

## ESTUDO DA ATIVIDADE LARVICIDA DE PRODUTOS NATURAIS ISOLADOS DE PLANTAS DA AMAZÔNIA.

Dulcimar Silva QUADROS<sup>1</sup>; Wanderli Pedro TADEI<sup>2</sup>; Sergio Massayoshi NONUMURA<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Bolsista PIBIC/CNPq/INPA; <sup>2</sup>Orientador CPR/ INPA; <sup>3</sup>Co-Orientador CPR/ INPA.

### 1. Introdução

As doenças tropicais como a malária, a encefalite, a febre amarela e o dengue são considerados como um dos principais problemas de saúde das regiões tropicais do planeta (EL HAG *et al.* 2001). São infecções transmitidas por insetos vetores da família Culicidae, como por exemplo, o *Aedes aegypti* (LINNAEUS, 1762), que encontrou no mundo moderno condições favoráveis à sua rápida propagação (GUZMAN *et al.* 1996; TAUIL, 2000). No controle dessas doenças de transmissão vetorial, os programas utilizam, principalmente, inseticidas químicos, pelo fato de ainda não ter sido obtida vacinas que sejam efetivas. Apenas para a febre amarela há disponibilidade de uma vacina de longa duração, cerca de 10 anos, (ROTHMAN, 2004). Visando encontrar novas formas de controlar os vetores dessas doenças tropicais, evitando utilizar os produtos químicos, pois contaminam o meio ambiente, este trabalho foi desenvolvido com objetivo de encontrar extratos com atividade inseticida a partir de plantas da Amazônia e de material já disponível no mercado. O objetivo maior deste projeto é a busca de novos inseticidas com origem natural que apresentem menor toxicidade ao homem e preserve o meio ambiente (FERREIRA, 2001; SHARMA *et al.* 1998; FURTADO *et al.* 2005). Estudos recentes com os fenilpropanóides mostraram elevado potencial inseticida como os estudos realizados por Simas *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). Neste trabalho, descrevemos o processo de purificação de padrões obtidos comercial e substâncias isoladas pelo grupo de pesquisa, por métodos cromatográficos. Descrevemos também o potencial dessas substâncias em ensaios de atividade biológica larvicida (larvas de *Ae. aegypti*), protocolado pela Organização Mundial de Saúde para determinar a atividade contra o mosquito transmissor da dengue, em seu estágio larval. Os ensaios de atividade larvicida foram realizados com larvas de *Ae. aegypti* em seu 3º estágio, em triplicata, com grupos de 10 larvas. A atividade foi determinada pela percentagem de mortalidade observada após 24 horas de incubação. Foi utilizado como controle positivo o Temefós e negativo o DMSO, onde as amostras foram preparadas. A  $CI_{50}$  foi estabelecida para cada padrão analisados sendo realizados os ensaios em diferentes concentrações, com o objetivo de identificar a existência de uma relação entre estrutura química dos compostos testados e a atividade biológica (larvicida). Esse projeto avaliou a atividade larvicida de fenilpropanóides de estruturas químicas semelhantes com a presença de um anel benzênico com diferentes graus de oxigenação. Das substâncias testadas até o momento, a substância com maior padrão de oxigenação no anel aromático, foi aquela que apresentou a maior atividade larvicida. O dilapiol é um dos poucos fenilpropanóides naturais que apresentam esse padrão de oxigenação na natureza. Portanto, essa substância, que pode ser facilmente isolada de uma espécie que ocorre no Amazonas, a *Piper aduncum*, é um importante reagente na produção de novos inseticidas sintéticos.

### 2. Material e métodos

Os padrões obtidos comercialmente (Metilchavicol, Metileugenol, Metilsoeugenol e Eugenol) e o Dilapiol isolado, foram analisados em CCD e por cromatografia em fase gasosa. A análise de cromatografia gasosa foi realizada em aparelho Hewlett-Packard, modelo HP 6890, equipado com sistema "dual-column", com duas colunas, uma apolar (HP-5 de 30 m de comprimento, 0,320 mm de diâmetro interno e filme de 0,25 µm) e outra polar (Innowax de 30 m de comprimento, 0,320 mm de diâmetro interno e filme de 0,25 µm) e dois detectores do tipo FID. Injetor programado a 250°C e detectores a 260°C, com gás de arraste Hidrogênio. O forno programado para operar em temperatura inicial de 60°C com rampa linear de 3°C/min até atingir a temperatura de 240°C. As amostras foram preparadas em hexano com grau para HPLC, na concentração de 1mg/mL, o tempo de análise de 60/min com volume de injeção de 1 µL. O dilapiol, a elemicina e a miristicina foram isolados utilizando um processo de hidrodestilação em aparelhagem de Clevenger, com um tempo de extração de 4 horas, respectivamente a partir das folhas de *Piper aduncum* coletadas na região de Manaus e da semente da noz moscada (*Myristica fragrans*) obtidas no comércio local. O processo de purificação das amostras foi realizado por meio de fracionamento cromatográfico, em sílica gel flash (40-200µm), utilizando como fase móvel hexano/AcoEt (9:1). Exceto o safrol e o metilchavicol, que sofreram modificações na concentração de seus gradientes durante o fracionamento, sendo necessárias proporções crescentes de polaridades da fase móvel utilizada.

Para detecção da atividade larvicida foram utilizadas larvas de 3º estágio de *A. aegypti*, criadas de acordo com metodologia já definida. Foram realizados bioensaios em diferentes concentrações com objetivo de estabelecer a  $CI_{50}$  de cada substância, com leitura de 24 horas.

### 3. Resultados e discussão

As análises por CCD dos padrões de safrol, eugenol, netilsoeugenol, metileugenol e metilchavicol obtidos na forma de padrões comerciais apresentaram forte presença de substâncias contaminante, o que foi confirmado pela análise em CG. A partir do resultado dessa análise, iniciou-se o processo de purificação por coluna de cromatografia onde se obteve a massa (tabela1), necessária para os testes de atividade larvicida.

Tabela 1. Massa das frações obtidas na coluna cromatográfica.

Fração	1. Gradiente	Massa (mg)
Eugenol	Hex/AcoET (90:10)	27,0
Safrol	Hex/ AcoEt (95:5)	28,6
Metileugenol	Hex/Acoet (90:10)	23,0
Metilsoeugenol	Hex/AcoEt(90:10)	23,6
Metilchavicol	Hex/ AcoEt (95/5)	12,8
Dilapiol	Hex/AcoEt(90:10)	16,5

A purificação do dilapiol foi obtida a partir do fracionamento do óleo de *P. aduncum*, em coluna cromatográfica.

O isolamento da elemicina e da miristicina foi realizado, a partir do óleo de noz moscada, obtido por hidrodestilação por 4 horas. Esse óleo foi purificado por meio de uma cromatografia de camada delgada preparativa, de onde foi possível isolar elemicina e miristicina. A pureza das amostras foi determinada por análises em cromatografia de camada delgada e cromatografia em fase gasosa. A identificação de cada um dos padrões purificados foi realizada com base na análise dos índices de retenção (KI - *Kovat index*) das amostras e comparada com a literatura. Os índices de Kovat são obtidos, a partir da conversão dos tempos de retenção das amostras analisadas, em índices de retenção, relativos a uma série homóloga de alcanos analisados nas mesmas condições de análise. Os dados são apresentados na tabela 2.

Tabela 2: Índice de Retenção dos Padrões (Fenilpropanóides)

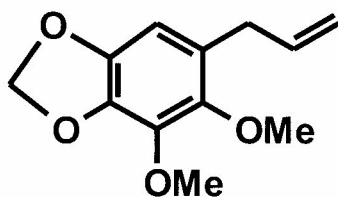
Substancias	KI (literatura)	KI (calculado da analise em CG, laboratório).
Dilapiol	1622	1623
Elemicina	1554	1505
Eugenol	1356	1357
Metileugenol	1401	1405
Metil isoeugenol	1495	1497
Metilchavicol	1195	1197
Myristicina	1520	1519
Safrol	1285	1283

Os ensaios de atividade larvicida foram realizados com larvas de *Ae. aegypti* em seu 3º estágio, em triplicata, com grupos de 10 larvas. A atividade foi determinada pela percentagem de mortalidade observada após 24 horas de incubação. Foi utilizado como controle positivo o temefós e negativo o DMSO, onde as amostras foram preparadas. A  $CI_{50}$  foi estabelecida pelo método descrito por para cada padrão analisado conforme os valores (tabela 3).

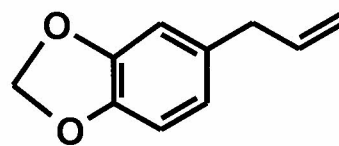
Tabela 3. Concentração Letal mediana dos padrões.

Fração	CL <sub>50</sub> (µg)
Eugenol	36,8 µg/mL
Safrol	69,5 µg/mL
Metileugenol	109,0 µg/mL
Metiliseugenol	49,5 µg/mL
Dilapiol	19,6 µg/mL

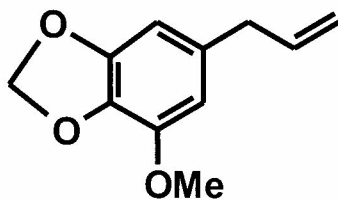
Considerando as estruturas químicas dos fenilpropanóides testados observa-se que o grau de oxigenação do anel aromático é o principal responsável pela atividade larvicida. A presença de um anel metilenodioxí (presente no dilapiol e no safrol) não confere uma maior atividade larvicida.



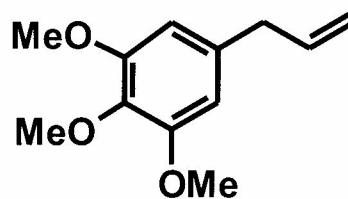
*dilapiol (isolado)*  
CL<sub>50</sub>=19,6 µg/mL



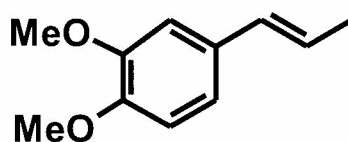
*safrol (padrão)*  
CL<sub>50</sub>=69,5 µg/mL



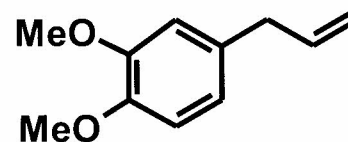
*miristicina (isolado)*  
Não testado



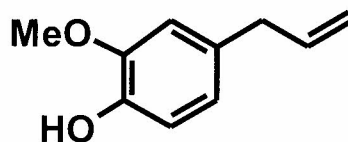
*elemicina (isolado)*  
Não testado



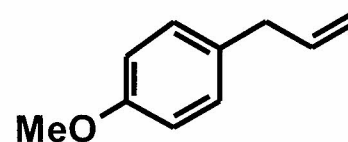
*metiliseugenol (padrão)*  
CL<sub>50</sub>=49,5 µg/mL



*metileugenol (padrão)*  
CL<sub>50</sub>=109,0 µg/mL



*eugenol (padrão)*  
CL<sub>50</sub>=36,8 µg/mL



*metilchavicol (padrão)*  
não testado

#### 4. Conclusão

Esse projeto avaliou a atividade larvicida de fenilpropanóides de estruturas químicas semelhantes com a presença de um anel benzênico com diferentes graus de oxigenação. Das substâncias testadas até o momento, a substância com maior padrão de oxigenação no anel aromático, foi aquela que apresentou a maior atividade larvicida. O dilapiol é um dos poucos fenilpropanóides naturais que apresentam esse padrão de oxigenação na natureza. Portanto, essa substância, que pode ser facilmente isolada de uma espécie que ocorre no Amazonas, a *Piper aduncum*, é um importante reagente na produção de novos inseticidas sintéticos.

## 5. Referências

- Fazolin, Murilo *et al.* 2005. Toxicidade do óleo de *Piper aduncum* L. a adultos de *Cerotoma tingomarianus* Bechyné (Coleoptera: Chrysomelidae). *Neotropical Entomology* [online], v. 34, n. 3, p. 485-489.
- Graça, Y.R., Oliveira, L.C.P., Tadei, W.P., Nunomura, S.M. 2004. *Atividade larvicida de alil - e propenilfenóis naturais*. In: 27a. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Salvador. Resumos da 27a. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, p.169.
- Pohlit, A. M., *et al.* 2004. *Screening of plants found in Amazonas State, Brazil, for activity against Aedes aegypti larvae*. *Acta amazônica*, v. 4, n.34.
- Silva, Wilson Castro; Ribeiro, J. D'arc; Souza, H. E. Menezes; Correa, R. S. 2007. Atividade inseticida de *Piper aduncum* L. (Piperaceae) sobre *Aetalion* sp. (Hemiptera: Aetalionidae), praga de importância econômica no Amazonas. *Acta Amazônica*, v. 37, n. 2.
- Simas, N.K., E.C. Lima, S.R. Conceição, R.M. Kuster & F.A.M. Oliveira. 2004. Produtos naturais para o controle da transmissão da dengue - atividade larvicida *Myroxylon balsamum* (óleo vermelho) e de terpenóides e fenilpropanóides. *Química Nova*, v. 27.
- Silva Hhg, Silva Ig, Oliveira Clns, Elias Cn. 1999. *Adaptação do Aedes aegypti (Linnaeus, 1762) em criadouros artificiais com água poluída*. *Entomologia y Vectores*, v. 6, p.383-391.
- Silva Hhg, Silva Ig, Oliveira Clns, Lira Ks. 1998. *Metodologia de criação, manutenção de adultos e estocagem de ovos de Aedes aegypti (Linnaeus, 1762) em laboratório*. *Revista de Patologia Tropical* v.27, p. 51-63.
- Stasti, L.C.D.1996. *Plantas medicinais: Arte e Ciência*. Universidade do Estado de São Paulo, São Paulo, p.147-154.