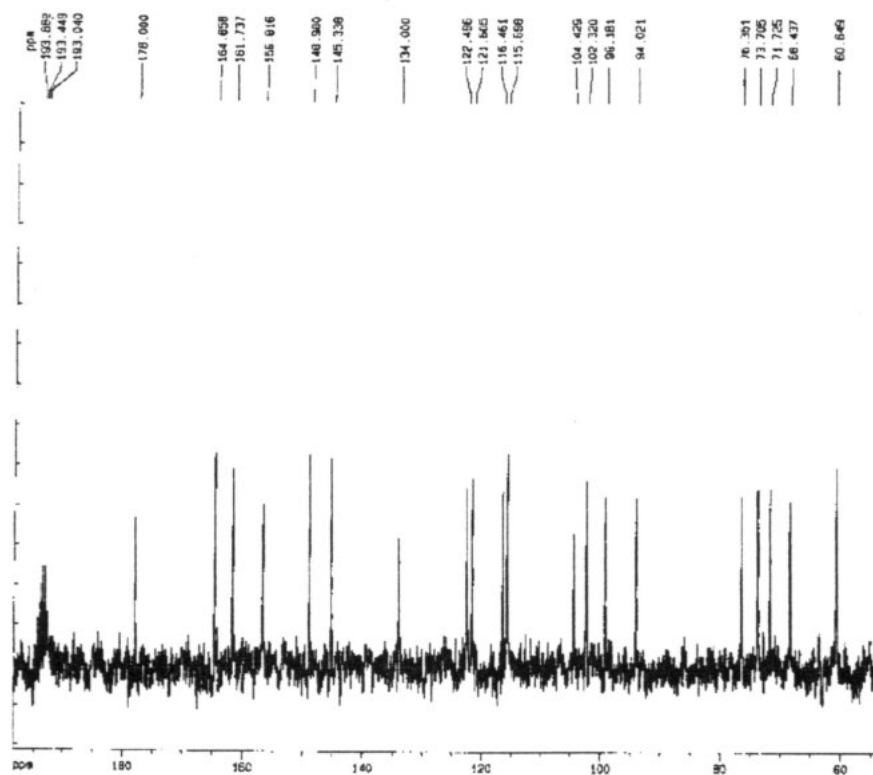


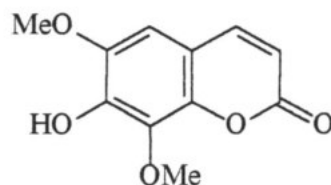
Figura 32 – Espectro de RMN ^{13}C de **4**, DMSO, 9,8 T.

Tabela 10 - Dados de RMN ^{13}C de **4**, DMSO, 9,8 T

C	Deslocamento químico (ppm)	Deslocamento químico (ppm) literatura AGRAWAL, (1989).
2	156,8	156,4
3	134,0	133,6
4	178,0	177,3
5	161,7	161,3
6	99,1	99,2
7	164,6	165,7
8	94,0	93,9
9	156,8	156,7
10	102,3	103,6
1'	122,4	122,0
2'	115,6	115,4
3'	145,3	145,0
4'	148,9	148,9
5'	116,4	116,0
6'	121,6	121,1
1''	104,4	104,1
2''	71,7	71,7
3''	73,7	73,8
4''	76,3	76,0
5''	68,4	69,7
6''	60,6	61,3

5.2 - Identificação estrutural das cumarinas

5.2.1 – Identificação estrutural de 5



5

Esta substância isolada dos galhos de *Swietenia macrophylla*, apresentou-se como um sólido branco e uma coloração azul fluorescente quando irradiada com luz UV a $\lambda = 360$ nm em CCD, sugerindo tratar-se de uma cumarina.

O espectro de RMN ^1H (Figura 33) apresenta um dubleto em δ 7,62 ($J = 9,5$ Hz) e um outro em δ 6,27 ($J = 9,5$) integrando para 1 hidrogênio cada e acoplando entre si. Eles foram atribuídos respectivamente aos hidrogênios H-4 e H-3 da dupla ligação conjugada a carbonila. Pode-se observar neste espectro ainda, um singleto em δ 6,66, atribuído a H-5 e outro singleto largo em δ 6,10 típico de uma hidroxila fenólica. Finalmente dois singletos em δ 4,09 e δ 3,94 foram atribuídos às duas metoxilas. Estes deslocamentos químicos permitiram identificar **5** como isofraxidina (AGOSTINHO, 1996).

O espectro de massas (EM, Figura 34) apresentou o pico do íon molecular a $m/z = 222$, que também corresponde ao base. Esse valor de m/z para M^+ sugere para este composto a fórmula molecular $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{O}_5$ que corresponde ao da cumarina isofraxidina. A interpretação deste espectro de massas é apresentada na Figura 35 e corrobora na identificação de **5**.

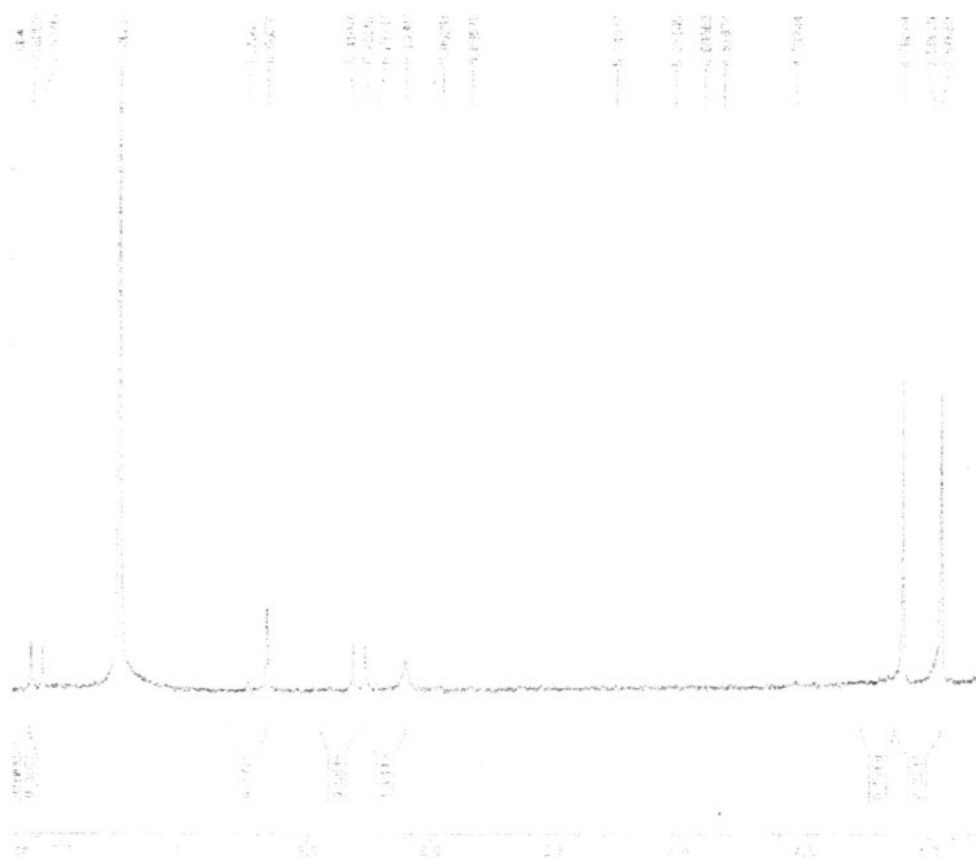


Figura 33: Espectro de RMN ^1H de 5, CDCl_3 , 9,8 T.

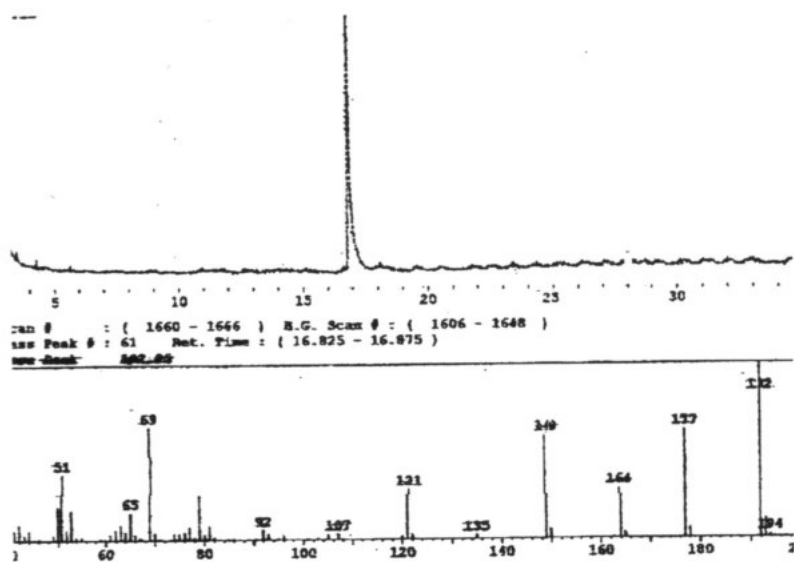


Figura 34- Cromatograma de íons totais e EM de 5.

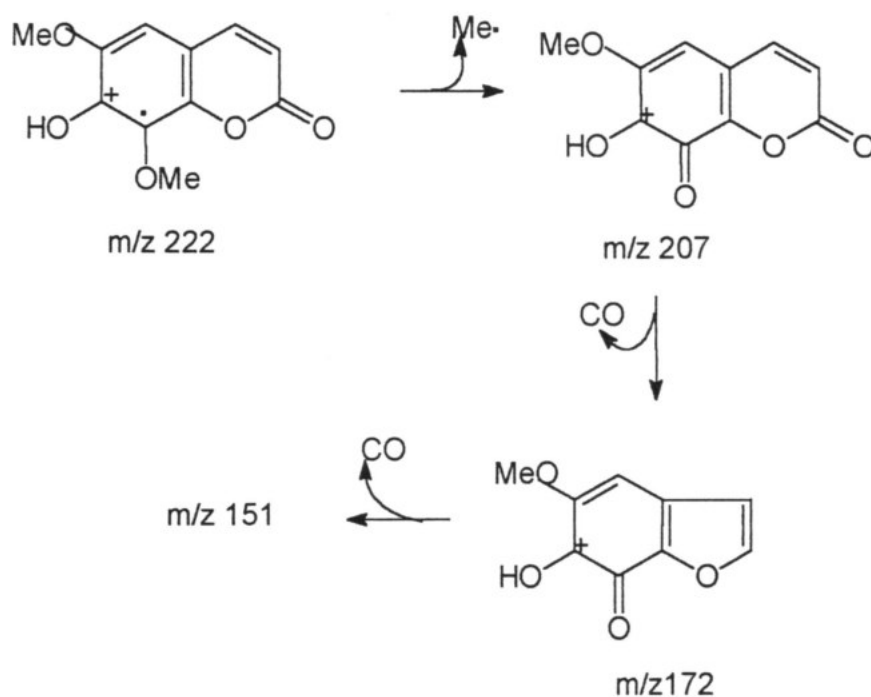
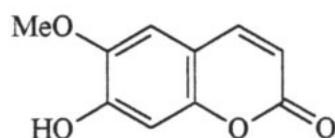


Figura 35 – Interpretação do espectro de massas de **5**

5.2.2 - Identificação estrutural de **6**



6

A substância **6** isolada dos galhos de *Swietenia macrophylla*, também se apresentou como um sólido branco e uma coloração azul fluorescente quando irradiada com luz UV a $\lambda = 360$ nm em CCDA, sugerindo tratar-se de outra cumarina.

O espectro de RMN ^1H (Figura 36) apresenta um duplete em δ 7,62 ($J = 9,6$ Hz, H-4) e um outro a δ 6,27 ($J = 9,6$, H-3) integrando para 1 hidrogênio cada e com acoplado ente si; dois singletos em δ 6,92 e δ 6,73, atribuídos aos hidrogênios H-5 e H-8 respectivamente e finalmente um singlete em δ 3,95 atribuído a uma metoxila. Estes deslocamentos químicos permitiram identificar **6** como escopoletina (AGOSTINHO, 1996).

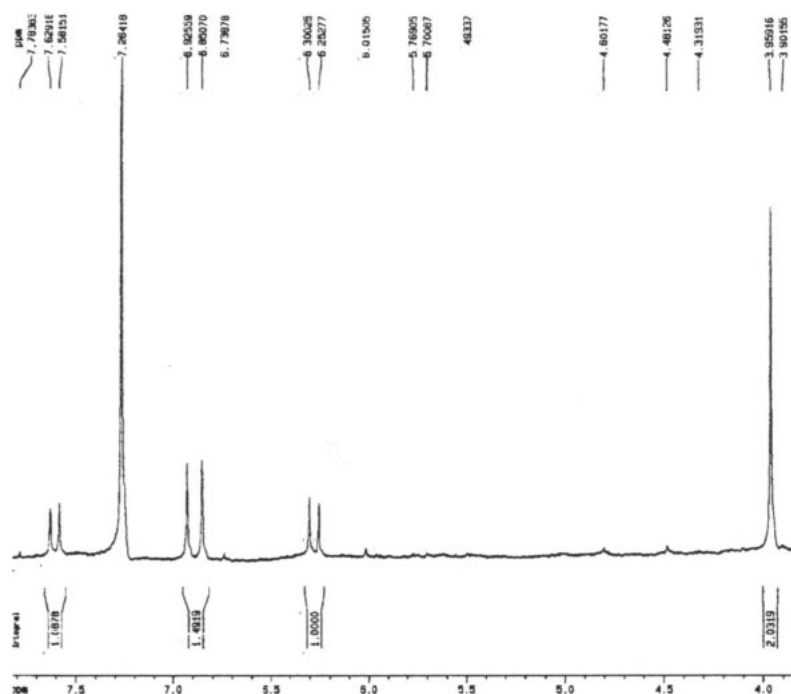


Figura 36 - Espectro de RMN ^1H de **6**, CDCl_3 , 9,8 T.

O EM (Figura 37) apresentou o pico do íon molecular a m/z 192, que corresponde também ao pico do íon base. Esses dados sugerem a fórmula molecular $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{O}_4$ que corresponde àquelas das cumarinas escopoletina (**6**) e isoescopoletina. Os dados de RMN ^1H e de RMN ^{13}C , não forneceriam informações suficientes para distinção entre ambas, pois os deslocamentos químicos são muitos semelhantes entre si.

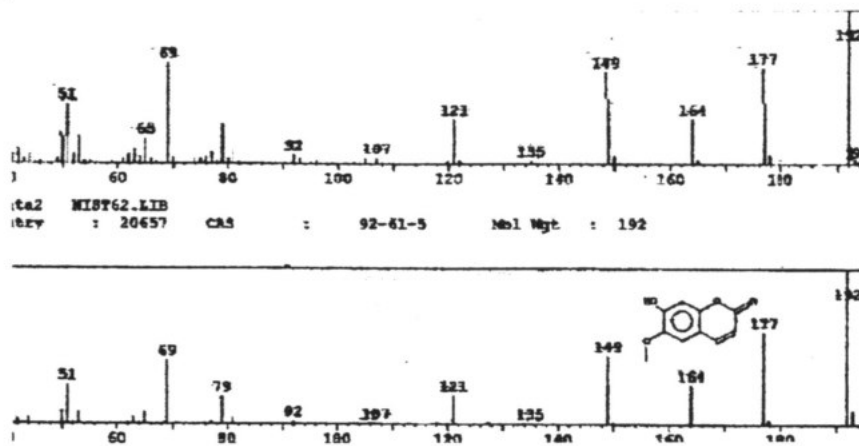
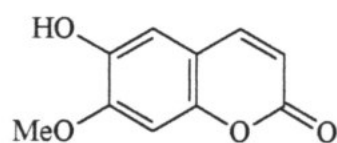


Figura 37- EM de **6**.



isoescopoletina

A confirmação da estrutura foi feita através da interpretação do espectro de massas (Figura 38) no qual a perda de uma metila a partir de $m/z = 192$ para a escopoletina, leva à extensão da conjugação do sistema aromático até o oxigênio ao qual a metila se ligava, formando o íon $m/z 177$ em alta porcentagem. Esta conjugação não ocorre para a isoescopoletina. Estes dados estão de acordo com AGOSTINHO (1996). Os dados foram comparados também com os aqueles do banco de dados do espectrômetro, havendo total concordância entre ambos.

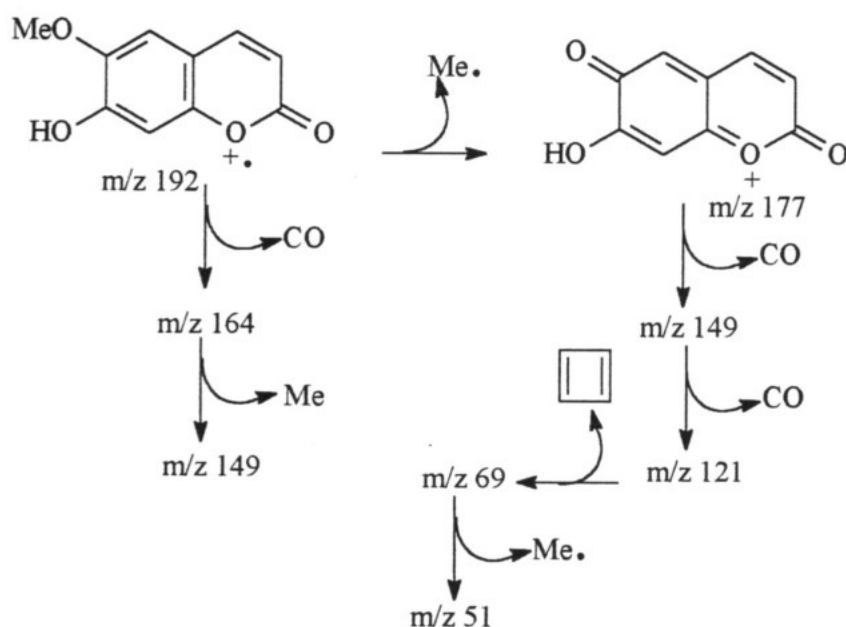


Figura 38 - Interpretação dos principais íons do espectro de massas 6.

5.3 Estudo comparativo entre os componentes dos brotos, folhas maduras e senescentes de *Swietenia macrophylla* utilizando técnicas de LC-MS e RMN ¹H

A combinação da cromatografia líquida e espectrometria de massas (CL-EM) pode ser considerada como sendo uma das mais importantes técnicas da última década do século XX (NIESSEN, 1999).

A CL-EM é uma tecnologia que nos últimos anos vem crescendo em várias áreas como bioquímica, toxicologia, farmacologia, química de polímeros, química ambiental e biotecnologia, apesar do alto custo, dos gastos com manutenção e da necessidade de um operador hábil (NIESSEN, 1999; SNYDER *et al.*, 1997). Este crescimento deve-se a sensibilidade, precisão, especificidade, e rapidez do método (MAUER, 1998).

A EM tem potencial de servir como um detector universal para HPLC, que, embora seja destrutiva, fornece a massa molecular dos solutos e auxilia na elucidação estrutural destes (Watson, 1997; CASS & DEGANI, 2001).

Desde 1970, diferentes tipos de interface para CL/EM foram desenvolvidos. As primeiras a alcançarem sucesso foram as interfaces de inserção direta de líquido (*direct liquid introduction*, DLI), cinta móvel (*moving belt*) e de feixe de partículas (*particle beam*, PB), que trabalham com os métodos de ionização por Impacto eletrônico/ionização química (EI/CI). Estas interfaces apresentaram alguns problemas operacionais, são menos sensíveis, menos universais sendo por isso pouco usadas na atualidade (CHAPMAN, 1998 apud MURGU, 1998; MAURER, 1998).

As interfaces CL/EM que atingiram sucesso comercial relativo e que foram utilizadas em análises de rotina, usavam outras formas de ionização. Estas foram *thermospray* (TS), FAB/LSIMS, que apesar de fornecerem bons resultados, contam com muitos parâmetros a serem ajustados para a otimização de suas operações, o que faz com que as análises sejam pouco reprodutivas, principalmente em trabalhos quantitativos. Com o surgimento da técnica *electrospray* (ES), muitas dessas dificuldades foram resolvidas, e atualmente esta é uma das interfaces de CL-EM mais usada (principalmente quando o aparelho conta com recursos de MS/MS) juntamente com a ionização química a pressão ambiente (APCI) (MURGU, 1998; MAURER, 1998).

O desenvolvimento do sistema CL-EM foi muito mais complexo que com o CG-EM, devido à necessidade de um interfaceamento entre o fluxo de solvente proveniente da coluna e a entrada do mesmo no sistema de vácuo do espectrômetro (Figura 39).

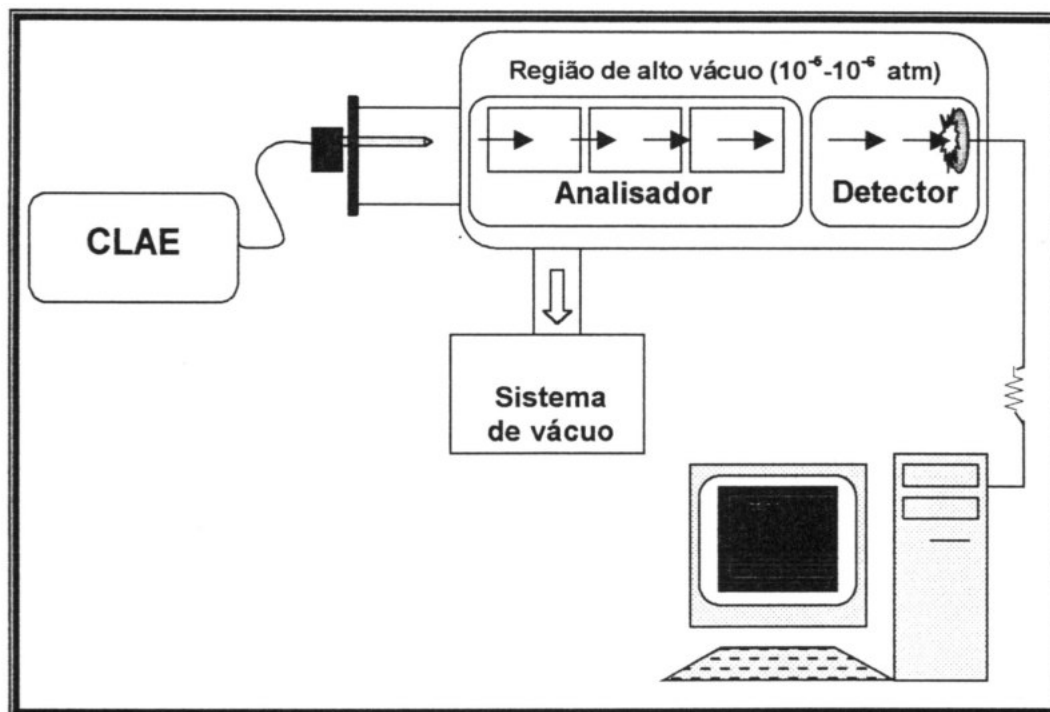


Figura 39 Esquema de Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas

Foram realizados experimentos de CL-EM para observar as relações entre os flavonóides existentes em extratos de folhas de *Swietenia macrophylla* (mogno) em diferentes estágios de maturação, pois através de observações de campo e experimentos realizados durante todo este trabalho, sabe-se que os insetos se alimentam apenas das folhas jovens, o que leva a crer que o fato dos insetos não se alimentarem das folhas mais velhas estaria relacionado com substâncias químicas encontradas nas mesmas.

Os flavonóides foram as substâncias isoladas em grande concentração das folhas maduras de mogno, conforme consta do item 5.1 e apresentaram um caráter inseticida frente à *H. grandella*. Este fato levou à análise dos flavonóides das amostras citadas.

Os flavonóides glicosilados (2-4), cromatografados em CLAE nas condições indicadas na parte experimental e com detecção por UV em 254 nm,

mostrou que estes flavonóides têm tempo de retenção variando de 15 a 20 minutos.

A análise dos CLAEs dos extratos dos brotos, folhas maduras e senescentes, comparando os tempos de retenção e os espectros de massas, permitiu diferenciar a constituição destes extratos quanto aos flavonóides. Assim, observa-se que, para a amostra relativa aos brotos, aparece apenas um único pico nesta região dos flavonóides glicosilados (Figura 40), ao passo que para as folhas maduras e senescentes (Figuras 41 e 42), aparecem três picos, relativos a no mínimo três diferentes estruturas de flavonóides. Observa-se, ainda, que o pico em aproximadamente 19 minutos é bem pouco intenso quando comparado ao dois anteriores.

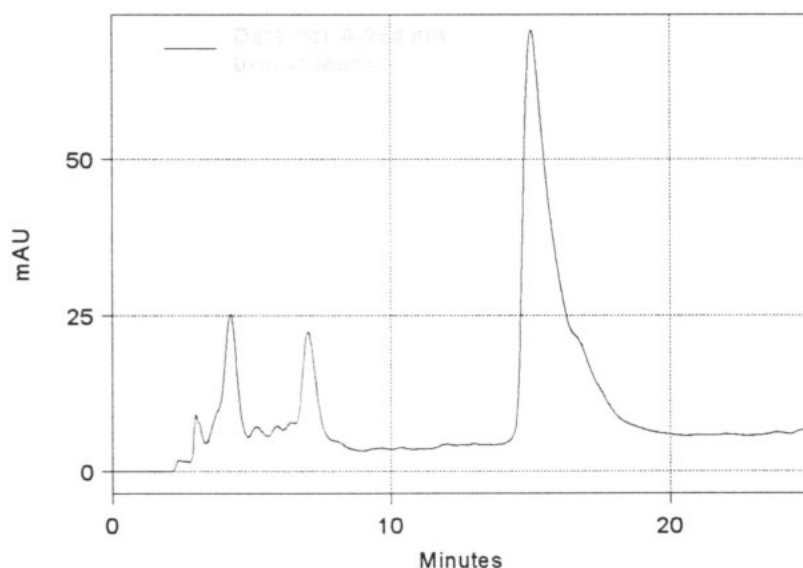


Figura 40 - CLAE-UV para a amostra de brotos

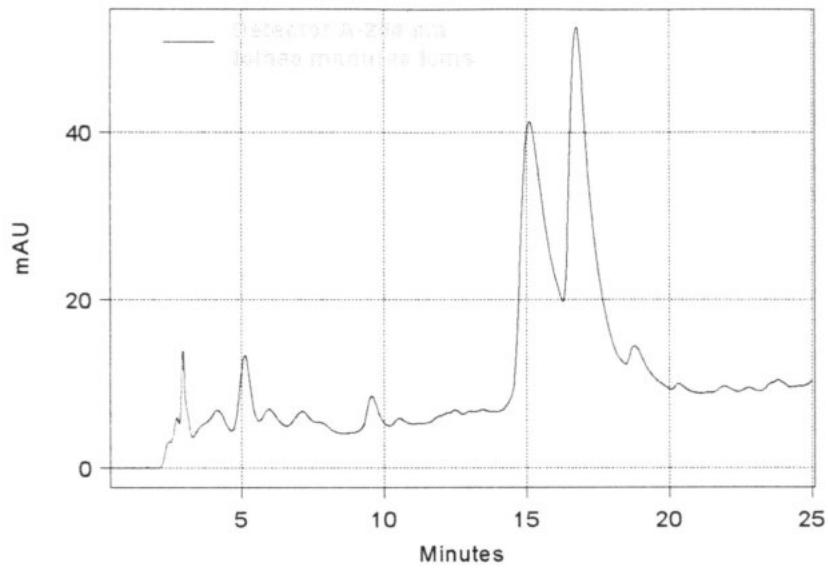


Figura 41 - CLAE-UV para a amostra de folhas maduras

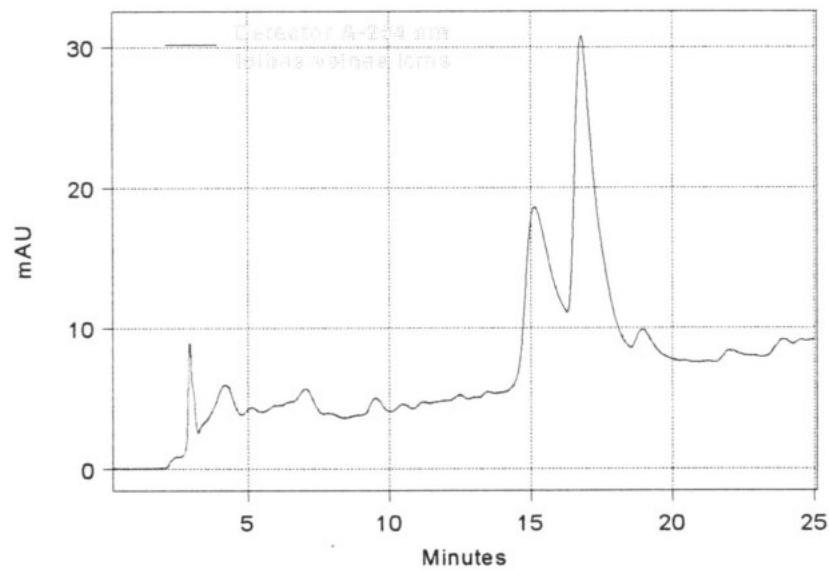


Figura 42 - CLAE-UV para a amostra de folhas senescentes

Através da análise dos espectros de massas (modo *electrospray* negativo) dos principais íons, foi possível observar que a amostra de brotos apresenta picos em m/z 463 e 300 na janela de 15,5 minutos; que nas amostras de folhas maduras e folhas senescentes aparecem estes mesmos picos nas janelas de 15,5 minutos e que nas janelas de 17,5 minutos aparecem picos em m/z 447 e 300 (Figura 43). A análise da janela de 19 minutos indica a presença de mistura de compostos.

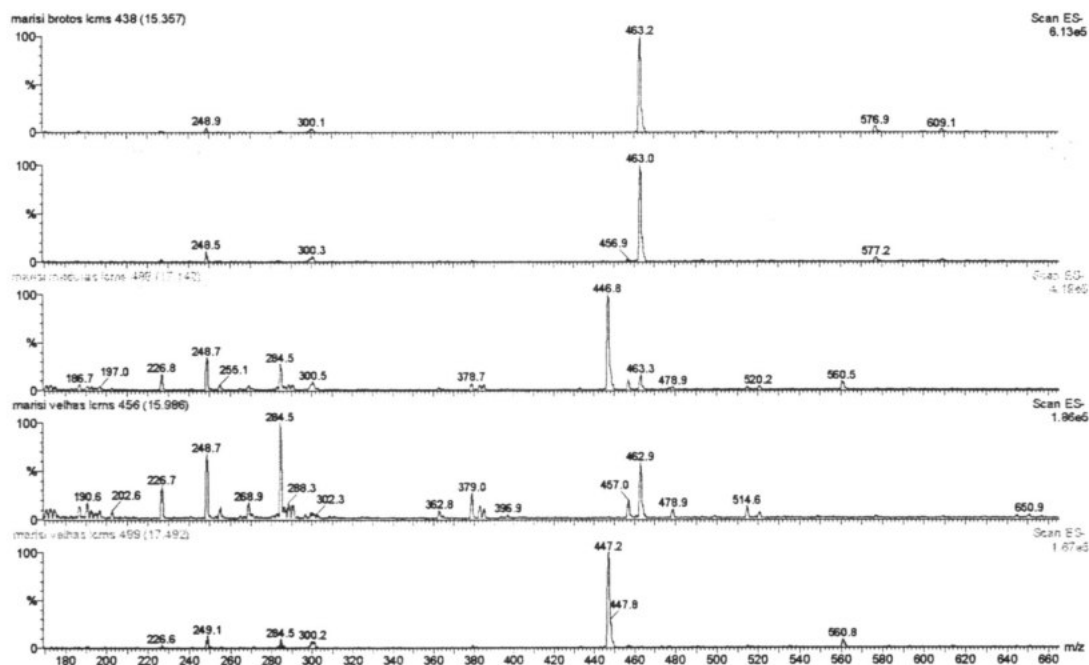


Figura 43- Espectro de massas dos principais picos apresentados nas janelas de 15,5 e 17,5 minutos para extratos de broto, folhas maduras e senescentes.

Como todos os flavonóides isolados anteriormente possuíam o mesmo esqueleto básico, cujo fragmento no espectro de massas registrado no modo negativo deve ser 300 Da (quercetina-R, M-R, onde R = H ou glicosídeo), obteve-se um cromatograma de íons selecionados, onde poderia se observar os compostos que apresentavam este fragmento (M-HR). A amostra dos brotos apresenta um sinal na região de 15,5 min no cromatograma de íons selecionados m/z 300 (Figura 44), enquanto que nas amostras de folhas maduras e senescentes observa-se dois sinais com esta relação de m/z , nos

tempos de retenção 15,5 e 17,5 min. Pode-se verificar, portanto, que a amostra de brotos apresenta um único flavonóide, nas condições de análise realizada, que gera o íon m/z 300, ao passo que as amostras de folhas maduras e folhas senescentes apresentam dois flavonóides que geram este íon, ou sejam devem possuir a mesma aglicona.

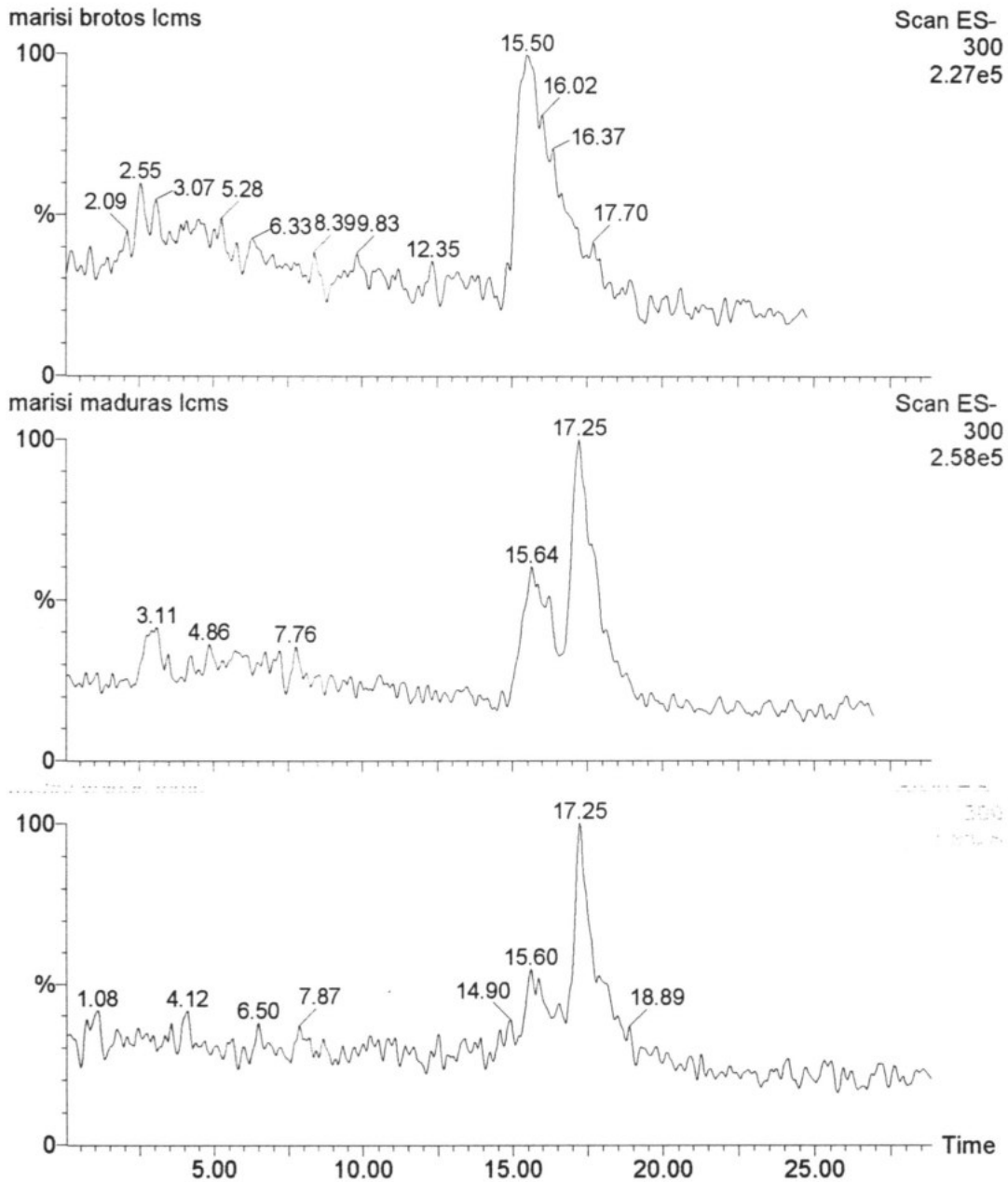


Figura 44 – Cromatograma de massas do íon m/z 300 para extratos de brotos, folhas maduras e senescentes.

Foi realizado um experimento de MS/MS dos íons pais de m/z 300 para se obter mais informações a respeito das estruturas dos flavonóides, ou seja quais os íons que geraram o íon m/z 300. Observou-se que são três íons: m/z 433, 447 e 463, que sofrem perda de parte de moléculas de açucares como: pentose, desoxiexose e hexose, originando mz 300 (Figura 45, exemplo para folhas maduras). O íon m/z 433 é muito pouco intenso e não foi observado nos espectros anteriores, devendo o composto que o da origem estar em muito baixa concentração no extrato.

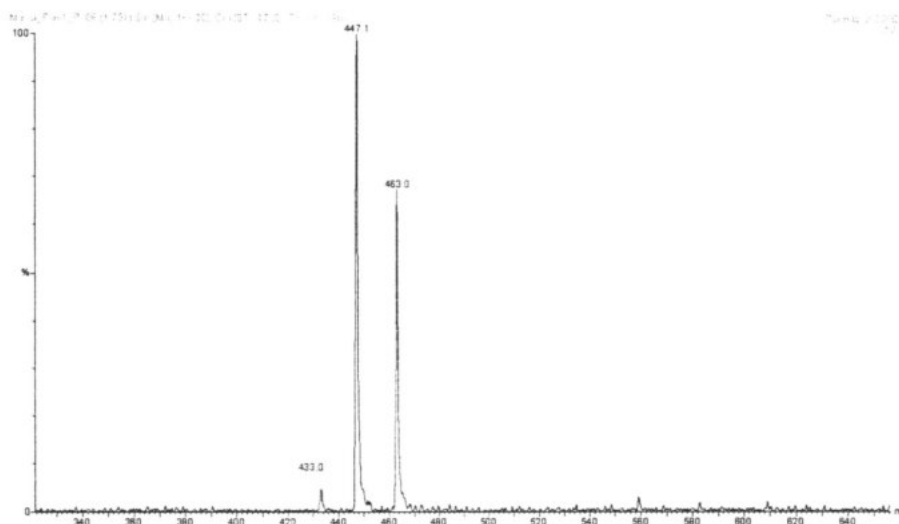


Figura 45 - Espectro de MS/MS dos íons pais de m/z 300.

O pico m/z 463 gera o pico m/z 300 perdendo parte de uma hexose ($C_6H_{11}O_5$, por exemplo parte de uma galactose ou glicose presentes nos compostos **3** e **4**).

Não foi possível analisar a fração com tempo de retenção de 19 min que se constituía em mistura e estava presente em baixa concentração.

Nas amostras de folhas maduras e folhas senescentes, existe o outro flavonóide, cujo EM mostra o íon m/z 447 no tempo de retenção 17,5 min. Este flavonóide também gera m/z 300, ou seja deve possuir a mesma aglicona que aquele com tempo de retenção 15,5 min e deve ter massa molecular de 448 Da. O pico m/z 447 que gera o m/z 300 é condizente com a perda de parte de uma desoxiexose ($C_6H_{11}O_4$, por exemplo Raminose). Esta substância deve

corresponder ao flavonóide **2**, isolado no trabalho de laboratório com as folhas maduras (item 5.1).

Através da análise dos espectros de RMN¹H dos extratos brutos dos brotos (Figura 46), em comparação com os dados de RMN¹H dos flavonóides **1-4**, Tabela 11, foi possível verificar que está presente predominantemente o flavonóide **4**, cujos dados de deslocamento químico do seu espectro são coincidentes com aqueles da Tabela 11 e estão ausentes os sinais de deslocamento químico dos demais flavonóides, ou os seus sinais se confundem com a linha de base. A mesma análise foi realizada para os extratos das folhas maduras e senescentes (Figuras 47-48, Tabela 11) e pode-se verificar a presença dos flavonóides **2** e **4**, com predominância nestas frações do flavonóide **2**. Os deslocamentos de **2** (setas simples) e **4** (setas duplas) estão indicados por seta nas Figuras.47-48. A não detecção de **3**, que possui sinais de deslocamento químico muito próximo de **4**, mas que tem o sinal de deslocamento químico de H-6 bem caracterizado em 6,08 δ esta ausente nos espectros ou o seu sinal se confunde com a linha de base. O flavonóide **3** ocorre na folhas maduras estudadas no capítulo 5.1, porém sua concentração naqueles extratos é a menor dentre os flavonóides isolados de *S. macrophylla*.

Tabela 11 – Dados de RMN¹H dos flavonóides **1 – 4**

H	1 (δ , mult., J = Hz)	2 (δ , mult., J = Hz)	3 (δ , mult., J = Hz)	4 (δ , mult., J = Hz)
OH	12,88 s	12,6 s	12,5 s	12,7
2'	7,66 s	7,36 d, 1, 3	7,42 d, 2,03	7,57 d, 2,2
6'	7,55 d 8,4	7,31 dd, 1, 3; 8,3	7,55 dd, 2,03; 8,50	7,72 dd, 1,8; 8,0
5'	6,89 d 8,4	6,92 d, 8,3	6,70 d, 8,50	6,86 d, 8,4
8	6,39 s	6,44 s	6,29 d, 1,80	6,45 d, 1,6
6	6,17 s	6,25 s	6,08 d, 1,80	6,24 d, 1,6
1''		5,31 s	5,25 d, 7,68	5,42 d, 7,6
2''		4,04 sl	3,00-3,70 m	3,20-3,80 m
3''		3,56 dd, 2,8; 8,7	3,00-3,70 m	3,20-3,80 m
5'' e 4''		3,24 m	3,00-3,70 m	3,20-3,80 m
Me		0,87 d, 5,7		

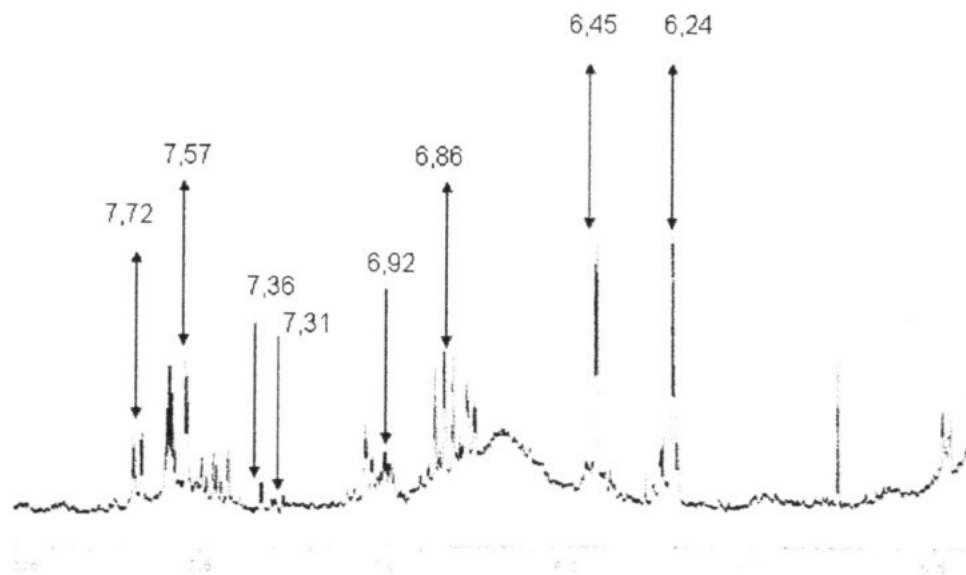


Figura 46- Ampliação do espectro de ^1H do extrato bruto de brotos de *S. macrophylla*, DMSO, 9.8 T.

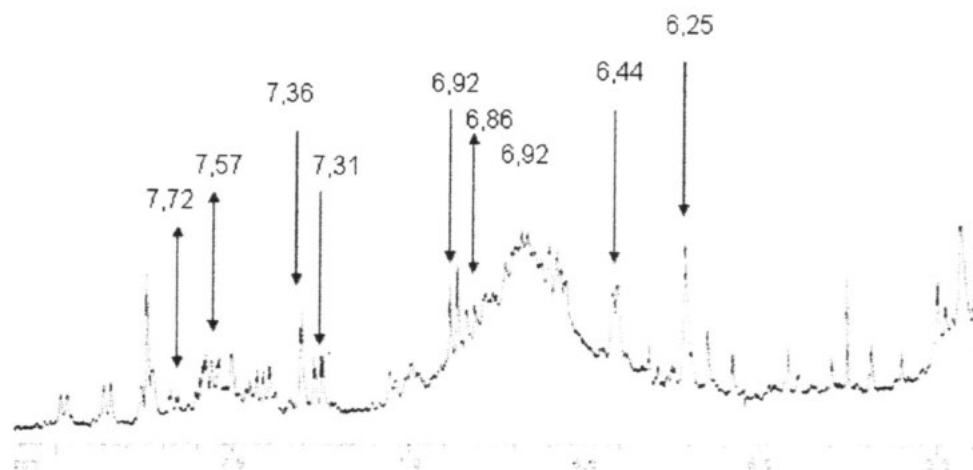


Figura 47- Ampliação do espectro de ^1H do extrato bruto de folhas maduras de *S. macrophylla*, DMSO, 9.8 T.

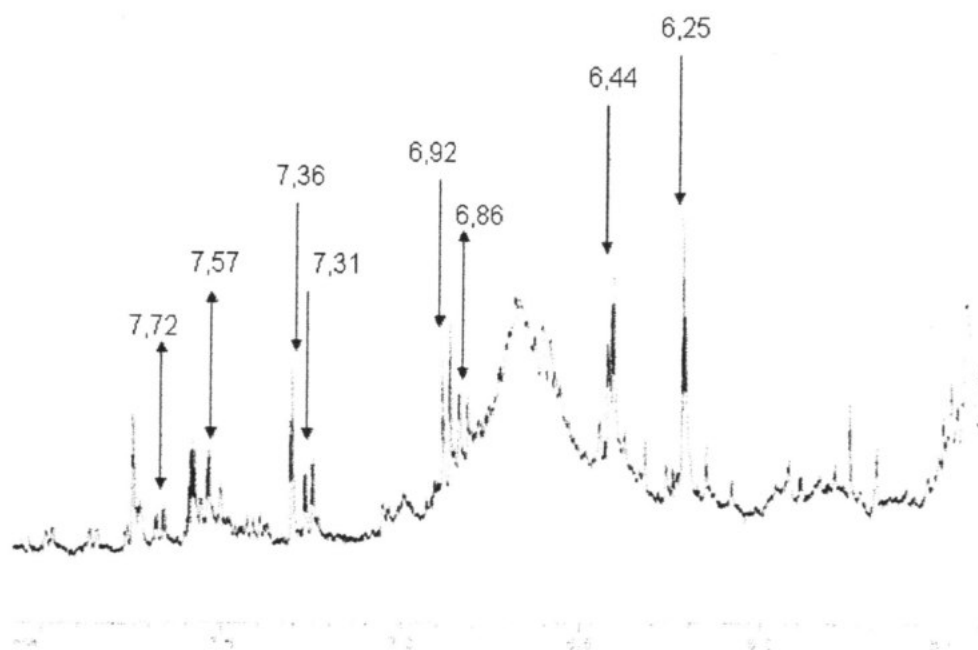


Figura 48 Ampliação do espectro de ^1H do extrato bruto de folhas velhas de *S. macrophylla*, DMSO, 400MHz

Com base neste estudo dos extratos de brotos, folhas maduras e folhas senescentes, verifica-se a presença apenas do flavonóide **4** (massa 464 D) nos brotos e sua concentração não deve ser suficiente para provocar toxicidade às lagartas. A presença dos outros flavonóides glicosilados poderia potencializar a sua atividade tóxica. Nas folhas maduras e senescentes, além deste flavonóide **4**, foi obtido o flavonóide **2** que também apresenta atividade tóxica às larvas de *H. grandella* (item 5.7).

5.4 Estudo comparativo entre componentes voláteis dos brotos e de brotos, folhas maduras e senescentes de *Swietenia macrophylla* utilizando CG-EM e EAG

5.4.1 – EAG- *Electroantennography*

Os estudos eletroantegráficos com os óleos voláteis obtidos dos brotos (folhas jovens), folhas maduras e folhas senescentes de *S. macrophylla* frente às antenas de *H. grandella* foram realizados com o intuito de avaliar a influência olfativa desses óleos no processo de seleção de partes da planta hospedeira, uma vez que o ataque ocorre apenas nos brotos.

A Figura 49 mostra, como exemplo, um conjunto de eletroantogramas obtidos para os óleos voláteis em diferentes concentrações, dos brotos, das folhas maduras e senescentes de mogno, quando aspergidos sobre as antenas de fêmeas. Nestes eletroantogramas, a resposta eletroantegráfica consiste em um pico acentuado com uma ascensão gradativa em formato de parábola. Isto corresponde ao processo de despolarização das células receptoras presentes nas sensilas das antenas dos insetos.

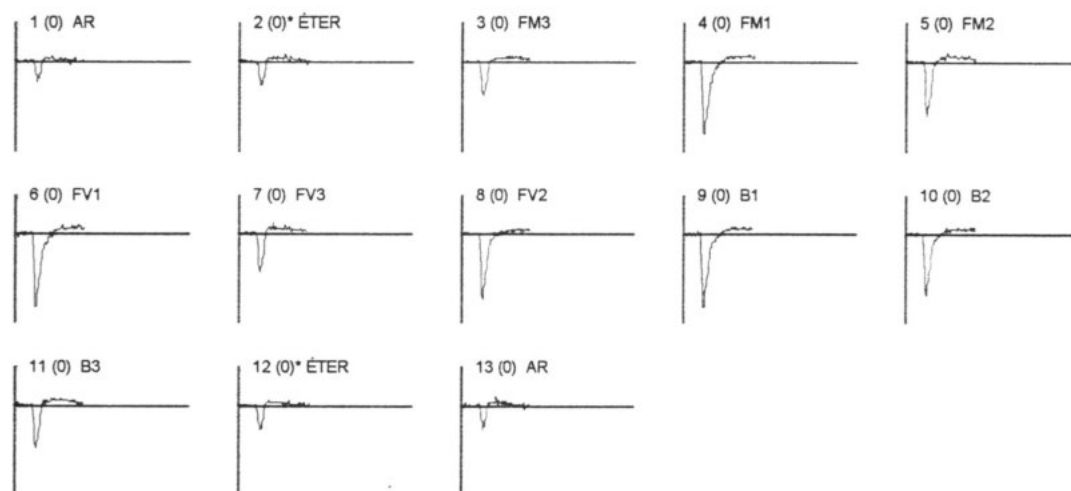


Figura 49 –Gráfico de experimentos de EAG com óleos voláteis de *Swietenia macrophylla*,

Ar (ar comprimido); éter (solvente das amostras); FM [óleo essencial de folhas maduras de mogno: 100,0 mg/mL (3); 10,0 mg/mL (2); 1,0 mg/mL (1)]. FV (óleo essencial de folhas senescentes de mogno: 100,0 mg/mL; 10,0 mg/mL; 1,0 mg/mL). B (óleo essencial de brotos de mogno: 100,0 mg/mL; 10,0 mg/mL; 1,0 mg/mL), Intensidade dada em mV.

5.4.2 Análise das respostas das antenas de machos de *H. grandella* relacionadas aos óleos voláteis de *S. macrophylla* (Mogno)

Foram utilizadas concentrações diferentes (100, 10, e 1mg/mL), na quantidade de 5µL no papel e aspergidas sobre as antenas em intervalo de 30 segundos após cada medida.

A Tabela 12 mostra as respostas em mV dos experimentos de eletroantenogramas utilizando antenas de machos de *H. grandella*.

Tabela 12 - Respostas eletroantegráficas das antenas de machos de *Hypsipylla grandella* para os óleos voláteis obtidos de mogno.

	Ar	Éter	FM1	FM2	FM3	FV1	FV2	FV3	B1	B2	B3	Éter
1	1.516	2.215	4.226	3.165	2.744	4.080	3.698	3.312	3.904	3.905	3.433	0.979
2	1.953	1.318	4.568	3.374	1.957	4.096	3.850	2.437	4.116	3.332	2.327	1.405
3	1.704	0.806	2.769	2.010	1.152	2.268	2.018	1.356	2.933	2.174	1.671	1.333
4	2.167	1.110	2.496	1.889	1.230	2.043	1.954	1.360	2.465	2.211	1.628	1.395
5	1.109	1.530	4.293	3.235	1.928	5.065	3.866	2.410	4.409	3.859	2.666	1.654
6	0.656	1.012	3.543	2.102	1.218	3.061	2.502	1.414	2.643	2.215	1.596	1.149
7	0.882	1.082	3.215	1.945	1.454	3.148	2.396	1.530	2.773	2.148	1.831	1.097
8	0.336	0.324	0.708	0.405	0.435	0.409	0.531	0.727	0.626	0.643	0.469	0.483
9	0.423	0.392	1.749	0.970	0.631	1.637	1.197	0.629	1.565	0.996	0.699	0.537
10	0.812	0.832	2.758	1.542	1.097	2.133	1.695	1.061	1.518	1.622	0.807	0.492
Médias	1.690	1.378	3.291	2.408	1.598	3.059	2.575	1.860	2.925	2.683	2.165	1.339

Ar (ar comprimido); éter (solvente das amostras); FM [óleo volátil de folhas maduras de mogno: 100,0 mg/mL (3); 10,0 mg/mL (2); 1,0 mg/mL (1)]. FV (óleo volátil de folhas senescentes de mogno: 100,0 mg/mL; 10,0 mg/mL; 1,0 mg/mL). B (óleo volátil de brotos de mogno: 100,0 mg/mL; 10,0 mg/mL; 1,0 mg/mL), Intensidade dada em mV.

O gráfico, Figura 50, mostra as médias das respostas dos eletroantenogramas obtidos com as antenas dos machos de *H. grandella*.

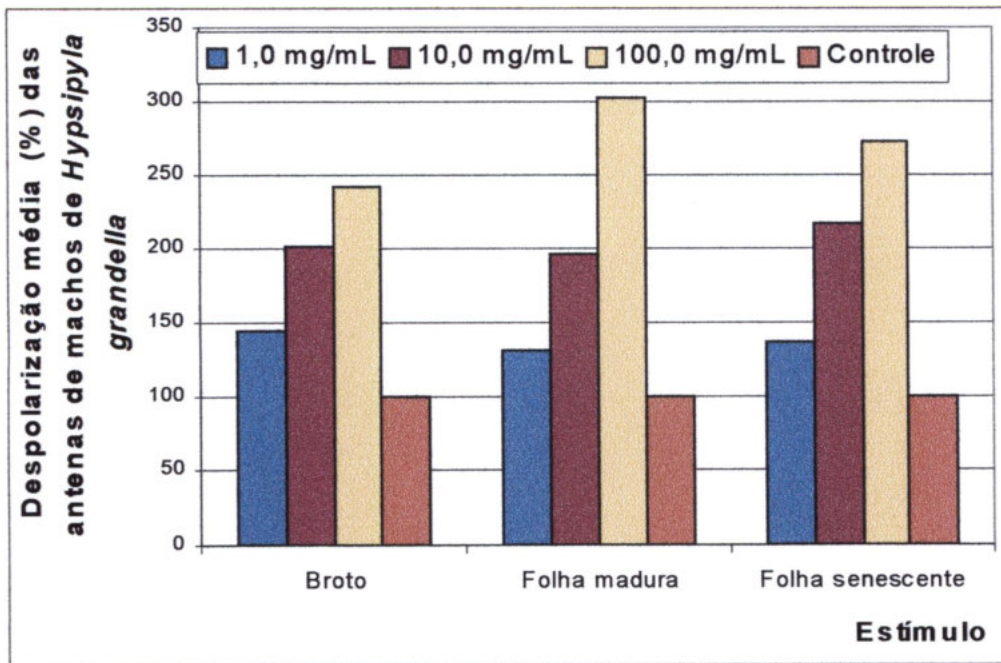


Figura 50 - Valores médios das porcentagens de respostas de machos de *H. grandella* aos óleos voláteis de *Swietenia macrophylla*.

Observando o gráfico (Figura 50) referente às antenas dos machos pode-se notar que há uma resposta maior para as folhas velhas e maduras que para os brotos, na concentração de 100 mg/mL, porém não há uma concordância com as demais concentrações, de 10 e 1 mg/mL, demonstrando que não há uma razão direta entre as respostas das antenas e os óleos voláteis. Isso leva a conclusão de que os brotos não emitem substâncias muito atraentes para os machos.

5.4.3 Análise das respostas das antenas de fêmeas de *H. grandella* relacionadas aos óleos voláteis de *S. macrophylla* (Mogno)

A Tabela 13 mostra as respostas em mV dos experimentos de eletroantenograma utilizando antenas de fêmeas de *H. grandella*.

O gráfico (Figura 51) mostra média das respostas dos eletroantenogramas obtidos com as antenas das fêmeas de *H. grandella*.

Tabela 13 - Respostas eletroantenográficas das fêmeas de *Hypsipyla grandella* para os óleos voláteis obtidos de mogno

	Ar	éter	FM1	FM2	FM3	FV1	FV2	FV3	B1	B2	B3	Éter	Ar
1	1.239	1.666	4.792	3.682	2.991	4.603	4.171	3.321	4.393	4.206	3.279	1.172	1.298
2	0.774	0.905	2.648	1.852	1.283	2.479	2.386	1.510	2.707	2.560	1.802	0.878	0.949
3	0.841	1.158	3.877	2.768	1.780	3.772	3.400	1.733	4.396	3.438	2.328	1.016	1.125
4	0.900	0.992	3.244	2.099	1.495	3.127	2.965	1.664	3.436	2.935	1.770	1.161	0.987
5	1.596	1.998	5.738	4.258	2.697	5.948	5.239	3.105	5.952	4.937	3.369	1.921	1.878
6	1.210	1.407	4.978	3.793	2.395	5.466	4.792	2.735	5.269	4.624	3.293	1.298	1.469
7	1.210	1.407	4.978	3.793	2.395	5.466	4.792	2.735	5.269	4.624	3.293	1.298	1.469
8	1.858	2.027	5.065	4.704	3.659	5.722	5.051	3.845	5.526	4.829	3.743	1.991	1.951
9	1.565	1.852	4.899	3.718	2.581	4.803	4.446	2.826	5.268	4.405	3.258	1.823	1.468
10	1.173	1.410	3.664	2.947	2.012	4.249	3.321	2.317	4.335	3.700	2.558	1.463	1.443
Médias	1.407	1.616	4.388	3.361	2.329	4.564	4.056	2.579	4.655	4.026	2.869	1.460	1.513

Ar (ar comprimido); éter (solvente das amostras); FM [óleo volátil de folhas maduras de mogno: 100,0 mg/mL (3); 10,0 mg/mL (2); 1,0 mg/mL (1)]. FV (óleo volátil de folhas senescentes de mogno: 100,0 mg/mL; 10,0 mg/mL; 1,0 mg/mL). B (óleo volátil de brotos de mogno: 100,0 mg/mL; 10,0 mg/mL; 1,0 mg/mL), Intensidade dada em mV.

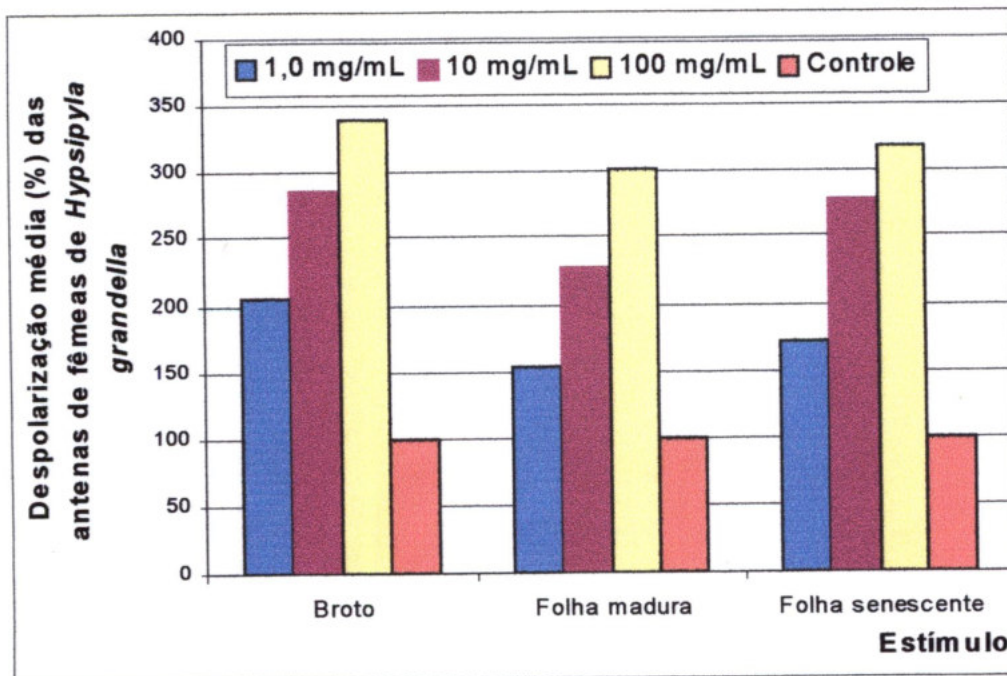


Figura 51 - Valores médios das porcentagens de respostas de fêmeas de *H. grandella* aos óleos voláteis de *Swietenia macrophylla*.

Observando o gráfico (Figura 51) referente às respostas das antenas das fêmeas, pode-se notar que há uma resposta maior para o óleo referente aos brotos que para os demais óleos, sendo que esta afirmação é verdadeira para todas as concentrações. Isso leva a inferir que, provavelmente, as substâncias constituintes do óleo volátil sejam atraentes para ovoposição e alimentação das fêmeas, uma vez que os ovos são depositados nos brotos e eles são os mais atacados.

A Figura 52 apresenta uma comparação gráfica dos ensaios com antenas de machos e fêmeas de *H. grandella* sob a ação dos óleos voláteis de diferentes partes de *S. macrophylla*.

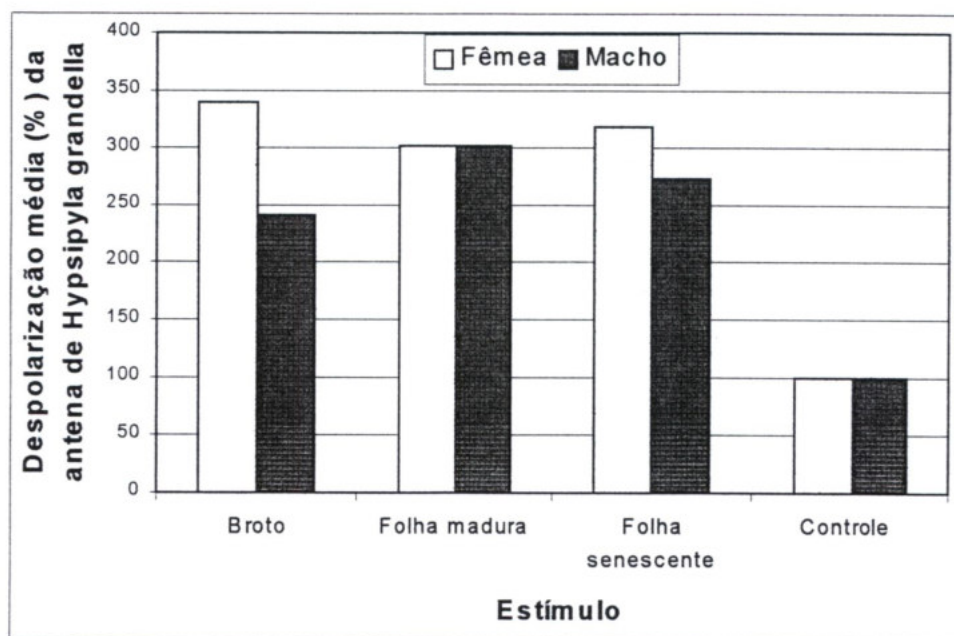


Figura 52 - Valores médios das porcentagens respostas de fêmeas e machos de *H. grandella* aos óleos voláteis de *Swietenia macrophylla*.

5.4.4. Respostas dos Experimentos de eletroantenograma-GC-EAD

5.4.4.1 Gas Chromatography - Electroantenna Detection

O objetivo de experimentos de CG-EAD é obter a(s) substância(s) responsável (eis) pela resposta apresentada no EAG, pois nos experimentos mostrados anteriormente, observa-se que o óleo apresenta resposta variando com a sua quantidade, porém não se pode inferir nada a respeito de quais

substâncias tem ação sobre a antena. No CG-EAG pode-se analisar a resposta para cada substância eluída durante o desenvolvimento da cromatografia.

Em geral as repostas podem ser muito boas quando se trata de misturas de poucas substâncias. No caso de óleos voláteis, devido a fato dos mesmos poderem apresentar uma gama variada de substâncias, e algumas vezes ser difícil a identificação das mesmas, pelo fato da concentração delas serem muito pequenas, ou em outros casos a antena responde a um conjunto de substâncias, pode-se não chegar a determinar qual ou quais as substâncias que tem ação sobre a interação inseto-planta.

Na Figura 53, onde é mostrado um experimento com óleo volátil de brotos de mogno (0,1 mg/mL) em antena de macho de *Hypsipyla grandella* (segunda escotofase), observa-se que houve uma resposta intensa da antena, porém como a concentração da substância é muito baixa, foi impossível identificar a mesma.

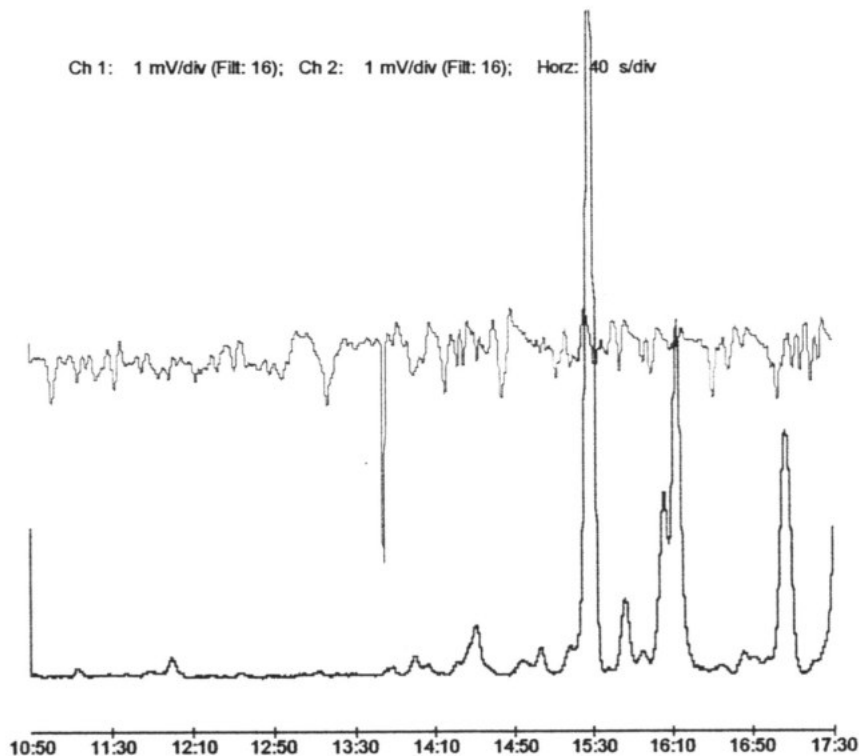


Figura 53 – Resposta eletroantegráfica do óleo volátil de brotos de Mogno (0,1 mg/mL) em antena de macho de *Hypsipyla grandella* (segunda escotofase)

A Figura 54 mostra a resposta eletroantenográfica do óleo essencial de folhas maduras de Mogno (0,1 mg/mL) em antena de fêmea de *Hypsipyla grandella* (segunda escotofase). Pode-se observar neste experimento a resposta de um experimento de EAD, onde foi possível propor a estrutura do β -cariofileno (= E-Cariofileno), como provável responsável pela atividade apresentada pelo óleo volátil.

Ch 1: 0.5 mV/div (Filt: 16); Ch 2: 5 mV/div (Filt: 16); Horz: 30 s/div

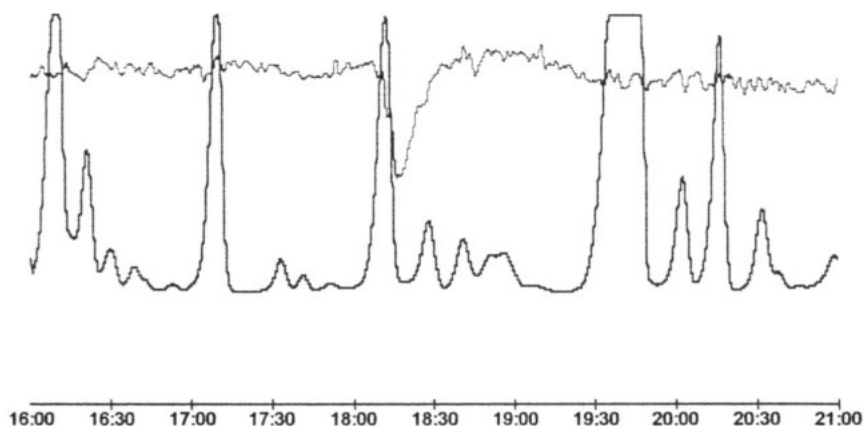
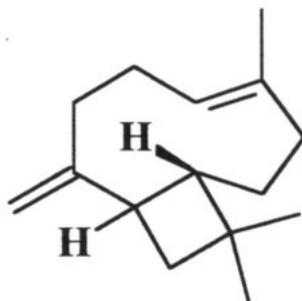


Figura 54 - Resposta do óleo essencial de folhas maduras de Mogno (0,1 mg/mL) em antena de fêmea de *Hypsipyla grandella* (segunda escotofase)



β -Cariofileno (= E-Cariofileno)

A Figura 55 mostra duas repostas para antena de fêmea de *H. grandella*, porém com o mesmo problema de baixa concentração das substâncias no óleo volátil e, assim, foi impossível neste experimento, propor estruturas para as substâncias responsáveis por estas repostas.

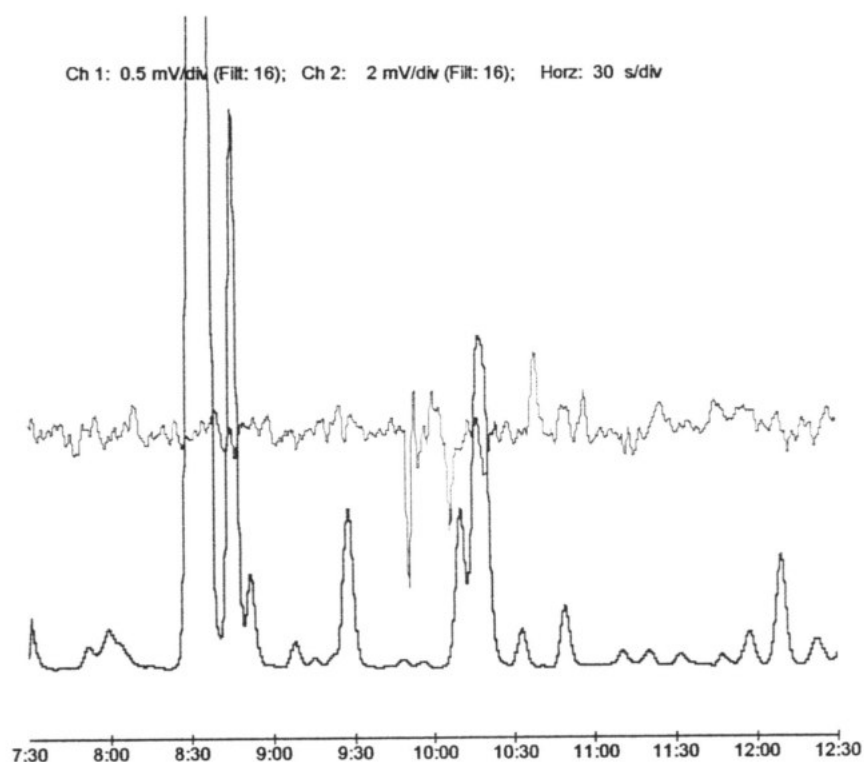


Figura 55- Resposta do óleo volátil de folhas maduras de Mogno (0,1 mg/mL) em antena de fêmea de *Hypsipyla grandella* (segunda escotofase)

Nos experimentos realizados com antenas de machos não houve repostas, como mostrado na Figura 56, para os óleos voláteis de mogno.

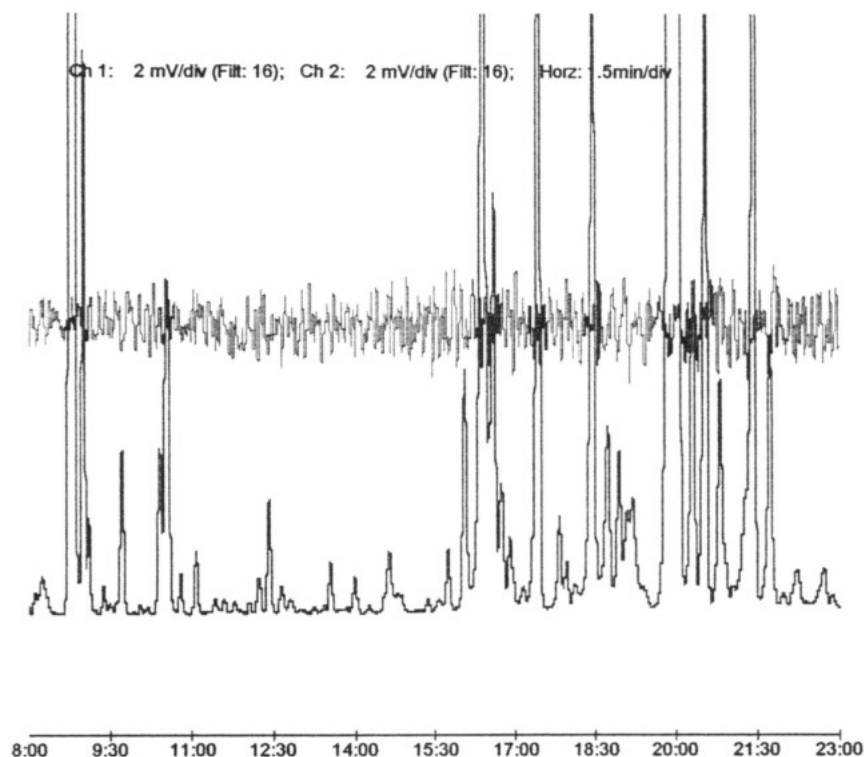


Figura 56 Resposta do óleo volátil de folhas maduras de Mogno (0,1 mg/mL) em antena de macho de *Hypsipyla grandella* (segunda escotofase)

5.4.5 Análise do óleo essencial dos brotos, folhas maduras e senescentes de *S. macrophylla*

A Tabela 14 mostra as substâncias presentes nos brotos, folhas maduras e senescentes de *S. macrophylla* (mogno), identificadas através de CG/EM – índice de Kovats, assim como as concentrações relativas de cada uma delas na mistura.

A Tabela 15 apresenta as substâncias que foram comuns aos três óleos voláteis. Através da análise das Tabelas 14-15 pode-se inferir que, apesar de algumas substâncias serem coincidentes, inclusive na concentração, sendo que cerca de 50% de todos os óleos são constituídos pela mesma substância, existem substâncias diferenciadas entre estes óleos, e provavelmente, estas apresentem efeito atrativo sobre os insetos em questão. Pode-se observar também que os brotos apresentaram uma maior diversidade de componentes, seguido pelas folhas maduras e por fim, as folhas senescentes, o que pode ser

coerente com a maior produção de substâncias voláteis nos brotos e possivelmente estas substâncias atrairiam as mariposas.

Tabela 14 - Substâncias identificadas nos brotos, folhas maduras e senescentes de *S. macrophylla*, índice de Kovats (obtidos e literatura) e as porcentagens relativas das mesmas nos óleos voláteis estudados

Substâncias	IR	Brotos % (IK)	Folhas maduras % (IK)	Folhas senescentes % (IK)
α -Copaeno	1376	3.31(1379)		
β -Bourboneno	1384		2.03 (1386)	1.13 (1382)
β -Cubebeno	1390	0.56 (1393)		2.10 (1386)
β -Elemeno	1391	0.66 (1395)		
β -Cariofileno	1418	0.80 (1421)	6.49 (1421)	
β -Gurjuneno	1432	0.47 (1431)		
N.I. Sesquiterpeno PM 204			2.61 (1436)	
<i>Allo</i> -Aromadendreno	1461	0.27 (1463)		
γ -Himachaleno	1476	0.93 (1482)	Tr (1479)	0.79 (1480)
D-Germacreno	1480	66.54 (1487)	59.99 (1485)	58.50 (1485)
β -Ionono	1485		1.19 (1486)	
<i>Epi</i> -Cubebol	1493	0.26 (1495)		
Germacreno A	1503	6.89 (1502)	5.29 (1499)	4.68 (1502)
α -Bisaboleno	1504	1.18 (1504)		
β -Bisaboleno	1509	0.59 (1509)		
γ -Bisaboleno	1515		1.56 (1514)	
7- <i>epi</i> - α -Selineno	1517	0.71 (1519)		0.66 (1519)
Cadina-1,4-dieno	1532	3.43 (1529)	2.00 (1529)	2.28 (1529)
Ledol	1568		1.60 (1568)	
Globulol	1582		2.93 (1582)	
<i>Epi</i> - α -Muurolol	1641	1.78 (1645)		
α -eudesmol	1652	0.43 (1651)		
7- <i>epi</i> - α -eudesmol	1658	1.74 (1659)		1.62 (1659)
N.I.			2.40 (1721)	2.28 (1721)
N.I.			0.61 (1897)	2.25 (1897)
N.I.			1.82 (1902)	3.87 (1902)
Ac. Hexadecanóico		5.69 (1973)	1.76 (1973)	13.70 (1973)
Hexadecanoato de Etila	1993	3.76 (2003)	7.72 (2003)	6.14 (2003)

N.I. = Não identificado; IK = Índice de Kovats calculado; IR = Índice de Retenção - Adams

Tabela 15- Substâncias comuns aos óleos voláteis dos brotos, folhas maduras e senescentes de *S. macrophylla*, índice de Kovats (obtidos e literatura) e as porcentagens relativas das mesmas.

Substâncias	IR	Brotos (%)	Folhas maduras (%)	Folhas senescentes (%)
γ -lmaschameno	1476	0,96	Traços	0,79
Germacreno-D	1480	66,54	59,99	58,50
Germacreno-A	1530	6,89	5,29	4,68
Cadina-1,4-dieno	1532	3,43	2,00	2,28
Ac. Hexadecanóico	1973	5,69	1,76	13,70
Hexadecanoato de etila	1993	3,76	7,72	6,14

5.5 Estudo comparativo entre componentes dos óleos voláteis de *Swietenia macrophylla* de diferentes procedências utilizando CG-EM

A observação em campo (Tabela 16, EVARISTO TEREZO, comunicação pessoal) de que árvores oriundas de diferentes locais do país e plantadas sob as mesmas condições, apresentavam diferenciadas porcentagens de ataques por *H. grandella*, levou ao estudo dos óleos voláteis destas amostras de diferentes procedências, tendo como hipótese que o ataque a *H. grandella* é orientado pelos voláteis emitidos pela mesma. As árvores de diversas procedências foram plantadas na fazenda ao longo do tempo, existem procedências mais antigas e mais recentes, portanto as idades das árvores variam com o tempo em que a procedência foi introduzida no experimento, os dados estão na Tabela 16.

Tabela 16. Dados de observações de ataques a mognos de diferentes regiões plantados na Fazenda Tramontina, em Aurora do Pará, PA .

Procedência	Tempo de plantio das árvores no campo	Nº total de árvores	Nº de árvores atacadas	Ataque %
Santarém (PA)	11	24	8	33,3
Juína (MT)	11	5	2	40,0
Morada do Sol (PA)	5	50	40	80,0
Urueu-uau-uau (RO)	5	137	112	81,7
Vila Progresso (PA)	2	10	9	90,0

A partir destes dados pode-se verificar que os mognos com origem em Santarém (PA, 33,3 % de ataques), seguidos pelos de Juína (MT, 40 % de ataques) são os mais resistentes ao ataque de *H. grandella*. Os mognos de origem Morada do Sol (Pa, 80,0 % de ataques), Urueu-uau-uau (RO, 81,7 % de ataques) e Vila Progresso (PA, 90,0 % de ataques) são os menos resistentes.

Os resultados das identificações realizadas com os óleos voláteis de diferentes procedências constam das Tabelas 17-21.

A Tabela 22 contém a relação dos constituintes coincidentes em pelo menos três óleos essenciais de *S. macrophylla* de diferentes origens e vinte

compostos aparecem em pelo menos três óleos, sendo que seis compostos estão presentes em todos as procedências. Destes seis, Germacreno-D é o constituinte mais abundante em todos os óleos, seguido por Biciclogermacreno. Estes dois compostos não devem estar relacionados com a susceptibilidade ou resistência ao ataque de *H. grandella*, já que a concentração de Germacreno-D é muito semelhante em todos os óleos, com exceção no óleo de Castelo dos Sonhos, que tem a mesma susceptibilidade ao ataque que os mognos de Urueu e V. Progresso, e Biciclogermacreno tem concentração irregular em todos os óleos voláteis.

Através da análise dos constituintes que estão presentes nos óleos voláteis com porcentagem relativa acima de 1% (Tabela 23), verifica-se predominância nos óleos voláteis de sesquiterpenos. Esta característica também não justifica a diferença de susceptibilidade dos brotos a ataque de *H. grandella*, pois ela ocorre para todos óleos analisados.

Através da análise da Tabela 24, que apresenta todas as substâncias presentes nos óleos voláteis independente de suas concentrações, verifica-se que os óleos voláteis de Santarém e os de Vila Progresso, que tem susceptibilidade opostas, contém número significativo de monoterpenos que não são coincidentes entre os óleos, mas estes estão ausentes no óleo essencial de Juína, cujos brotos sofrem ataque por *H. grandella* na mesma proporção daqueles dos brotos de Santarém.

Assim, o fato das constituições dos óleos voláteis se mostrarem diferentes, tanto quanto à proporção entre seus principais componentes, quanto à diversidade de constituintes, pode-se concluir que a partir dos dados obtidos, que objetivava encontrar o(s) responsável (eis) pela intensidade de ataque de *H. grandella* em árvores de diferentes procedências, não foi conclusivo. A partir deste estudo pode-se verificar, também, que a constituição dos óleos voláteis varia com a origem das sementes que geraram os mognos estudados e permite inferir que os constituintes fixos também devem ter variações. Estas observações permitem sugerir outras metodologias de estudos para compostos mais voláteis usando micro extração em fase sólida, ou o estudo de componentes fixos, tais como os flavonóides que estão presentes nas folhas e/ou outros constituintes majoritários das mesmas.

Tabela 17 – Componentes do óleo volátil de brotos de procedência de Santarém

IK Calculado	IR Adams	Nome da substância	Porcentagem
964	PM 136	N.I. Monoterpeno	0,05
970	976	Sabineno	0,02
989	PM 138	N.I. Monoterpeno	0,35
1023	1031	Limoneno	0,33
1041	1040	(Z)- β -Ocimeno	0,01
1050	1050	(E)- β -Ocimeno	0,01
1080	PM 136	N.I. Monoterpeno	0,01
1215	PM 152	N.I. Monoterpeno	0,04
1222	PM 152	N.I. Monoterpeno	0,04
1302	1291	(E,Z)-2,4-Decadienal	0,09
1362	1368	Ciclosativeno	0,36
1377	1376	α -Copaeno	0,06
1391	1390	β -Cubebeno	4,91
1405	1409	α -Gurjuneno	1,40
1418	1418	β -Cariofileno	1,23
1442	1432	β -Gurjuneno	1,15
1448	1460	(cis)-Muurolo4(14)-5-dieno	0,32
1462	PM 202	N.I. Sesquiterpeno	0,92
1471	1467	(E)-9-epi-Caryophylleno	1,59
1499	1480	Germacreno-D	44,06
1509	1494	Biciclogermacreno	11,11
1515	1503	Germacreno-A	1,57
1523	1513	γ -Cadineno	1,98
1533	1524	δ -Cadineno	5,22
1539	1532	Cadina-1,4-dieno	0,43
1544	1538	α -Cadineno	0,54
1568	PM 204	N.I. Sesquiterpeno	0,34
1589	PM 204	N.I. Sesquiterpeno	0,71
1627	1627	1-epi-Cubenol	0,39
1642	1640	Epi- α -Cadinol	2,93
1654	PM 204	N.I. Sesquiterpeno	2,39
1686	PM 220	N.I. Sesquiterpeno	0,11
1763	PM 220	N.I. Sesquiterpeno	0,09
1913	1927	Hexadecanoato de metila	0,52
1973	1993	Hexadecanoato de etila	0,23
2035	PM 272	N.I. Diterpeno	0,04

Porcentagem total dos identificados = 85,55; Não identificados = 14,45

Tabela 18 – Componentes do óleo volátil de brotos de procedência de Juína

IK Calculado	IR Adams	Nome da substância	Porcentagem
1315	1314	(E,E)-2,4-Decadienal	0,34
1335	1339	δ -Elemeno	0,19
1348	1351	α -Cubebeno	0,44
1374	1372	α -Ylangeno	4,73
1382	1384	β -Bourboneno	0,51
1390	1390	β -Elemeno	1,52
1418	1418	β -Cariofileno	1,40
1427	1432	β -Gurjuneno	0,74
1434	PM 204	N.I. Sesquiterpeno	0,54
1449	PM 204	N.I. Sesquiterpeno	1,07
1459	1461	Allo-Aromadendreno	1,79
1484	1480	Germacreno-D	46,83
1497	1494	Biciclogermacreno	8,26
1505	1504	Germacreno-A	1,29
1515	1513	γ -Cadineno	3,32
1524	1524	δ -Cadineno	4,70
1537	1538	α -Cadineno	0,12
1589	PM 204	N.I. Sesquiterpeno	0,18
1615	PM 204	N.I. Sesquiterpeno	1,12
1626	1627	1-epi-cubenol	1,01
1641	1641	Epi- α -Cadinol	2,04
1685	PM 204	N.I. Sesquiterpeno	0,36
1928	1927	Hexadecanoato de metila	1,74
2053	PM 272	N.I. Diterpeno	0,10
2096	2092	Linoleato de metila	0,50
2129	2128	Octadecanoato de metila	0,11

Porcentagem total dos identificados = 84,95; Não identificados = 15,05%

Tabela 19 – Componentes do óleo volátil de brotos de procedência de Morada do Sol

IK Calculado	IR Adams	Nome da substância	Porcentagem
971	1011	δ -3-Careno	0,28
1316	1314	(E)-2,4-Decadienal	0,28
1349	1351	α -Cubebeno	0,30
1375	1376	α -Copaeno	3,38
1384	1384	β -Bourboneno	0,69
1388	1390	β -Cubebeno	1,15
1418	PM 204	N.I. Sesquiterpeno	0,79
1429	1432	β -Gurjuneno	1,01
1453	1454	α -Humuleno	0,21
1481	1480	Germacreno-D	12,60
1494	1494	Biciclogermacreno	2,32
1502	1502	Germacreno-A	2,57
1515	1513	γ -Cadieneno	2,67
1524	1521	Cis-Calameneno	1,74
1540	1532	Trans-Calameneno	1,30
1576	1576	Espatuleno	4,07
1606	1606	Epóxido de Humuleno II	0,68
1626	1627	1-epi-cubenol	0,78
1640	1641	Epi- α -cadinol	6,79
1654	PM 204	N.I. Sesquiterpeno	4,98
1669	1682	cis-14-Murolol-5-en-4-ona	1,96
1928	1927	Hexadecanoato de metila	2,33

Porcentagem total dos identificados = 53,38; Não identificados = 46,62

Tabela 20 – Componentes do óleo volátil de brotos de procedência de Urueu-uau-uau (RO)

IK Calculado	IR Adams	Nome da substância	Porcentagem
1025	1031	Limoneno	2,21
1042	1040	Z- β -Ocimeno	0,22
1051	1062	γ -Terpineno	0,24
1168	1170	Pinocamfeol	0,48
1174	1177	Terpin-4-ol	0,17
1315	1314	(E-E)-2-4-Decadienal	0,29
1348	1351	α -Cubebeno	0,26
1356	1356	Eugenol	0,21
1374	1372	α -Ylangeno	2,69
1382	1384	β -Bourboneno	0,23
1388	1390	β -Cubebeno	0,62
1418	1418	β -Cariofileno	1,03
1427	1432	β -Gurjuneno	0,67
1452	1454	α -Humuleno	0,33
1459	1461	Allo-Aromadendreno	0,92
1481	1480	Germacreno-D	40,61
1496	1494	Biciclogermacreno	8,34
1501	1499	α -Muuroleno	2,46
1514	1513	γ -Cadineno	1,57
1524	1524	δ -Cadineno	3,52
1532	1532	Cadina-1,4-dieno	0,21
1537	1538	α -Cadineno	0,27
1575	1576	Espatuleno	0,49
1581	PM 204	N.I Sesquiterpeno	0,61
1589	PM204	N.I Sesquiterpeno	0,82
1685	PM 220	N.I Sesquiterpeno	0,22
1929	1927	Hexadecanoato de metila	0,59
1996	1993	Hexadecanoato de etila	2,72
2096	2092	Linoleato de metila	0,68
2114	2221	Acetato de Z-Fitol	2,41

Porcentagem total dos identificados = 76,09; Não identificados = 23,91

Tabela 21 – Componentes do óleo volátil de brotos de procedência de Vila Progresso

IK Calculado	IR Adams	Nome da substância	Porcentagem
931	926	Triciclono	0,19
957	961	Benzaldeido	0,10
970	976	Sabineno	0,16
990	PM 138	N.I. Monoterpeno	3,51
1014	1007	Isosilvestreno	0,07
1024	1031	Limoneno	2,99
1037	1040	Z- β -Ocimeno	0,27
1042	1043	Fenilacetaldedo	0,10
1051	1050	E- β -Ocimeno	0,20
1058	1065	Acetofenona	0,09
1168	1170	Pinocanfeol	1,20
1173	1177	4-Terpinol	0,13
1219	PM 152	N.I. Monoterpeno	0,36
1298	PM 186	nonanoato de etila	0,32
1315	1314	(E,E)-2,4-decadienal	0,55
1348	1351	α -cubebeno	0,42
1374	1372	α -Ylangeno	0,90
1382	1384	β -Bourboneno	0,45
1388	1390	β -Cubebeno	1,10
1396	1409	α -Gurjuneno	0,32
1418	PM 204	N.I. Sesquiterpeno	0,88
1427	1432	β -Gurjuneno	0,70
1480	1477	γ -Gurjuneno	0,58
1482	1480	Germacreno-D	45,66
1487	1485	β -Ionono	0,65
1491	1491	Valence	0,46
1496	1494	Biciclogermacreno	4,54
1500	1499	α -Muuroleno	0,65
1504	1503	Germacreno-A	0,80
1514	1513	γ -Cadineno	0,62
1524	1524	δ -Cadineno	1,24

Porcentagem total dos identificados = 70,21; Não identificados= 29,79

Tabela 22 - Compostos coincidentes em pelo menos três óleos voláteis de *S. macrophylla* de diferentes origens

Substâncias	Santarém	Juina	Morada do Sol	Urueu	V. Progresso
Limoneno	0,33			2,21	2,99
Z- β -Ocimeno	0,01			0,22	0,27
(E-E)-2-4-Decadienal		0,34	0,28	0,29	0,55
α -Cubebeno		0,44	0,30	0,26	0,42
α -Ylangeno		4,73		2,69	0,90
β -Bourboneno		0,51	0,69	0,23	0,45
β -Cubebeno	4,91	1,52	1,15	0,62	1,10
Sesquiterpeno PM 204	1,23	1,40	0,79	1,03	0,88
β -Gurjuneno	1,15	0,74	1,01	0,67	0,70
Germacreno-D	44,06	46,83	12,60	40,61	45,66
Biciclogermacreno	11,11	8,26	2,32	8,34	4,54
Germacreno-A	1,57	1,29	2,57		0,80
γ -Cadineno	1,98	3,32	2,67	1,57	0,62
δ -Cadineno	5,22	4,70		3,52	1,24
α -Cadineno	0,54	0,12		0,27	
Sesquiterpeno PM 204	0,71	0,18		0,82	
1-epi-cubenol	0,39	1,01	0,78		
Epi- α -Cadinol	2,93	2,04	6,79		
Sesquiterpeno PM 220	0,11	0,36		0,22	
Hexadecanoato de metila	0,52	1,74	2,33	0,59	

Tabela 23 - Principais componentes dos óleos voláteis de brotos de *S. macrophylla* (Concentração superior a 1%)

Substâncias	Santa-rém	Juina	Morada do Sol	Urueu	V. Progresso
N.I. Monoterpeno PM 138					3,51
Limoneno				2,21	2,99
Pinocanfeol					1,20
α -Ylangeno		4,73		2,69	
α -Copaeno			3,38		
β -Cubebeno	4,91	1,52	1,15		1,10
α -Gurjuneno	1,40				
N.I. Sesquiterpeno PM 204	1,23	1,40		1,03	
β -Gurjuneno	1,15		1,01		
N.I. Sesquiterpeno PM 204		1,07			
Allo-Aromadendreno		1,79			
(E)-9-epi-Cariophileno	1,59				
Germacreno-D	44,06	46,83	12,60	40,61	45,66
α -Muuroleno				2,46	
Biciclogermacreno	11,11	8,26	2,32	8,34	4,54
Germacreno-A	1,57	1,29	2,57		
γ -Cadineno	1,98	3,32	2,67	1,57	
Cis-Calameneno			1,74		
δ -Cadineno	5,22	4,70		3,52	1,24
Trans-Calameneno			1,30		
Espatuleno			4,07		
N.I. Sesquiterpeno PM 204		1,12			
1-epi-cubenol		1,01			
Epi- α -Cadinol	2,93	2,04	6,79		
N.I. Sesquiterpeno PM 204	2,39		4,98		
cis-14-Murolo-5-en-4-ona			1,96		
Hexadecanoato de metila		1,74	2,33		
Hexadecanoato de etila				2,72	
Acetato de Z-Fitol				2,41	

Tabela 24 – Componentes gerais presentes nos óleos voláteis de brotos de *S. macrophylla* de diferentes origens

Substância	Santa-rém %	Juína %	Morada do Sol	Urueu %	V. Progresso %
Triciclono					0,19
Benzaldeido					0,10
N.I. Monoterpeno PM 136	0,05				
Sabineno	0,02				
Sabineno					0,16
N.I. Monoterpeno PM 138	0,35				3,51
Isosilvestreno					0,07
δ -3-Careno			0,28		
Limoneno	0,33			2,21	2,99
Z- β -Ocimeno	0,01			0,22	0,27
Fenilacetaldéido					0,10
(E)- β -Ocimeno	0,01				0,20
γ -Terpineno				0,24	
Acetofenona					0,09
N.I. Monoterpeno PM 136	0,01				
Pinocamfeol				0,48	1,20
Terpin-4-ol				0,17	0,13
N.I. Monoterpeno PM 152	0,04				0,36
N.I. Monoterpeno PM 152	0,04				
nonanoato de etila PM 186					0,32
(E,Z)-2,4-Decadienal	0,09				
(E,E)-2,4-Decadienal		0,34	0,28	0,29	0,55
δ -Elemeno		0,19			
α -Cubebeno		0,44	0,30	0,26	0,42
Eugenol				0,21	
Ciclosativeno	0,36				
α -Ylangeno		4,73		2,69	0,90
α -Copaeno	0,06		3,38		
β -Bourboneno		0,51	0,69	0,23	0,45
β -Cubebeno	4,91	1,52	1,15	0,62	1,10
α -Gurjuneno	1,40				0,32
N.I. Sesquiterpeno PM 204	1,23	1,40	0,79	1,03	0,88
β -Gurjuneno	1,15	0,74	1,01	0,67	0,70
(cis)-Muurolo4(14)-5-dieno	0,32				
N.I. Sesquiterpeno PM 204		0,54			
N.I. Sesquiterpeno PM 204		1,07			
α -Humuleno			0,21	0,33	
Allo-Aromadendreno		1,79		0,92	
N.I. Sesquiterpeno PM 202	0,92				
(E)-9-epi-Caryophylleno	1,59				

γ -Gurjuneno					0,58
Germacreno-D	44,06	46,83	12,60	40,61	45,66
β -Ionono					0,65
Valence					0,46
Biciclogermacreno	11,11	8,26	2,32	8,34	4,54
α -Muuroleno				2,46	0,65
Germacreno-A	1,57	1,29	2,57		0,80
γ -Cadineno	1,98	3,32	2,67	1,57	0,62
Cis-Calameneno			1,74		
δ -Cadineno	5,22	4,70		3,52	1,24
Trans-Calameneno			1,30		
Cadina-1,4-dieno	0,43			0,21	
α -Cadineno	0,54	0,12		0,27	
N.I. Sesquiterpeno PM 204	0,34				
Espatuleno			4,07	0,49	
N.I. Sesquiterpeno PM 204				0,61	
N.I. Sesquiterpeno PM 204	0,71	0,18		0,82	
Epóxido de Humuleno II			0,68		
N.I. Sesquiterpeno PM 204		1,12			
1-epi-Cubenol	0,39	1,01	0,78		
Epi- α -Cadinol	2,93	2,04	6,79		
N.I. Sesquiterpeno PM 204	2,39		4,98		
cis-14-Murolol-5-en-4-ona			1,96		
N.I. Sesquiterpeno PM 220	0,11	0,36		0,22	
N.I. Sesquiterpeno PM 220	0,09				
Hexadecanoato de metila	0,52	1,74	2,33	0,59	
Hexadecanoato de etila	0,23			2,72	
N.I. Diterpeno PM 272	0,04				
N.I. Diterpeno PM 272		0,10			
Linoleato de metila		0,50		0,68	
Octadecanoato de metila		0,11			
Acetato de Z-Fitol				2,41	

5.6 Influência de extratos de *Swietenia macrophylla* na biologia de *Spodoptera frugiperda* e *Anticarsia gemmatalis* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

5.6.1- Influência de extratos de *Swietenia macrophylla* na biologia de *Spodoptera frugiperda* e *Anticarsia gemmatalis* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

Este estudo foi realizado visando observar o efeito destas amostras em *Anticarsia gemmatalis* e *Spodoptera frugiperda* e obter substâncias ativas no combate a estes insetos que se constituem em pragas da agricultura brasileira.

As variáveis avaliadas foram: duração das fases larval e pupal, peso das pupas e percentagem de insetos vivos (viabilidade) após eclosão dos insetos adultos. Também foi identificado o sexo dos insetos pela análise visual das pupas, através de lupa.

O primeiro ensaio foi realizado com o extrato bruto das folhas de *S. macrophylla* na concentração de 1000 ppm (1 mg de extrato em 1 g) de dieta pa *S. frugiperda*. Neste ensaio foram avaliadas apenas a duração da fase larval e a viabilidade. A Tabela 25 mostra os resultados obtidos neste primeiro ensaio, sendo que para cada tratamento foram colocadas duas larvas por tubo com dieta.

A análise dos resultados da Tabela 26 indicou que o extrato bruto das folhas de *S. macrophylla* apresentou influência pequena no desenvolvimento das larvas de *S. frugiperda*, sendo que a percentagem de insetos que chegaram a fase adulta foi de 70%. Desta forma, pode-se concluir que na concentração de 1000 ppm o extrato bruto das folhas de *S. macrophylla* não apresentou influência significativa na mortalidade de lagartas de *S. frugiperda*.

Devido aos resultados pouco expressivos, resolveu-se aumentar a concentração do extrato aplicado para 2000 ppm. Os resultados dos ensaios com o extrato bruto a uma concentração de 2000 ppm foram melhores, aumentando o tempo larval. Foram utilizados 10 tubos com dieta para cada experimento, nos quais foram colocadas duas larvas por tubo (Tabela 27).

Tabela 25 – Duração (dias) da fase larval de *S. frugiperda* sob a ação do extrato bruto (1000 ppm) das folhas de *S. macrophylla* incorporado na sua dieta artificial

Tratamento	Duração da fase larval (dias)	
	Controle	Extrato bruto
1	20	37
2	21	M
3	24	M
4	20	39
5	21	41
6	19	45
7	21	39
8	21	45
9	19	M
10	19	43
Média	20,5	41,2
Viabilidade (%)	100	70

Viabilidade = percentagens de indivíduos vivos no final do bioensaio, M = lagarta morta

Tabela 26 - Resultados dos ensaios do extrato bruto (2000 ppm) das folhas de *S. macrophylla* na biologia de *S. frugiperda* criada em dieta artificial

Variáveis (média)	Controle	Extrato bruto
Período Larval (dias)	20,5	21,6
Período Pupal (dias)	15,5	15,2
Peso das pupas (mg)	245	250
Sexo (% M/F)	27/73	53/47
Viabilidade (%)	72	67

Como o extrato bruto apresentou um resultado que pode ser considerado satisfatório, foram testados em seguida, os sub-extratos das folhas de *S. macrophylla* obtidos como mostrado no Fluxograma 2. Pelo fato de se dispor no momento dos ensaios apenas de *A. gemmatalis*, foi utilizado este inseto nos testes com os sub-extratos. Como pode ser observado na Tabela 27, o sub-extrato acetoetílico apresentou o melhor resultado dentre todos: a média de vida da larva foi de 10 dias e depois todas morreram, não chegando à fase de pupa, portanto 0% de viabilidade.

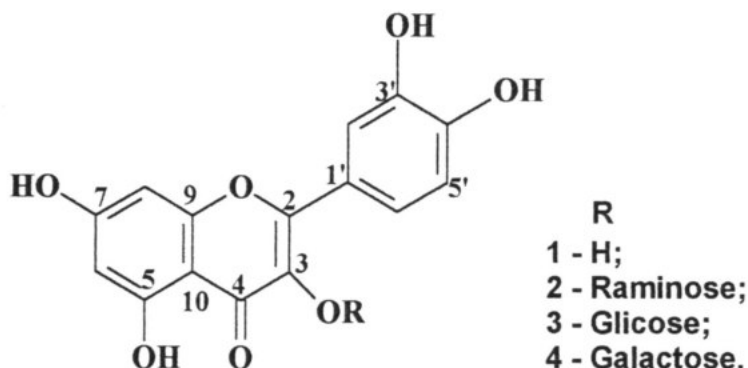
Tabela 27 - Resultados dos ensaios com os sub-extratos das folhas de *S. macrophylla* (2000 ppm) na biologia de *A. gemmatalis* criada em dieta artificial

Variáveis (média)	Controle	Hexânico	Butanólico	Hidroalcoólico	Acetoetílico	Metanólico
Período Larval (dias)	25,2	34,1	38,0	25,0	10,5	43,4
Peso das pupas (mg)	238	189	272	220	-	261
Sexo (% M/F)	63/27	50/50	48/62	50/50	-	63/47
Viabilidade (%)	82	90	70	70	0	80

Como se pode observar na Tabela 27, a uma concentração de 2000 ppm o extrato acetoetílico obtidos de *S. macrophylla* apresentou atividade sobre a biologia das lagartas de *A. gemmatalis* e para os demais sub-extratos

os resultados se mostraram menos interessantes, tendo atividade muito similar a do controle.

As substâncias presentes na fração acetoetilica são flavonóides **1-4**.



5.7 Influência de substâncias isoladas de folhas maduras de *Swietenia macrophylla* na biologia de *Hypsipylla grandela*

5.7.1 Flavonóides

Através da constatação de que o extrato acetoetilico foi o que apresentou melhores resultados nos ensaios com *Anticarsia gematalis* e *Spodoptera frugiperda*, foi possível selecioná-lo, fracioná-lo e testar seus constituintes em *H. grandella*. Estes ensaios foram desenvolvidos em Belém-PA.

As Tabelas 28-32 apresentam os dados obtidos com os testes com flavonóides, data da postura dos ovos, a eclosão dos mesmos e a data da inoculação das lagartas ao tratamento e as concentrações usadas. A idade das lagartas utilizadas nos experimentos é obtida subtraindo-se a data da inoculação da data da eclosão. Observa-se que, apesar dos ensaios serem feitos em dias diferentes, pela impossibilidade de se montar todos ao mesmo tempo, a idade das lagartas é a mesma, ou estão no mesmo *instar*.

Tabela 28 – Datas das mortes e empupamento relativas ao controle (solvente), com Postura em 24/03/01, Eclosão em 26/03/01, Inoculação em 30/03/01

Indivíduos	Morte	empupamento
1	1/4	
2	1/4	
3		10/4
4		10/4
5		12/4
6		15/4
7		13/4
8		13/4
9		12/4
10		13/4
11		12/4
12		12/4
13		13/4
14		12/4
15		12/4
16		15/4
17		12/4
18		14/4
19		15/4
20		16/4

Tabela 29 – Datas das mortes relativas ao tratamento com **1** (quercetina), com postura em 1/4/01, Eclosão em 4/4/01 e Inoculação em 9/4/01

concentrações	1,5 mg/mL	0,075 mg/mL	0,0075 mg/mL
Indivíduos	Morte	Morte	Morte
1	10/4	15/4	17/4
2	10/4	17/4	15/4
3	11/4		17/4
4	11/4		18/4
5	11/4	15/4	13/4
6	11/4		17/4
7	11/4	13/4	13/4
8	11/4	18/4	
9	10/4	14/4	17/4
10	11/4	17/4	19/4
11	10/4	13/4	19/4
12	11/4	12/4	18/4
13	11/4	16/4	18/4
14	11/4	14/4	16/4
15	11/4	12/4	18/4
16	10/4	12/4	14/4
17	11/4	17/4	19/4
18	11/4	12/4	13/4
19	11/4	12/4	18/4
20	11/4	14/4	19/4

Tabela 30 – Datas das mortes relativas ao tratamento com 2, com postura em 24/3/01, Eclusão em 26/3/01 e Inoculação em 30/3/01

concentrações	1,5 mg/mL	0,75	0,3 mg/mL	0,0075 mg/mL
Indivíduos	Morte	Morte	Morte	Morte
1	31/03	1/4	5/4	1/4
2	1/4	2/4	¼	1/4
3	1/4	31/3	1/4	1/4
4	1/4	1/4	5/4	2/4
5	1/4	1/4	1/4	2/4
6	1/4	1/4	5/4	2/4
7	1/4	4/4	2/4	2/4
8	1/4	1/4	2/4	31/3
9	1/4	4/4	1/4	1/4
10	1/4	1/4	5/4	1/4
11	1/4	3/4	1/4	1/4
12	1/4	1/4	1/4	2/4(fungou)
13	1/4	2/4	1/4	2/4
14	1/4	1/4	1/4	1/4
15	1/4	4/4	2/4	1/4 (fungou)
16	31/3	1/4	1/4	3/4
17	1/4	1/4	1/4	2/4
18	1/4	3/4	5/4	1/4
19	31/3	1/4	1/4	2/4
20	31/3	4/4	1/4	5/4

Tabela 31– Datas das mortes relativas ao tratamento com **4**, com postura em 24/3/01, Eclosão em 26/3/01 e Inoculação em 30/3/01

concentrações	1,5 mg/mL	0,75 mg/mL	0,0075 mg/mL
Indivíduos	Morte	Morte	Morte
1	1/4	31/3	1/4
2	1/4	3/4	2/4
3	1/4	2/4	12/4
4	31/3	3/4	8/4
5	1/4	2/4	3/4
6	1/4	2/4	2/4
7	1/4	2/4	1/4
8	31/3	4/4	12/4
9	1/4	2/4	12/4
10	1/4	1/4	4/4
11	1/4	1/4	1/4
12	1/4	12/4	2/4
13	31/3	2/4	1/4
14	1/4	2/4	1/4
15	1/4	2/4	6/4
16	1/4	1/4	5/4
17	31/3	1/4	12/4
18	1/4	6/4	12/4
19	1/4	1/4	1/4
20	1/4	2/4	9/4

Tabela 32 – Datas das mortes relativas ao tratamento com **3**, com postura em 27/3/01, Eclosão em 29/3/01 e Inoculação em 2/4/01

Concentrações	0,75 mg/mL	0,075 mg/mL	0,0075 mg/mL
Indivíduos	Morte	Morte	Morte
1	6/4	7/4	6/4
2	4/4	6/4	9/4
3	6/4	4/4	9/4
4	3/4	12/4	6/4
5	4/4	10/4	8/4
6	4/4	9/4	10/4
7	4/4	8/4	Empupou (17/4)
8	4/4	4/4	6/4
9	5/4	4/4	12/4
10	4/4	8/4	Empupou (16/4)
11	4/4	8/4	Empupou (18/4)
12	5/4	3/4	10/4
13	5/4	6/4	12/4
14	4/4	3/4	4/4
15		12/4	5/4
16	5/4	12/4	6/4
17	5/4	11/4	8/4
18	5/4	10/4	6/4
19	7/4	10/4	4/4
20	3/4	10/4	12/4

Após a obtenção dos dados contendo o número de dias de sobrevida das lagartas foi possível calcular o coeficiente de variação de sobrevida, através do teste de Turkey e a porcentagem de mortalidade das mesmas. Estes dados constam nas Tabelas 33-36.

Tabela 33- Dados estatísticos obtidos para o tratamento de *H. grandela* com 1 (quercetina)

TRATAMENTO	DURAÇÃO DA FASE LARVAL	CV (%)	MORTALIDADE (%)
Testemunha	13.8 a	11.96	10.0
1.5 mg/mL	1.8 d	25.39	100.0
0.075 mg/mL	5.6 c	37.28	100.0
0.0075 mg/mL	7.6 b	29.61	100.0

CV: Coeficiente de Variação

Tabela 34 - Dados estatísticos obtidos para o tratamento de *H. grandela* com 2

TRATAMENTO	DURAÇÃO DA FASE LARVAL	CV (%)	MORTALIDADE (%)
Testemunha	13.8 a	11.96	10.0
1.5 mg/mL	1.8 c	22.80	100.0
0.75 mg/mL	2.9 bc	45.93	100.0
0.3 mg/mL	3.2 b	54.77	100.0
0.075 mg/mL	3.3 b	45.16	100.0

Tabela 35 - Dados estatísticos obtidos para o tratamento de *H. grandela* com 4

TRATAMENTO	DURAÇÃO DA FASE LARVAL	CV (%)	MORTALIDADE (%)
Testemunha	13.8 a	11.96	10.0
1.5 mg/mL	1.8 c	22.80	100.0
0.75 mg/mL	3.6 c	72.24	100.0
0.075 mg/mL	6.4 b	71.94	100.0

Tabela 36 - Dados estatísticos obtidos para o tratamento de *H. grandela* com 3

TRATAMENTO	DURAÇÃO DA FASE LARVAL	CV (%)	MORTALIDADE (%)
Testemunha	13.8 a	11.96	10.0
0.75 mg/mL	2.6 c	38.26	100.0
0.075 mg/mL	5.9 b	52.69	100.0
0.0075 mg/mL	5.8 b	46.73	85.0

Através dos gráficos pode-se ter uma melhor visualização sobre os resultados acima apresentados, podendo ser observado que o número de dias de vida das lagartas é inversamente proporcional às concentrações das substâncias testadas, ou seja quanto maior a concentração das substâncias, menor o número de dias que a larva consegue sobreviver (Figura 57). Quando a concentração tende a zero, a larva consegue sobreviver cerca de metade de dias do seu ciclo. O gráfico a seguir (Figura 58) mostra com maior clareza a linearidade entre dosagem e tempo de vida.

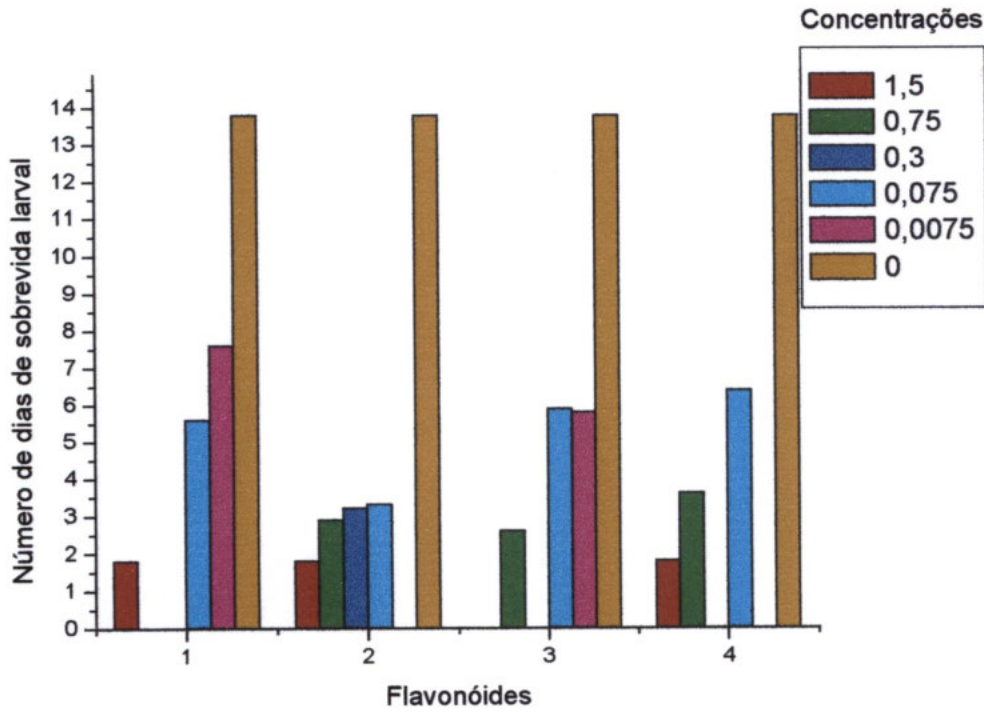


Figura 57- Gráfico relacionando os flavonóides testados e o número de dias de sobrevivência das lagartas.

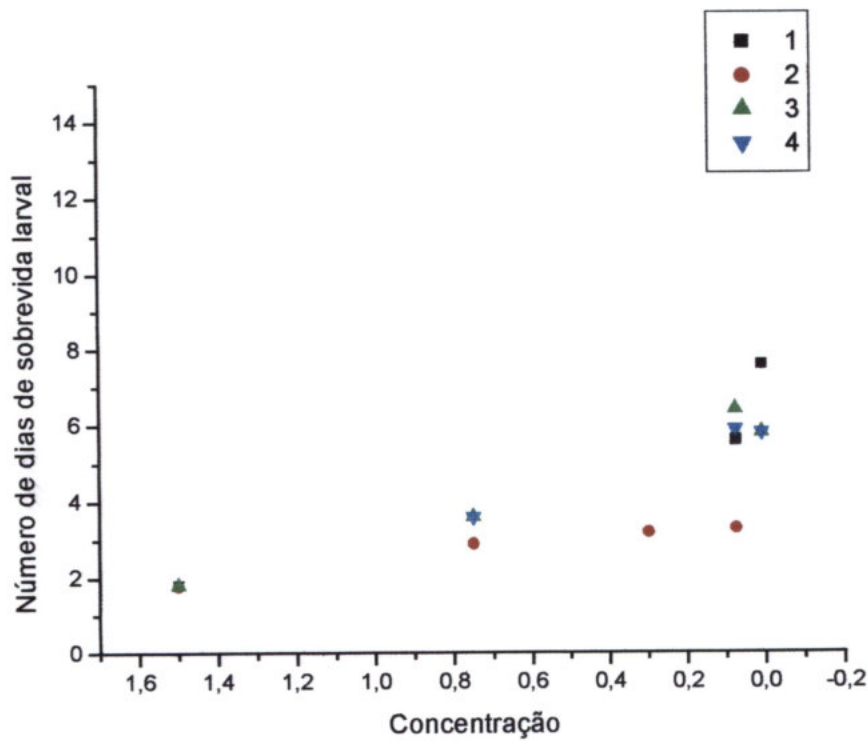


Figura 58- Gráfico relacionando os flavonóides testados e o número de dias de sobrevivência das lagartas.

5.8 – Influência de substâncias obtidas do cavalo de enxerto de *Toona ciliata* sobre *Cedrela odorata* (cedro) na biologia de *H. grandella*

Em observações anteriores realizadas pelo grupo de Dendrologia da Universidade Federal de Viçosa, se dedicou à obtenção de enxertos de *Cedrela* sobre *Toona* e a transferência de resistência desta última à primeira tem sido quase total. O estudo químico dos cavalos deste enxerto (DE PAULA, 1996), levou ao isolamento de cedrelona (Limonóide) e diversos triterpenos, indicando a necessidade de ensaiar estes constituintes em *H. grandella*. Os resultados obtidos estão descritos nas Tabelas 37-42.

Tabela 37 – Datas das mortes e empupamento relativas ao controle (solvente), com Postura em 24/03/01, Eclosão em 26/03/01, Inoculação em 30/03/01

Indivíduos	Morte	empupamento
1	1/4	
2	1/4	
3		10/4
4		10/4
5		12/4
6		15/4
7		13/4
8		13/4
9		12/4
10		13/4
11		12/4
12		12/4
13		13/4
14		12/4
15		12/4
16		15/4
17		12/4
18		14/4
19		15/4
20		16/4

Tabela 38 - Datas das mortes relativas ao tratamento com **HB4**, com postura em 28/3/01, Eclosão em 30/3/01 e Inoculação em 3/4/02/01

Concentrações	1,5 mg/mL	0,075 mg/mL	0,0075 mg/mL
Indivíduos	Morte	Morte	Morte
1		6/4	4/4
2	6/4	7/4	5/4
3	6/4	5/4	7/4
4	7/4	5/4	6/4
5	10/4	5/4	12/4
6	6/4		Empupou (18/4)
7	6/4	5/4	6/4
8	5/4	8/4	7/4
9	8/4	8/4	4/4
10	5/4		7/4
11	6/4	5/4	Empupou (17/4)
12	6/4	5/4	7/4
13	6/4	4/4	6/4
14	6/4	6/6	6/4
15	6/4	5/4	Empupou (17/4)
16	6/4	6/4	7/4
17	8/4	6/4	8/4
18	6/4	6/4	8/4
19	6/4	5/4	6/4
20	6/4	5/4	5/4

Tabela 39 - Datas das mortes relativas ao tratamento com **PR12**, com postura em 28/3/01, Eclosão em 30/3/01 e Inoculação em 3/4/01

Concentrações	1,5 mg/mL	0,075 mg/mL	0,0075 mg/mL
Indivíduos	Morte	Morte	Morte
1	6/4	6/4	9/4
2	5/4	6/4	6/4
3	5/4	6/4	6/4
4	6/4	7/4	Empupou (19/4)
5	6/4		6/4
6	7/4	6/4	6/4
7	7/4	6/4	5/4
8	6/4	10/4	6/4
9	6/4	5/4	6/4
10	4/4	7/4	10/4
11	4/4	6/4	7/4
12	4/4	7/4	
13	6/4	7/4	Empupou (20/4)
14	6/4	10/4	12/4
15	6/4	7/4	6/4
16	5/4	6/4	
17	5/4	5/4	6/4
18	6/4	7/4	6/4
19	5/4	7/4	12/4
20	6/4	9/4	6/4

Tabela 40 - Datas das mortes relativas ao tratamento com **HC8**, com postura em 28/3/01, Eclosão em 31/3/01 e Inoculação em 4/4/01

Concentrações	1,5 mg/mL	0,075 mg/mL	0,0075 mg/mL
Indivíduos	Morte	Morte	Morte
1	7/4	Empupou (20/4)	7/4
2	7/4	8/4	7/4
3	9/4	6/4	
4	7/4	8/4	6/4
5	6/4	Empupou (21/4)	7/4
6	6/4	13/4	Empupou (20/4)
7	6/4	6/4	7/4
8	6/4	6/4	6/4
9	9/4		7/4
10	7/4	8/4	7/4
11	7/4	7/4	9/4
12	9/4	8/4	Empupou (21/4)
13	8/4		7/4
14	8/4	6/4	12/4
15	7/4	8/4	6/4
16	5/4	12/4	12/4
17	7/4	12/4	7/4
18	7/4	6/4	7/4
19	7/4		7/4
20		6/4	Empupou (21/4)

Tabela 41 - Datas das mortes relativas ao tratamento com **HC76**, com postura em 1/4/01, Eclosão em 4/4/01 e Inoculação em 8/4/01

Concentrações	1,5 mg/mL	0,075 mg/mL	0,0075 mg/mL
Indivíduos	Morte	Morte	Morte
1	9/4 todos	10/4	12/4
2	mortos	12/4	9/4
3		9/4	Empupou (27/4)
4		Empupou (24/4)	13/4
5		12/4	9/4
6		9/4	
7		9/4	12/4
8		9/4	10/4
9		9/4	Empupou (25/4)
10		13/4	9/4
11		12/4	12/4
12		10/4	12/4
13		9/4	
14		10/4	10/4
15		9/4	
16		10/4	9/4
17		12/4	Empupou (25/4)
18		9/4	Empupou (24/4)
19		12/4	12/4
20		12/4	10/4

Tabela 42 - Datas das mortes relativas ao tratamento com **Cedrelona**, com postura em 1/4/01, Eclosão em 4/4/01 e Inoculação em 9/4/01

Concentrações Indivíduos	1,5 mg/mL Morte	0,075 mg/mL Morte	0,0075 mg/mL Morte
1	10/4	11/4	Empupou (25/4)
2	12/4	10/4	
3	10/4	11/4	Empupou (25/4)
4	12/4	10/4	Empupou (25/4)
5	14/4	11/4	12/4
6	12/4	Empupou (24/4)	14/4
7		11/4	14/4
8	10/4	10/4	Empupou (24/4)
9	12/4	11/4	14/4
10	12/4	10/4	12/4
11	12/4	10/4	Empupou (24/4)
12	12/4	12/4	12/4
13	10/4	Empupou (25/4)	13/4
14	13/4	12/4	Empupou (24/4)
15	10/4	14/4	Empupou (25/4)
16	13/4	10/4	Empupou (24/4)
17		12/4	Empupou (25/4)
18	10/4	Empupou (25/4)	12/4
19	10/4	12/4	14/4
20	12/4	12/4	

As lagartas alimentadas com folhas jovens contendo as substâncias testadas, principalmente os triterpenos, não cresciam como o controle, se tornaram bem frágeis, perderam os movimentos e acabaram por morrer, como pode ser visto na Figura 59. Nela são mostradas duas lagartas com a mesma idade, sendo que a menor foi alimentada com Cedrelona (Cd) há quatro dias.

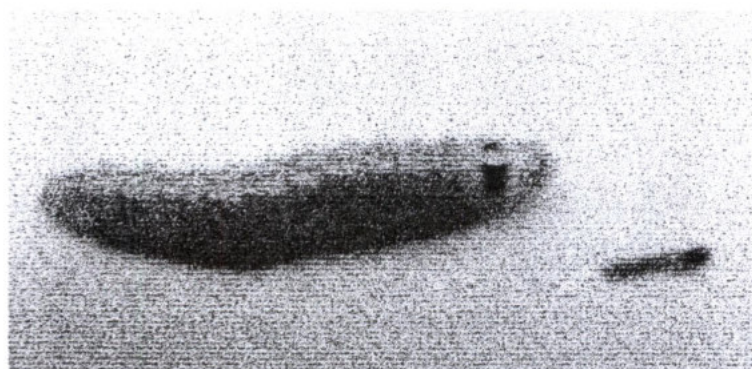


Figura 59 - Comparação de lagarta de *H. grandela* se alimentado em folhas tratadas com Cedrelona (menor) e o controle (maior).

Após a obtenção dos dados contendo o número de dias de sobrevivência das lagartas foi possível calcular o coeficiente de variação através do teste de Turkey, e a porcentagem de mortalidade das mesmas, descritos nas Tabelas 43-48.

Tabela 43 - Dados estatísticos obtidos para o tratamento com **HC8**

TRATAMENTO	DURAÇÃO DA FASE LARVAL	CV (%)	MORTALIDADE (%)
Testemunha	13.8 a	11.96	10.0
1.5 mg/mL	3.1 b	34.55	100.0
0.075 mg/mL	3.8 b	60.60	90.0
0.0075 mg/mL	3.5 b	51.19	85.5

Tabela 44 - Dados estatísticos obtidos para o tratamento com **HC76**

TRATAMENTO	DURAÇÃO DA FASE LARVAL	CV (%)	MORTALIDADE (%)
Testemunha	13.8 a	11.96	10.0
1.5 mg/mL	1.0 c	0.0	100.0
0.075 mg/mL	2.4 b	61.69	95.0
0.0075 mg/mL	2.6 b	55.42	80.0

Tabela 45 - Dados estatísticos obtidos para o tratamento com **PR12**

TRATAMENTO	DURAÇÃO DA FASE LARVAL	CV (%)	MORTALIDADE (%)
Testemunha	13.8 a	11.96	10.0
1.5 mg/mL	2.6 c	34.79	100.0
0.075 mg/mL	3.8 bc	36.82	100.0
0.0075 mg/mL	4.1 b	52.03	80.0

Tabela 46- Dados estatísticos obtidos para o tratamento com **Cedrelona**

TRATAMENTO	DURAÇÃO DA FASE LARVAL	CV (%)	MORTALIDADE (%)
Testemunha	13.8 a	11.96	10.0
1.5 mg/mL	2.5 c	49.42	100.0
0.075 mg/mL	2.1 c	52.48	85.0
0.0075 mg/mL	4.2 b	23.47	55.0

Tabela 47- Dados estatísticos obtidos para o tratamento com **HB4**

TRATAMENTO	DURAÇÃO DA FASE LARVAL	CV (%)	MORTALIDADE (%)
Testemunha	13.8 a	11.96	10.0
1.5 mg/mL	3.0 b	18.73	100.0
0.075 mg/mL	3.0 b	35.60	100.0
0.0075 mg/mL	3.5 b	52.16	85.0

Ao analisar os gráficos de respostas de diferenças de concentrações dos triterpenos e cedrelona, observa-se que praticamente não existe uma relação direta entre a concentração e o número de dias de sobrevivência das

lagartas, Figuras 60, 61. No caso do triterpeno **BH4** esse número é praticamente o mesmo.

Ao comparar todos os dados dos flavonóides e terpenóides (Figura 62), pode-se observar que os terpenóides, de modo geral tem um caráter inseticida maior, o que justifica a toxicidade do enxerto, onde, *Toona* poderia estar translocando estes constituintes para *Cedreia* e este conjunto não ser atacado por *H. grandella*.

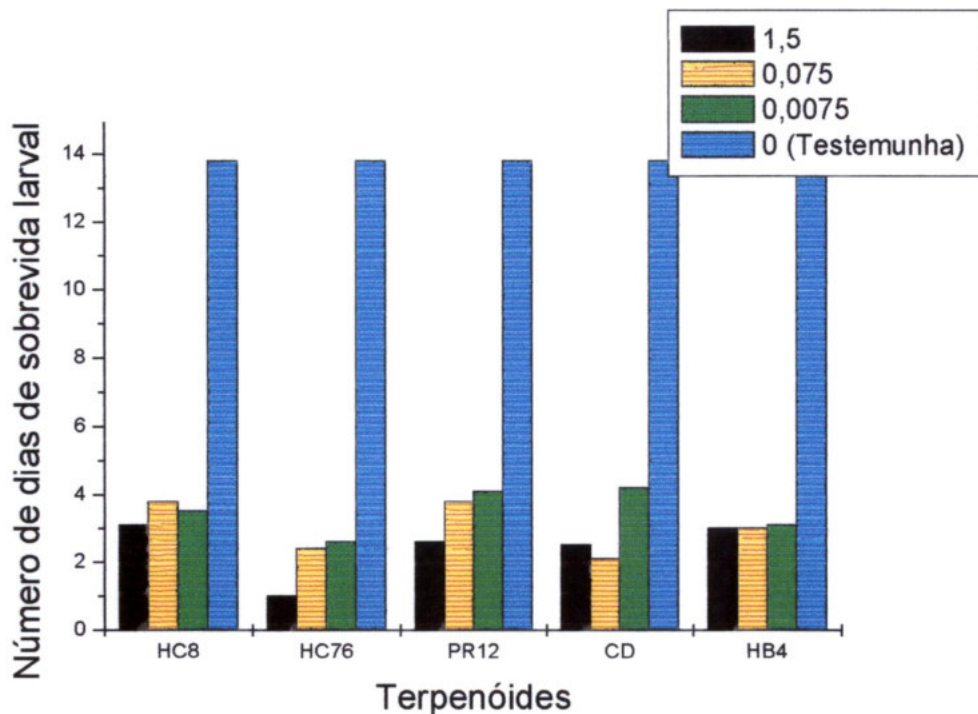


Figura 60 - Gráfico relacionando os terpenóides testados e o número de dias de sobrevivência das lagartas.

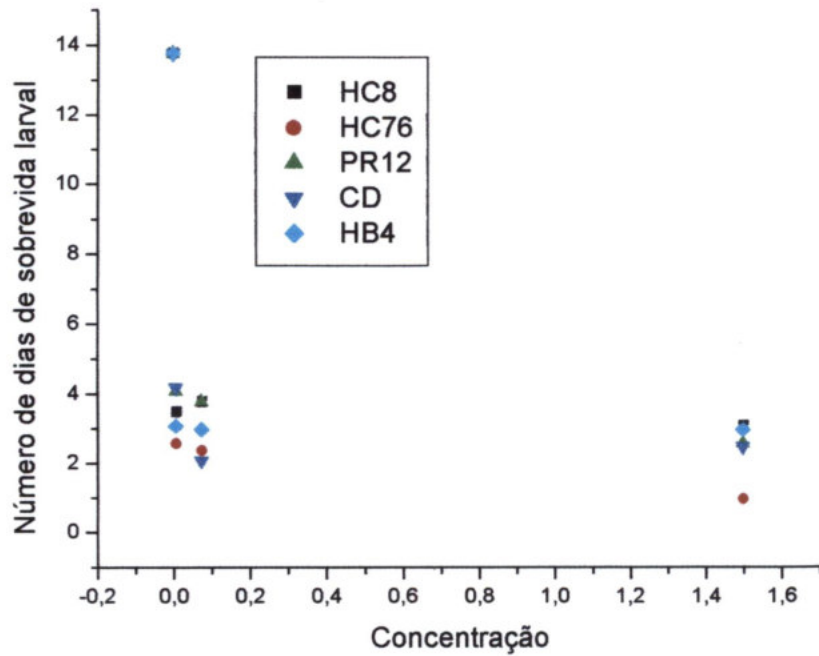


Figura 61 - Gráfico relacionando os terpenóides testados e o número de dias de sobrevivência das lagartas.

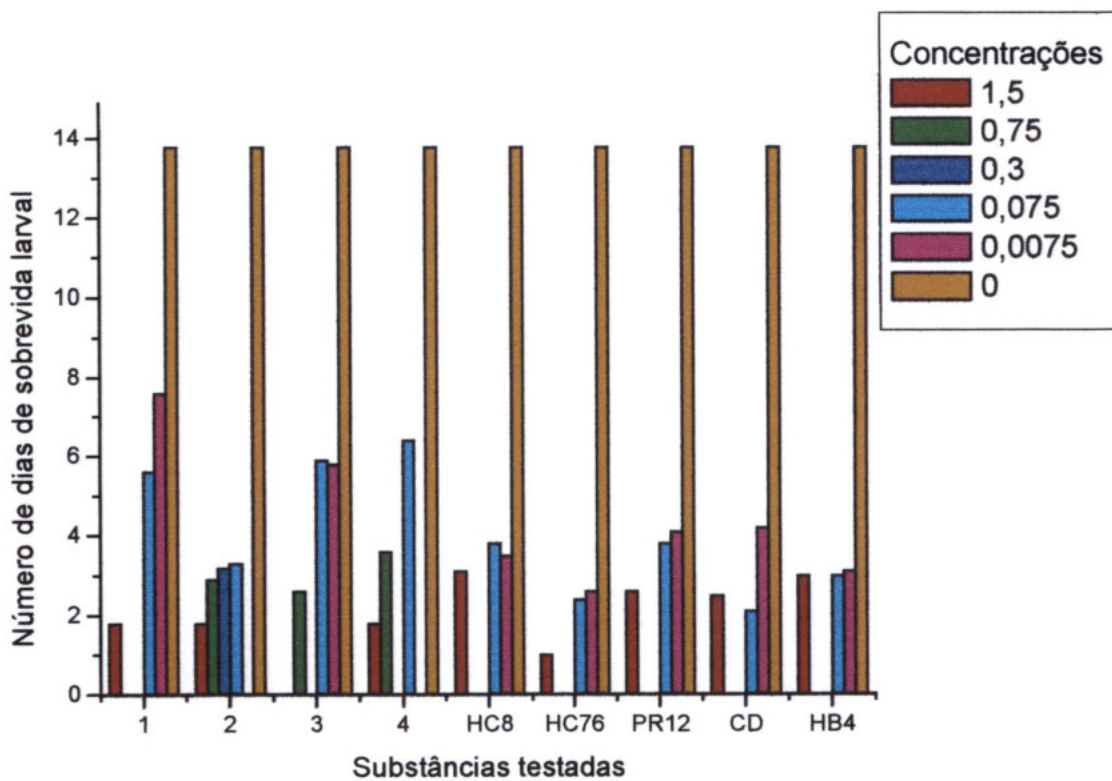


Figura 62 - Gráfico relacionando os flavonóides e terpenóides testados com o número de dias de sobrevivência das lagartas.

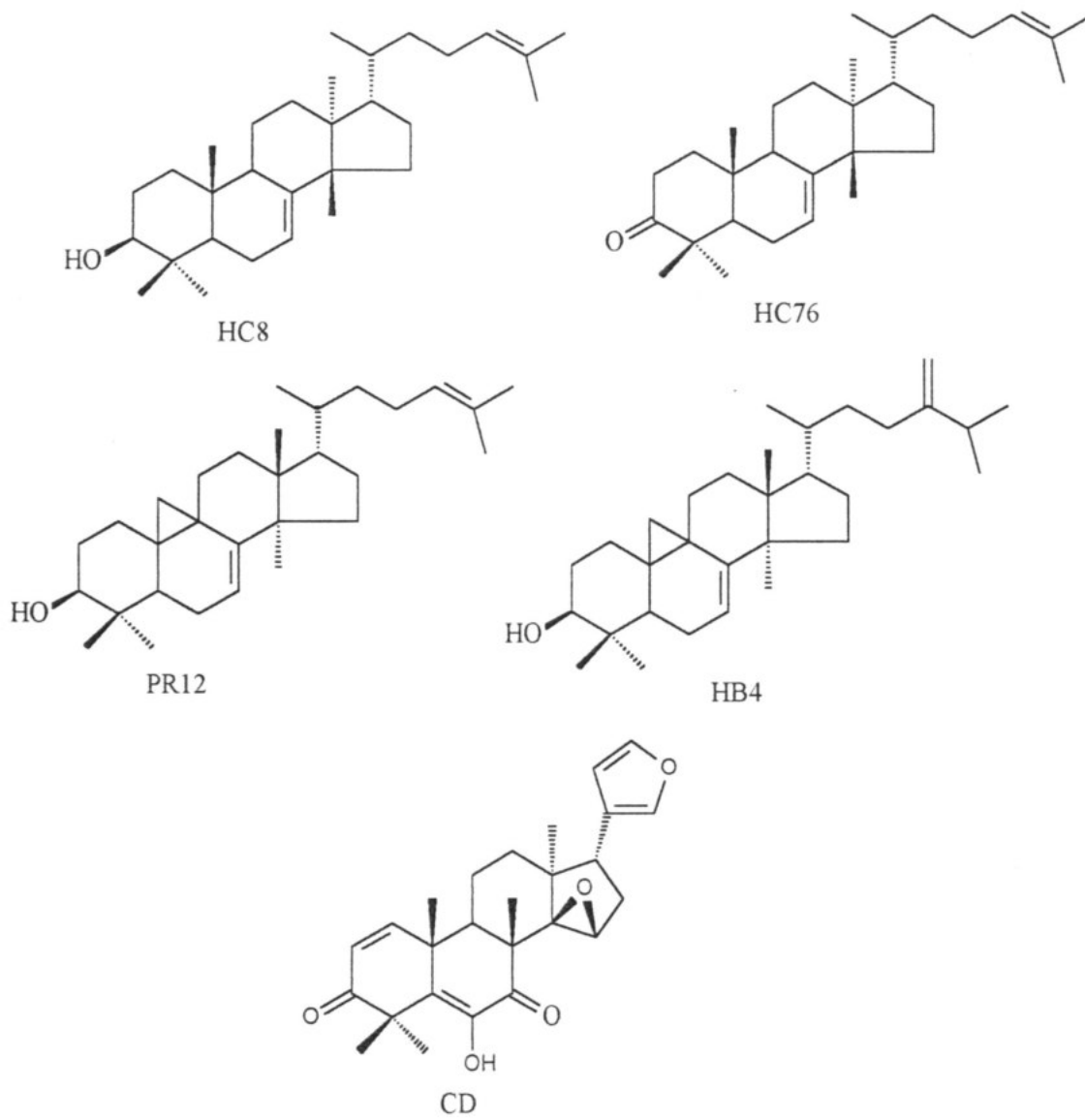


Figura 63 - Estruturas dos terpenóides e da cedrelona testados em *H grandella*

6 – CONCLUSÕES

Os flavonóides, isolados das folhas de *S. macrophylla* possuem caráter inseticida, uma vez que apresentaram atividade nos testes com *Anticarsia gemmatalis* e também com *H. grandella*. Os terpenóides obtidos do cavalo de enxerto toona-cedrela apresentaram atividade inseticida nos testes com *H. grandella*, provavelmente estão envolvidos no processo de resistência conferida a cedrela a partir da enxertia.

O estudo eletroantenográfico dos óleos essenciais de brotos, folhas maduras e senescentes de *S macrophylla* frente à antenas de fêmeas e machos de *H grandella* , mostrou que o óleo que apresentou maiores respostas foi o de brotos e a antena de fêmeas foi a que apresentou maiores repostas, portanto, provavelmente os voláteis dos brotos de mogno possuem atividade de ovoposição. Pode-se afirmar que os óleos essenciais são responsáveis por algum tipo de reposta, porém qual o tipo de reposta, se atração, repulsão isto não é possível afirmar, pode-se sugerir que estes voláteis atraem as fêmeas até os brotos para que as mesmas ovopositem.

O estudo dos principais componentes fixos dos brotos, folhas maduras e folhas velhas *S. macrophylla*, realizados através de CL/EM, mostraram que os brotos possuem uma diversidade menor de flavonóides que as folhas maduras e senescentes. Provavelmente o flavonóide encontrado nos brotos apresente uma concentração inferior à dosagem responsável pela toxicidade nos brotos.

É de fundamental importância o desenvolvimento de uma dieta específica para se criar *H. grandella* em laboratório, pois permitiria testes de laboratórios com maior facilidade e em maior escala.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, R. P. Identification of essential oil components by Gas Chromatography Mass Spectroscopy, *Allures Publishing*, New York, 1995.
- AGOSTINHO, S. M. M.; SILVA, M. F. G. F.; FERNANDES, J. B., VIEIRA, P. C., PINHEIRO, A. L.; VILELA, E. F. Limonoids from *Toona ciliata* and speculations on their chemosystematic and ecological significance. *Biochemical Systematics and Ecology*, **22** n.3, p. 323 – 328, 1994.
- AGOSTINHO, S.M.M. Estudo fitoquímico de *Toona ciliata* (Meliaceae) e Avaliação da Atividade Biológica de Seus Metabólitos Secundários. São Carlos, Programa de Pós Graduação em Química - UFSCar, 1996, Tese de doutorado. 261p.
- AGRAWAL, P.K. Carbon-13 NMR of Flavonoids. Elsevier science publishing Company Inc. New York, USA, 1989.
- AIMEX. Boletim Informativo da AIMEX. Belém-PA. 1998. (Dados não publicados)
- AIMEX. Boletim Informativo da AIMEX. Belém-PA. 2000. (Dados não publicados)
- BANERJI, B & NIGAN, S.K. Woods Constituents of Meliaceae: a review. *Fitoterapia*, **55**(1):3-36.1984.
- BARROS, P. L. C. de; QUEIROZ, W. T. de; SILVA, J. N. M.; OLIVEIRA, F. de A.; COSTA FILHO, P. P.; TEREZO, E. F. de M.; FARIAS, M. M. de; BARROS, A. V. de. Reservas naturais e artificiais de *Swietenia macrophylla* king. na Amazônia brasileira numa perspectiva de conservação. Belém [s.n.], 1992. 85p. Não publicado.
- BECKER, V. O. Estudios sobre el barrenador *Hypsipyla grandella* (Zeller) (Lep. Pyralidae) XVI. Observaciones sobre la biologia de *H. ferrealis* (Hampson) una especie afin. *Turrialba*, **23**(2):154-161, 1973.
- BERTI FILHO, E. Observações sobre a biologia de *Hypsipyla grandella* (Zeller, 1848) (Lepidoptera: Phycitidae). Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz- ESALQ, USP, 1973. Dissertação de Mestrado, 108p.
- BORESK, V.; KALINOVA, B.; VALTEROVA, I.; HOCHMUT, R. & VROCK, J. Sex feromone gland volatiles from *hypsipyla grandella* females (Lepidoptera,

- Pyralidae, Phycitinae) *Acta Entomologica Bohemoslovaca* **88** (3-4): 181-186, 1991.
- BROWER, J.E.; Zar, j. h. Field and laboratory methods for general ecology. IOWA, WM. C. Brown company publishers. 1977. 149p.
- CAMPBELL, F. T. Tropical timber issues at CITES. *Species* **18** (June): 28 - 30p 1992.
- CASS, Q.B.; DEGANI, A.L.G. *Desenvolvimento de Métodos por HPLC: fundamentos, estratégias e validação*. São Carlos: EdUFSCar, 2001. 77p.
- CHAMPGNE, D.; KOUL, O;I. SMAN, M.B.; SCUDDER, G.G.E.& TOWERS,G.H.N.; Biological activity of limonoids from rutales. *Phytochemistry*, **31**(2): 337-394, 1992.
- CHAPMAN, J.R. *Practical Organic Mass Spectrometry- A Guide and Biochemical clinical toxicology. Journal of Chromatography B*, **713**: 3-25, 1998.
- COSTA, M. do S. S. Controle de *Hypsipyla grandella* Zeller (Broca do Mogno) utilizando a planta resistente *Toona ciliata* Roenm (Cedro Australiano) e os métodos mecânico e cultural no plantio de *Swietenia macrophylla* King (Mogno). 2000. 55p. Dissertação de Mestrado em Ciências Florestais – Faculdade de Ciências Agrárias do Pará, Belém, 2000.
- DE PAULA, J. R.; VIEIRA, I. J. C; DA SILVA, M. F. DAS G. F.; RODRIGUES Fo., E; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C.; PINHEIRO, A. L.; VILELA, E. F.; “Sesquiterpenes, Triterpenoids, Limonoids and Flavonoids of *Cedrela Odorata* Graft and Speculations on the Induced Resistance Against *Hypsipyla Grandella*”; *Phytochemistry*, **44**: 8, 1449-1454, 1997.
- DE PAULA, J.R. Estudo fitoquímico do Enxerto de *Cedrela odorata* sobre *Toona ciliata* (Meliaceae). São Carlos Programa de Pós Graduação em Química - UFSCar, 1996, Tese de doutorado. 341p.
- Emenda do Apêndice II, CITES: Convención sobre el Comercio Internacional de Espécies Amenazadas de Fauna e Flora Silvestre. Décima Reunión de la Conferencia de las Partes Harare, Zimbabwe, 9-20 de junio de 1997. 60p. 1997, 60p.

- FIGUEROA COLON, J. C. An assesment of distribution and status of big-leaf mahogany (*Swietenia macrophylla* King). Rio Piedras: Conservation Foundation and/USDA Forest Service/International Institute of Tropical Forestry, 1994, 23p.
- GALLO, D. NAKANO, O. WIENDL, F. M. SILVEIRA-NETO, S. CARVALHO, R.P.L. , BERTI-FILHO, E. ; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R. A. & ALVES, S.B. Manual de Entomologia Agrícola, Editora Agron. CERES, 1978.
- GRIJPMA, P.; ROBERTS, S. C. On the resistance of *Toona ciliata* M. J. Roem var. *australis* (F. V. M) *Turrialba*, v. 17, p. 1-4, 1973.
- GRIJPMA, P.; ROBERTS, S. C. Studies on the shot borer *Hypsipyla grandella* (Zeller)(Lep. Pyralidae). XXVII. Biological and chemical screening for the basis of resistance of *Toona ciliata* M. J. Roem. Var. *australis*. *Turrialba*, v. 25, p. 152-159, 1975.
- GULLISON, R.E.; PANFIL, S. N.; STROUSE, J. J.; HUBBELL, S. P. Ecology and management of Mahogany (*Swietenia macrophylla* King) in the Chimanes forest, Beni, Bolivia. *Botanical Journal of the Linnean Society*, **122**, 9 - 34, 1996.
- HIDALGO-SALVATIERRA, O. Estudios sobre el barrenador *Hypsipyla grandella* Zeller. VII. Determinación del sexo en pupas. *Turrialba* **21**(2):221, 1971.
- HIRATA, R. Piretróides: Estrutura Química - Atividade Biológica, *Química Nova*, **18** (4) 368-374, 1995.
- LAMB, B. Mahogany of tropical America: its ecology and management. Michigan: University of Michigan, 1966. 220p.
- MANCEBO, F.; HILJE, L. ; MORA, G. A ; SALAZAR, R. Antifeedant activity of *Quassia amara* (Simaroubaceae) extracts of *Hypsipyla grandella* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae. *Crop protection* **19** 301-305, 2000.
- MARKHAM, K.R.; TERNAI, B.; STANLEY, R.; GEIGER, H AND MABRY, T.J. Carbon-13 NMR studies of flavonoids-III Naturally occurring flavonoid glycosides and their acylated derivatives *Tetrahedron* (34) ergamon Press, 1978 p 1389-1397.
- MAURER, H.H. Liquid Chromatography-mass spectrometry in forensic and clinical toxicology. *Journal of Chromatography B*, **713**: 3-25, 1998.

- MOOTOO, B. S.; ALI, A.; MOTILAL, R.; PINGAL, R.; RAMLAL, A.; KHAN, A.; REYNOLDS, W. F.; McLEAN, S.; "Limonoids from *Swietenia macrophylla* and *S. aubrevilleana*", *J. Nat. Prod.*, **62**, 1514-1517, 1999.
- MURGU, M. *Estudo de Metodologias Analíticas para Quassinóides: espectrometria de massas e cromatografia*. São Carlos, Programa de Pós-graduação em Química-UFSCar Dissertação de Mestrado, 1998.
- NEWTON, A. C., BAKER, P., RAMNARINE, S., MESEN, J.F & LEAKEY, R.R.B. The mahogany shoot borer: prospects for control. *Forest Ecology and Management*, **57**, 39-60, 1993.
- NIESSEN, W.M.A. State-of-the-art in liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **856**: 179-197, 1999.
- PENNINGTON, T. D.; STYLES, B. T.; TAYLER, D. A. H. *Meliaceae*. New York Botanical Garden, (Flora Neotropica. Monograph, 28), 1981. 470p.
- RIZZINI, C. T., *Árvores e Madeiras Úteis do Brasil, Manual de Dendrologia Brasileira*, Editora Edgard Bhucher Ltda, p.182-186, 1971.
- SARMENTO-JÚNIR, R. G. *Biologia de Hysipyla grandella* (Zeller, 1848) e avaliação da resistência de *Swietenia macrophylla* King, *Cedrela odorata* L, *Toona ciliata* Roem e *Toona sp.* à broca das Meliaceae em laboratório. Belém Faculdade de Ciências Agrárias do Pará, 2001, Tese de doutorado. 61p.
- SMERALDI, R.; VERÍSSIMO, J. A. de O. *Acertando ao alvo: consumo de madeira no mercado interno brasileiro e promoção da certificação florestal*. São Paulo: Amigos da Terra Piracicaba: IMAFLORA Belém: *Imazon*, 1999. 41p.
- SNOOK, L. Mahogany: ecology, exploitation, trade and implications for CITES. [S. I.], WWF, 1994. 15p.
- SNOOK, L. Catastrophic disturbance, logging and the ecology of mahogany (*Swietenia macrophylla* King): grounds for listing a major tropical timber species in CITES. *Botanical Journal of the Linnean Society*, **122**, 35-46, 1996.
- SNYDER, L.R.; KIRKLAND, J.J.; GLAJCH, J.L. *Practical HPLC Method Development*. 2nd. Ed. Wiley interscience. 1997, 765p.

- VERÍSSIMO, A.; BARRETO, P.; TARIFA, R. & UHL, C. Extraction of a high-value natural resource from Amazônia: the case of mahogany. *Forest Ecology and Management*, **72**, 39-60, 1995.
- VERÍSSIMO, A.; GROGAN, J. Reunião do grupo de trabalho sobre mogno: síntese da situação do mogno, a nível internacional. [Brasília, DF], relatório informativo apresentado ao MMA. **2.**, 1998. 27p.
- VILA, W. M. Comportamento do cedro australiano *Toona ciliata* M. Roen. Var. *australis*, face à susceptibilidade do ataque do *Hypsipyla grandella* (Zeller). *Silvicultura em São Paulo*, **10**, 109-118, 1996.
- WATSON, J.T. *Introduction Mass Spectrometry*. 3rd. ed. Philadelphia, Lippincott – Raven, 1997.
- YAMAZAKI, R.B. & KLOCKE, J.A Structure - Activity relationship of azadirachtin, a potencial inset control agent. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, **24**:718-722, 1987.
- YAMAZAKI, S.; VASQUEZ, C. Studies on *H. grandella* Zeller. In: report on joint study project of performance trials for reforestation in the Amazon area in the Peru Republic. JICA/INIAA, **2**, 163-172, 1991.
- ZUCCHI, R.A. Guia de Identificação de pragas Agrícolas. Piracicaba FEALQ, 1993.