

EFEITO INSETICIDA DE AMIDAS NATURAIS DE *Piper* E DO DERIVADO SINTÉTICO TETRAIDROPIPERINA SOBRE *Lucilia cuprina* (DIPTERA: CALLIPHORIDAE) E *Musca domestica* (DIPTERA: MUSCIDAE)*

ÉLIO BARBIERI JUNIOR¹; CLEBER B. BARRETO JUNIOR²; ROBERTA CRISTIANE RIBEIRO³; VÍTOR HUGO S. DE OLIVEIRA⁴; MARCO EDILSON FREIRE DE LIMA⁵; GONZALO E. MOYA-BORJA⁶

ABSTRACT:- BARBIERI JUNIOR, E.; BARRETO JUNIOR, C.B.; RIBEIRO, R.C.; OLIVEIRA, V.H.S. DE; LIMA, M.E.F. DE; MOYA-BORJA, G.E. [Insecticide effects of natural amides from *Piper* and of the synthetic derivative tetrahydropiperine on *Lucilia cuprina* (Diptera: Calliphoridae) and *Musca domestica* (Diptera: Muscidae)]. Efeito inseticida de amidas naturais de *Piper* e do derivado sintético tetrahidropiperina sobre *Lucilia cuprina* (Diptera: Calliphoridae) e *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 16, n. 2, p. 87-91, 2007. Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Km 7 da BR 465, Seropédica, RJ 23890.000, Brazil. E-mail: gemoya@ufrj.br

The insecticide activity of piperine, cinamoil amide, and tetrahydropiperine against *Lucilia cuprina* and *Musca domestica* adults were conducted at the Federal Rural University of Rio de Janeiro. Chemicals were topically applied on thoracic areas of the flies and the toxicity was determined after 24 and 48 hr post treatment and LD₅₀ were calculated using Probit Analysis. Tetrahydropiperine (THP amide) was the only substance which demonstrated insecticide activity against both species of flies. LD₅₀ against *L. cuprina* and *M. domestica* were 16.25 and 7.65 µg/fly, respectively, after 24 hr of treatment. Similar results were observed after 48 hr post treatment because the LD₅₀'s were 18.03 and 6.57 µg/fly, respectively. Males of *L. cuprina* were more resistant to tetrahydropiperine than females. However females of *M. domestica* were more resistant to the insecticide than males.

KEY WORDS: *Piper nigrum*, piperine, house fly, bronze bottle fly.

RESUMO

Experimentos visando determinar a atividade inseticida da piperina, cinamoil amida e tetrahidropiperina em adultos de *Lucilia cuprina* e *Musca domestica* foram realizados na Universidade Rural Federal de Rio de Janeiro. Soluções das substâncias foram aplicadas topicamente na região torácica das moscas e a toxicidade foi determinada em 24 e 48 horas após o tratamento e as DL₅₀ foram calculadas usando análise Probit. A tetrahidropiperina (amida THP) foi a única substância que

demonstrou atividade inseticida em ambas as espécies. As DL₅₀ para *L. cuprina* e *M. domestica* foram 16,25 e 7,65 µg/mosca, respectivamente, em 24 horas após o tratamento. Foram observados resultados semelhantes 48 horas após o tratamento, sendo as DL₅₀ de 18,03 e 6,57 µg/mosca, respectivamente. Machos de *L. cuprina* foram mais resistentes à tetrahidropiperina que fêmeas. Porém, fêmeas de *M. domestica* se mostraram mais resistentes ao inseticida que machos.

PALAVRAS-CHAVE: *Piper nigrum*, piperina, mosca doméstica, mosca varejeira.

INTRODUÇÃO

Os dípteros muscóides *Lucilia cuprina* Wied (1930) e *Musca domestica* Linn.(1758), pertencentes às famílias Calliphoridae e Muscidae, respectivamente, são potenciais vetores mecânicos de diversos agentes etiológicos, como vírus, bactérias, cistos de protozoários e ovos de helmintos (MARICONI; GUIMARÃES, 1999). *Lucilia cuprina*, vulgarmente conhecida como “mosca varejeira”, apresenta coloração metálica e suas larvas são

* Sob os auspícios do CNPq, Capes e FAPERJ.

¹ Curso de Medicina Veterinária, Bolsista do PIBIC (UFRRJ/CNPq). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ).

² Curso de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Bolsista CAPES.

³ Curso de Pós-Graduação em Biologia Animal. UFRRJ.

⁴ Curso de Química, Bolsista de Iniciação Científica, UFRRJ.

⁵ Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, UFRRJ.

⁶ Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Veterinária, UFRRJ, Km 7 da BR 465, Seropédica, RJ 23890-000.

necrobiontófagas, sendo utilizada para determinação do período pós-morte em seres humanos e em carcaças de animais (GREENBERG, 1991). Elevados índices de infestação por *M. domestica* causam sérios problemas em criações animais, pois além de alimentarem-se principalmente de excrementos, mantêm estreita associação com as rações de animais, habitando os mais variados sistemas de produção e utilizando os mais diferentes meios para o desenvolvimento larval. Estes insetos, por manterem um alto grau de associação com o ambiente modificado pelo homem, são amplamente relacionados na literatura como causadores de diversos danos como agente causador de estresse, por veicular microorganismos patogênicos, além de causar miíases, podendo levar animais a morte (GUIMARÃES et al., 1983). Os impactos observados têm motivado a busca de diversos métodos aplicáveis ao controle destes insetos.

Apesar da grande evolução no controle biológico de insetos ocorrida nos últimos anos, proporcionada, principalmente, pela criação massal de microinimópteros e o uso de fungos entomopatogênicos, os inseticidas químicos ainda são a principal solução para o controle das moscas (NEVES; NOGUEIRA, 1996). Entretanto, estes apresentam elevados custos e quando mal utilizados podem deixar resíduos não só no ambiente, mas também em indivíduos isolados, os quais, devido seu ciclo de vida curto, rapidamente adquirem resistência (MOGNATO, 2000). Por esse motivo, a substituição de produtos sintéticos por produtos naturais tem atraído a atenção de vários pesquisadores, que vêm nesta área um futuro promissor (COSTA et al., 2004).

Produtos naturais abundantes e facilmente acessíveis podem servir como matéria-prima para a preparação de novas moléculas com potencial aplicação na área de fármacos ou ainda como inseticidas (FERREIRA et al., 2001; NEWMANN et al., 2003).

A pimenta do reino é obtida a partir dos frutos secos de *Piper nigrum*, encontrada em diversas regiões tropicais e subtropicais do planeta. *Piper nigrum* apresenta diversas indicações fitoterápicas na medicina popular, além de sua tradicional utilização gastronômica (PARMAR et al., 1998). O princípio picante da pimenta é devido à presença de diversas substâncias, dentre as quais a amida piperina, que ocorre em maior proporção (SEMLER; GROSS, 1988), podendo ser extraída do material vegetal em rendimentos que variam de 3 a 7% (IKAN, 1991; RIBEIRO et al., 2004). Na busca de alternativas para o controle de insetos, a piperina já demonstrou ter atividade inseticida promissora sobre várias espécies (MIYAKADO et al., 1979; MIYAKADO et al., 1989; PAULA et al., 2000; PARK et al., 2002; ESTRELA et al., 2003). Diante disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a possível atividade inseticida da piperina e de seus análogos, cinamoil amida e tetraidropiperina, sobre duas espécies de dípteros muscóides de importância veterinária.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no Laboratório Entomológico de Miíases Tropicais do Instituto de Veterinária

da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). As moscas foram capturadas no campus da UFRRJ, durante três dias, por meio de atrativo composto de carne equina em início de putrefação (SANTOS, 1999). Tanto os espécimes de *L. cuprina* quanto de *M. domestica* foram capturados com o auxílio de rede entomológica, sendo sequencialmente identificados e acondicionados em gaiolas de madeira (0,30 x 0,30 x 0,30 m) revestidas com tela de náilon. Após completarem um número mínimo de 30 fêmeas e três machos foram então levados ao laboratório.

Diariamente, a colônia de *L. cuprina* foi alimentada com solução glicosada a 20%, servida em placas de Petri, com anteparo de pouso de composição plástica, facilitando a alimentação. Já para *M. domestica* foi oferecida mistura de leite em pó e açúcar na proporção de 1:1 e água, ambos servidos separadamente em placas de Petri. A alimentação foi trocada diariamente e as placas de Petri higienizadas, evitando assim o desenvolvimento de microorganismos indesejáveis.

Como substrato para ovoposição para *L. cuprina* foi utilizada carne equina com 24 horas de putrefação, conforme descrito por Santos (1999). Para *M. domestica* foi oferecida uma mistura de ração concentrada, contendo 23% de proteína bruta, farelo de trigo e água, na proporção de 1:1:2, respectivamente, oferecida por cerca de duas horas. As massas de ovos obtidas eram então encaminhadas para posterior desenvolvimento larval, nos respectivos substratos descritos, até a obtenção da segunda geração (F₂).

As amidas utilizadas no experimento (Figura 1) foram isoladas e/ou sintetizadas no Laboratório de Química Medicinal (LaQMed) do Departamento de Química da UFRRJ. A piperina foi isolada dos frutos secos de *Piper nigrum*, através da metodologia descrita na literatura (IKAN, 1991; RIBEIRO et al., 2004). Apesar da cinamoil amida ser de ocorrência natural, tendo sido isolada por Loder et al. (1969) de *Piper novae-hollandiae*, ela foi sintetizada em nosso laboratório a partir do piperonal. A tetraidropiperina (THP) foi obtida através da reação de hidrogenação catalítica da piperina. As metodologias sintéticas utilizadas no preparo da cinamoil amida e THP encontram-se descritas nos trabalhos de Ribeiro et al. (2004) e Barreto-Junior (2005).

Foram preparadas soluções estoque das três substâncias citadas acima, partindo de soluções com concentração de 50 mg/mL e utilizando acetona como solvente. Uma vez preparada a solução estoque, foram obtidas, através de diluições seriadas, quatro concentrações distintas (25; 12,5; 6,25 e 3,13 mg/mL). As soluções foram devidamente lacradas com fita de politetrafluoretileno e mantidas em refrigerador, sendo deixadas à temperatura ambiente por vinte minutos antes do uso.

As moscas adultas, com até 72 horas de emersão, foram retiradas das gaiolas e posteriormente imobilizadas com dióxido de carbono. Com o auxílio de uma microseringa de 25 µL (Hamilton) foi realizada a aplicação tópica de 0,5 mL de cada substância na região torácica dos insetos. Foram realizadas quatro repetições por dose, com 20 moscas por repetição, sendo duas compostas por machos e duas por fêmeas,

todos pertencentes à segunda geração. Após a aplicação das substâncias, os insetos foram acondicionados em recipientes de vidro (0,10 m de altura por 0,03 m de diâmetro), com fundo forrado com disco de papel de filtro e parte superior fechada com gaze estéril, presa por liga de borracha.

Durante o experimento as moscas foram alimentadas através de algodão embebido em solução de glicose a 20%, objetivando a observação de sua mortalidade em 24 e 48 horas, após aplicação das substâncias. Em todos os testes foram utilizados grupos controles, nos quais foi aplicado unicamente o diluente.

Durante a realização das leituras em 24 e 48 horas, as moscas que se apresentaram imóveis e em decúbito dorsal por mais de 3 segundos, mesmo com leves movimentos nos apêndices após este tempo, foram consideradas mortas.

As doses letais (DL₁₀, DL₅₀ e DL₉₀) foram calculadas utilizando-se o programa computacional POLO-PC (Probit for Logit Analysis) (LEORA SOFTWARE, 1987).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das três substâncias testadas, somente a amida THP, derivado sintético da piperina, apresentou atividade inseticida em ambas as espécies.

Os valores de mortalidade obtidos para a piperina e para a cinamoil amida não apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo controle e nem às diferentes concentrações de cada substância. É possível que algum efeito inseticida seja obtido em concentrações maiores que 50 µg/mosca, uma vez que a literatura relata a atividade inseticida para a piperina e diversas amidas análogas (MIYAKADO et al., 1979; PAULA et al., 2000; ESTRELA et al., 2003). Os resultados obtidos neste trabalho estão em concordância com os observados por Miyakado et al. (1979), que não observaram a atividade inseticida para a piperina em dose >20 µg/inseto, em aplicação tópica sobre adultos de *Callosobruchus chinensis* (Coleoptera: Bruchidae).

Na Tabela 1 são apresentadas as doses letais obtidas no tratamento dos insetos adultos com THP, após 24 e 48 horas de exposição à substância.

Os valores obtidos para a THP mostraram que esta amida

apresentou efeito tóxico relevante, sobretudo em comparação com as outras duas amidas que não apresentaram toxicidade. *Musca domestica* se mostrou mais suscetível que *L. cuprina*. Resultados semelhantes foram obtidos por Chaaban (2005) na avaliação de inseticidas organofosforados nas duas espécies de insetos.

A análise de toxicidade sobre machos e fêmeas de *L. cuprina* se mostrou inversa aos resultados obtidos em *M. domestica*, apesar das maiores doses em *L. cuprina*. Os valores de DL₅₀ observados em machos e fêmeas de *L. cuprina* com 24 horas pós-exposição às substâncias foram, respectivamente, 21,05 e 14,80 µg/mosca, o que pode estar associado a uma maior sensibilidade natural de fêmeas de *L. cuprina*. Resultados semelhantes foram obtidos por Chaaban (2005) que verificou maior suscetibilidade de fêmeas de *L. cuprina* em relação aos machos, quando utilizou organofosforados como inseticidas.

Já para *M. domestica* os valores de DL₅₀ foram de 4,55 mg/mosca para machos e 25,53 µg/mosca para fêmeas. Esta diferença marcante de suscetibilidade entre machos e fêmeas de *M. domestica* pode estar associada, entre outros fatores, a diferenças de peso entre os insetos, visto serem as fêmeas mais pesadas que os machos (peso médio de machos e fêmeas de *M. domestica*: 0,0105 e 0,0158 g, respectivamente).

De forma semelhante aos resultados obtidos em 24 horas, apenas a THP apresentou atividade em 48 horas, sendo observado baixo poder de toxicidade residual. Foi observada uma pequena variação nos valores de DL₅₀ de 24 para 48 horas em *L. cuprina*, sendo observados acréscimos sobre os valores em 48 horas. Este fato pode ser explicado a partir de observações experimentais, visto que no momento da leitura, realizada em 24 horas após o tratamento, os insetos que se apresentam em decúbito dorsal por períodos de mais de três segundos são caracterizados como mortos, mesmo se após esse período apresentarem leves movimentos nos apêndices. Estes indivíduos podem, no entanto, realizar a metabolização posterior da substância tóxica, apresentando-se já recuperados na leitura realizada em 48 horas.

Os valores das DL₅₀ de THP para machos e fêmeas de *L. cuprina* em 48 horas foram, respectivamente, 23,22 e 15,27 µg/mosca. Para *M. domestica*, os valores de DL₅₀ observados

Tabela 1. Doses letais (µg/mosca) da tetraidropiperina para *Lucilia cuprina* e *Musca domestica*, após 24 e 48 horas do tratamento.

Espécie		Tempo decorrido do tratamento					
		24 horas			48 horas		
		DL ₁₀	DL ₅₀	DL ₉₀	DL ₁₀	DL ₅₀	DL ₉₀
<i>L. cuprina</i> ^b	Fêmeas	10,43	14,80	21,01	10,99	15,27	21,22
	Machos	6,01	21,05	73,74	9,14	23,22	58,95
	Total ^a	6,74	16,25	39,22	9,22	18,03	35,21
<i>M. domestica</i> ^c	Fêmeas	0,86	25,53	753,26	1,08	16,55	253,04
	Machos	1,92	4,55	10,75	1,73	4,16	9,98
	Total ^a	0,97	7,65	60,32	0,93	6,57	46,58

^a Machos + fêmeas. ^b Peso médio de machos e fêmeas: 0,0206 e 0,0271 g, respectivamente. ^c Peso médio de machos e fêmeas: 0,0105 e 0,0158 g, respectivamente.

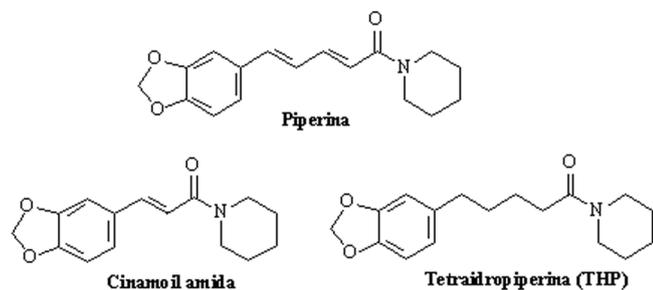


Figura 1. Estruturas moleculares da piperina, cinamoil amida e tetraidropiperina.

foram 4,16 µg/mosca para machos e 16,55 µg/mosca para as fêmeas, após 48 horas da aplicação.

Na Figura 1 são apresentadas as estruturas das moléculas testadas. Ao realizar-se uma análise preliminar da relação entre a estrutura química e a atividade inseticida exibida por estas amidas, frente à *L. cuprina* e *M. domestica*, a maior atividade da tetraidropiperina deve-se provavelmente à ausência de insaturações em sua cadeia lateral, em comparação com a piperina que apresenta 2 insaturações nas posições 2 e 4, com geometria *trans*. A ausência das insaturações na amida THP implementa uma maior liberdade conformacional à sua estrutura, o que pode facilitar sua ligação a um receptor hipotético.

Novos derivados devem ser desenvolvidos a partir destas informações para que se possa entender melhor as estruturas responsáveis pela atividade inseticida, bem como traçar um perfil mais detalhado da relação estrutura-atividade, possibilitando assim o planejamento de novas moléculas que possam ser utilizadas como uma nova opção de inseticida, obtido de uma fonte natural renovável e que possa atuar no manejo integrado de pragas.

CONCLUSÃO

A tetraidropiperina foi a única substância que apresentou atividade inseticida nas concentrações avaliadas, tanto para *L. cuprina* quanto para *M. domestica*. A presença de insaturações na cadeia lateral das moléculas da piperina e da cinamoil amida pode ser a responsável pela inatividade das mesmas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARRETO-JUNIOR, C. B. *Abordagem para a Síntese de Amidas Naturais Bioativas e Seus Análogos*. 2005. 199f. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2002.

CHAABAN, A. *Ação de organofosforados sobre adultos de Lucilia cuprina e Chrysomya megacephala (Diptera: Calliphoridae)*. 2005, 43f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2005.

COSTA, E.L.N.; SILVA, R.F.P.; FIÚZA, L.M. Efeito, aplicações e limitações de extratos de plantas inseticidas. *Acta Biologica Leopoldensa*, v.26, n.2, p. 73-85, 2004.

ESTRELA, J. L. V.; GUEDES, R. N. C.; MALTHA, C. R. A.; FAZOLIN, M. Toxicity of piperine amide analogs to larvae of *Ascia monuste orseis* Godart (Lepidoptera: Pieridae) and *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). *Neotropical Entomology*, v. 32, n. 2, p. 343-346, 2003.

FERREIRA, J.T.B.; CORRÊA, A.G.; VIEIRA, P.C. *Produtos naturais no controle de insetos*. São Carlos: UFSCar, 2001. 176p.

GREENBERG, B. Flies as forensic indicators. *Journal of Medical Entomology*. v. 28, n. 5, p. 565-577, 1991.

GUIMARÃES, J. H. G.; PAPAVERO, N.; PRADO, A. P. As Míases na Região Neotropical: Identificação, Biologia, Bibliografia. *Revista Brasileira de Zoologia*, v.1, n.4, p. 239-416, 1983.

IKAN, R. *Natural Products: A Laboratory Guide*. 2nd Ed. San Diego: Academic Press, 1991. 360p.

LODER, J.W.; MOORHOUS, A.; RUSSELL, G.B. Tumour inhibitory plants. Amides of *Piper novae-hollandiae* (Piperaceae). *Australian Journal of Chemistry*, v.22, n.7, p.1531, 1969.

MARICONI, F.A.M.; GUIMARÃES, J.H.; FILHO, E.B. *A mosca domestica e algumas outras moscas nocivas*. Piracicaba: FEALQ; 1999.135p.

MIYAKADO, M.; NAKAYAMA, I.; YOSHIOKA, H.; NAKATANI, N. The Piperaceae amides I: Structure of pipericide, a new insecticidal amide from *Piper nigrum* L. *Agricultural and Biological Chemistry*, v.43, n.7, p. 1609-1611, 1979.

MIYAKADO, M.; NAKAYAMA, I.; OHNO, N. Insecticidal unsaturated isobutylamides: from natural products to agrochemical leads. In: AMASON, J. T.; PHILOGÈNE, B. J. R.; MORAND, P. (eds.). *Insecticides of plant origin*. New York: American Chemical Society, 1989. p. 183-187. (ACS Symposium Series 387).

MOGNATO, C. M. *Avaliação do potencial inseticida das folhas de Azadirachta Indica (A. Jussieu, 1830), Melia Azedarach (Linnaeus, 1737) e Eucalyptus Robusta (Smith, 1796) sobre o controle dos dípteros Lucilia Cuprina (Wiedemann, 1830) e Chrysomya Megacephala (Fabricius, 1794) em condições de laboratório*. 2000. 86f. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2000.

NEVES, B.P.; NOGUEIRA, J.C.M. *Cultivo e utilização do Nim Indiano (Azadirachta indica A. Juss)*. Goiânia: Embrapa-CNPAP, 1996. 32p.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M.; SNADER, K.M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *Journal of Natural Products*, v. 66, n.7, p.1022-1037, 2003.

PARMAR, V. S.; JAIN, S. C.; GUPTA, S.; TALWAR, S.; RAJWANSHI, V. K.; KUMAR, R.; AZIM, A.; MALHOTRA, S.; KUMAR, N.; JAIN, R.; SHARMA, N. K.; TYAGI, O. D.; LAWRIE, S. J.; ERRINGTON, W.; HOWARTH, O. W.; OLSEN, C. E.; SINGH, S. K.;

- WENGEL, J. Polyphenols and Alkaloids From *Piper* Species. *Phytochemistry*, v. 49, n. 4, p. 1069-1078, 1998.
- PARK, I. K.; LEE, S. G.; SHIN, S. C.; PARK, J. D.; AHN, Y. J. Larvicidal Activity of Isobutylamides Identified in *Piper nigrum* Fruits Against Three Mosquito Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 50, n. 7, p. 1866-1870, 2002.
- PAULA, V. F.; BARBOSA, L.C.A.; DEMUNER, A.J.; PILÓ-VELOSO, D.; PICANÇO, M.C. Synthesis and insecticidal activity of new amide derivatives of piperine. *Pest Management Science*, v. 56, n.2 p. 168-174, 2000.
- RIBEIRO, T. S.; FREIRE-DE-LIMA, L.; PREVIATO, J. O.; MENDONÇA-PREVIATO, L.; HEISE, N.; DE LIMA, M. E. F. Toxic Effects of Natural Piperine and Its Derivatives on Epimastigotes and Amastigotes of *Trypanosoma Cruzi*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 14, n. 13, p. 3555-3558, 2004.
- LEORA SOFTWARE. *POLO-PC A user's guide to probit or logit analysis*. Berkeley: LeOra Software, 1987.
- SANTOS, M. J. P. *Comportamento sexual, sobrevivência e desenvolvimento pós-embrionário de Lucilia Cuprina (Wied., 1830) (Diptera, Calliphoridae) exposta a diferentes condições de criação no laboratório*. 1999. 81f. Tese (Doutorado em Biologia Animal). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 1999.
- SEMLER, U.; GROSS, G. G. Distribution of piperine in vegetative parts of *Piper nigrum*. *Phytochemistry*, v. 27, n. 5, p. 1566-1567, 1988.
- SU, H.C.F.; HORVAT, R. Isolation, Identification and Insecticidal Properties of *Piper nigrum* Amides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 29, n.1, p. 115-118, 1981.

Recebido em 14 de setembro de 2006.

Aceito para publicação em 10 de junho de 2007.