



Universidade Federal de Alagoas
Instituto de Química e Biotecnologia
Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia
PPGQB



PRODUTOS UTILIZADOS NO CONTROLE DO MOSQUITO
Aedes Aegypti L. (DIPTERA:CULICIDAE)

Karlos Antônio Lisboa Ribeiro Júnior

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas como requisito para a obtenção do Título de mestre em Química e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Euzébio G. Sant'Ana

Maceió - Alagoas
Novembro de 2007




**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA**

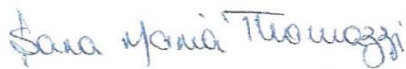
Instituto de Química e Biotecnologia
Universidade Federal de Alagoas
Tel. 55 82 3214-1384 Fax. 55 82 3214-1389
www.cpgqb@qui.ufal.br


Campus A. C. Simões
Tabuleiro dos Martins
57072-970
Maceió-AL
Brasil

Membros da Comissão Julgadora da Dissertação de Mestrado de Karlos Antônio Lisboa Ribeiro Júnior, intitulada: "**Produtos Utilizados no Controle do Mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)**", apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas em 14 de novembro de 2007, às 14h na sala de multimídias do bloco-13 da UFAL.

COMISSÃO JULGADORA


Prof. Dr. Antônio Euzébio Goilart Sant'Ana
Orientador – PPGQB/UFAL


Prof. Dr. Sara Maria Thomazzi
UFS


Prof. Dr. Iara de Barros Valentim
IQB/UFAL


Prof. Dr. Fernando Antônio Cavalcante de Mendonça
UNEB

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

- R484p Ribeiro Júnior, Karlos Antônio Lisboa.
Produtos utilizados no controle do mosquito *Aedes Aegypti* Linnaeus (Diptera: Culicidae) / Karlos Antônio Lisboa Ribeiro Júnior - 2007.
100 f. : il.
- Orientador: Antônio Euzébio Goulart Sant'Ana.
Dissertação (mestrado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2007.
- Inclui bibliografia.
1. Dengue. 2. Biomarcadores hepáticos. 3. Aminotransferase. 4. Testes de função hepática. I. Título.

CDU: 547.9

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por ter me guiado, me protegido e ter colocado pessoas iluminadas na minha vida.

Ao Prof. Dr Antonio Euzébio Goulart Sant'Ana pela orientação, paciência, Amizade, incentivo e ensinamentos imprescindíveis a realização deste trabalho.

Ao meu grande amigo Amaro de Mendonça Cavalcante presente em todos os momentos.

Aos professores: Dr. Chaléz Estevan, DRa Marilia Oliveira e DRa Sâmia Andricia pela colaboração e incentivo nesse trabalho.

Aos Amigos João Donato, André e Jéferson pelas boas horas de estudo e distração.

À minha namorada Katiane pelo apoio, compreensão por tanto momentos ausentes e incentivo.

Aos Alunos de iniciação científica Earlle, Airley e Silvio pela colaboração na manutenção da colônia.

À todos professores do programa de pós-graduação do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas pelos ensinamentos.

À todos os Amigos e colegas do laboratório de pesquisa em Produtos e Recursos Naturais (LPqRN). Ao João pesquisador da EMBRAPA pelas as análises estatísticas.

Aos técnicos Audi e Margarida pela atenção, colaboração e amizade.

À todos os amigos e parentes que sempre acreditaram no meu potencial e ajudaram direta ou indiretamente para a realização desse objetivo.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais:

Antônio Ribeiro e Maria Lisboa e aos meus irmãos: Paullo César , Macyo Roberto e Thyago Fernando. Sem eles eu nunca teria conseguido.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	ii
DEDICATORIA	iii
SUMÁRIO	iv,v
LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	viii
RESUMO	1
ABSTRACT	3
CAPITULO I: Introdução e Revisão de Literatura	
I - INTRODUÇÃO	5
II - REVISÃO DE LITERATURA	7
2.1 <i>Aedes aegypti</i> Linnaeus , 1758 e sua importância	7
2.2 Biologia	8
2.3 Distribuição no mundo	10
2.4 Distribuição no Brasil	11
2.5 Dengue no Mundo	11
2.6 Dengue no Brasil	15
2.7 Dengue em Alagoas	18
2.8 Controle Vetorial	18
2.9 Atividade Larvicida de Produtos oriundos de Plantas	20
III- REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	25
CAPITULO II : Objetivos	28
CAPITULO III:	
Artigo 1- Estudo fitoquímico e avaliação da atividade larvicida de diterpenos isolados de <i>Xylopija langsdorffiana</i> A. St. Hil. & Tul (Annonaceae) sobre <i>Aedes aegypti</i>	30
Resumo	31
Abstract	31
Introdução	32
Resultados e discussão	33
Experimental	38
Referências	42
Material Complementar	44

CAPITULO IV:

Artigo 2 - Atividade de Naftoquinonas Sobre as Larvas Do <i>Aedes Aegypti</i> , O Vetor Da Dengue	47
Resumo	48
Abstract	48
Introdução	49
Material e Métodos	53
Resultados	55
Discussão	59
Referências	62
Material Complementar	65

CAPITULO V:

ARTIGO 3 - Atividade Larvicida De Extratos Obtidos da <i>Turbina cordata</i> (Choisy) Austin & Staples (Convolvulaceae) (Díptera:Culicidae)	66
Resumo	66
Abstract	67
Introdução	68
Material e Métodos	70
Resultados e Discussão	72
Conclusão	76
Referências	77
Material Complementar	80

CAPITULO VI

ARTIGO 4 - Atividade Larvicida de Terpenóides e Fenilpropanóides frente às larvas de <i>Aedes Aegypti</i> L.	85
Resumo	86
Abstract	86
Introdução	87
Material e Métodos	89
Resultados e Discussão	90
Conclusão	97
Referências	98

Lista de figuras

Capítulo I (Introdução e revisão de literatura)	5
Figura 1. Fêmea adulta de <i>A. aegypti</i>	7
Figura 2. Ciclo biológico do <i>Aedes aegypti</i>	8
Figura 3. Distribuição geográfica do <i>A. aegypti</i> nos anos de 1970, 1997 e 2002	11
Figura 4. Áreas do planeta com risco de transmissão em 2006.	13
Figura 5. Casos De Dengue Reportados Pela WHO Para Os Continentes.	15
Figura 6. Casos Notificados de Dengue por Semana Epidemiológica segundo Região, Brasil, 2006-2007.	17
Figura 7. Distribuição dos estados por ares de incidência, Brasil, 2007	17
Figura 8. Descrição de alguns compostos com atividade Larvicida.	24
Capítulo II (objetivos)	
Capítulo III (Artigo 1)	
Capítulo IV (Artigo 2)	
Capítulo V (Artigo 3)	
Figura 1. fórmulas estruturais da Swainsonina	69
Capítulo VI (Artigo 4)	

LISTA DE TABELAS

Página

Capítulo 1 (Introdução e revisão de literatura)

Tabela 1. Taxas de incidências dos casos notificados de Dengue por residência, Brasil, 2007. 16

Capítulo 2 (Artigo 1)

Tabela 1. Valores CI_{10} , CI_{50} e CI_{90} de diterpenos para *Xylopija langsdorffiana* St-Hil & Tul sobre *Aedes aegypti*. 34

Tabela 2. Percentual médio de mortalidade devido ao efeito dos diferentes tratamentos. 37

Capítulo 3 (Artigo 2)

Tabela 1. Valores CI_{10} , CI_{50} e CI_{90} de Quinonas sobre *Aedes aegypti*. 56

Tabela 2. Percentual médio de mortalidade devido ao efeito dos diferentes tratamentos. 60

Capítulo 4 (Artigo 3)

Tabela 1. Porcentagem de mortes, em testes de atividade contra a larva do mosquito *A. aegypti* de folhas e caule da espécie *Turbina cordata* com indicação dos extratos e das concentrações utilizadas. 72

Tabela 2 – Percentual médio de mortalidade devido ao efeito dos diferentes tratamentos. 73

Tabela-3 Resultados da prospecção fitoquímica em extratos *Turbina cordata*(Choisy) Austin & Staples 75

Capítulo 5 (Artigo 4)

Tabela 1 – Percentual médio de mortalidade devido ao efeito dos diferentes tratamentos. 92

Tabela 2 – Percentual médio de mortalidade devido ao efeito dos diferentes tratamentos. 96

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Den-1 : Sorotipo 1 do vírus do dengue

Den-2 : Sorotipo 2 do vírus do dengue.

Den-3 : Sorotipo 3 do vírus do dengue.

Den-4 : Sorotipo 4 do vírus do dengue.

DC : Dengue Clássica.

FHD : Febre Hemorrágica da Dengue.

SCD : Síndrome do Choque da Dengue.

WHO : World Health Organization

SVS: Secretaria De Vigilância Sanitária

S.E: Semana epidemiológica

SESAU :Secretaria Estadual de Saúde do Estado de Alagoas

PEAa: Plano Diretor de Erradicação do *Aedes aegypti* no Brasil

PNCD: Programa Nacional de Controle da Dengue

CL₁₀ : Concentração do componente em solução que matou 10% do organismo alvo.

CL₅₀ :Concentração do componente em solução que matou 50% do organismo alvo.

CL₉₀ :Concentração do componente em solução que matou 90% do organismo alvo.

Ppm: Partes por milhão

mg: Miligramas

µg : micrograma

mL: mililitro

MeOH: Metanol

EtOH: Etanol

ACoEt: Acetato de etila

DMSO: Dimetilsulfóxido

pH:Potencial hidrogeniônico

g :gramas

CCD: Cromatografia em camada delgada

L₁: Primeiro instar larval

L₂: segundo instar larval

L₃: Terceiro instar larval

L₄: Quatro instar larval

DDT : Dicloro-Difenil-Tricloroetano

BHC: hexaclorocicloexano

EMBRAPA: Empresa Brasileira de pesquisa Agropecuária.

RESUMO

Em vista das crescentes dificuldades no controle de mosquitos com inseticidas químicos sintéticos em função do surgimento de resistência e da toxicidade em mamíferos, tem sido dada ênfase à busca por novos compostos oriundos de plantas, estes acreditam-se poder oferecer maior seletividade aos mosquitos, uma baixa toxicidade e maior biodegradabilidade, além de estarem amplamente disponíveis na natureza. Assim o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade larvicida de diversos compostos de origem natural.

A metodologia utilizada nos bioensaios larvicida segue a recomendada pela WHO. Os bioensaios iniciais, foram realizados com larvas do *Aedes aegypti* 4º instar, feitos em quatro repetições com 25 larvas, em copos descartáveis de 250 mL contendo 25 mL de solução. As larvas foram consideradas mortas quando não conseguiam atingir a superfície da solução quando o recipiente foi agitado.

Dando continuidade ao objetivo do LPqRN de desenvolver um larvicida para controle do *A. aegypti*, avaliamos extratos de plantas, compostos isolados de origem sintética na busca de candidatos a larvicida para uso no controle do mosquito na sua forma larval.

No primeiro capítulo é descrito a atividade de quatro diterpenos isolados da *Xylopija langsdorfiana* St-Hil & Tul, dentre estes destacaram-se os ácidos *ent-7 α -acetoxitraquiloban-18-óico* e o *ent-7 α -hydroxitraquilobano-18-óico*, que demonstraram alto potencial larvicida apresentando concentrações letais comparáveis à da rotenona, inseticida de origem vegetal bastante conhecido. No segundo capítulo foi verificado a atividade larvicida de onze quinonas. Estas representam, uma excelente alternativa para o controle do *Aedes aegypti*. A 3-Bromo-5-hidroxy-1,4-naftoquinona destacou-se entre as quinonas testadas, apresentando menor concentração letal.

Já no terceiro capítulo foi avaliado a atividade dos extratos etanólicos obtidos a partir da folha, caule, raiz, ramos novos e tubérculos da *Turbina cordata*. Destacaram-se os extratos etanólicos da folha e do caule mesmo assim os valores são baixos quando comparados à atividade de outros extratos de plantas da

mesma família. Entretanto no quarto capítulo foi avaliado a atividade larvívica dos terpenóides e fenilpraponóides, componentes comumente encontrados em diversos óleos essenciais. Das substâncias avaliadas destacou-se o limoneno.

Estes resultados ressaltam as potencialidades de alguns dos compostos avaliados como possíveis agentes larvívicos naturais.

ABSTRACT

In face of the increasingly difficult control of mosquitoes with synthetic chemical insecticides due to the appearance of resistance and their toxicity to mammals, the search for new phytochemicals has been emphasized as it is believed that they may offer a larger selectivity to mosquitoes with lower toxicity and larger biodegradability, besides being largely available in nature. Thus, the objective of this work was to evaluate the larvicidal activity of several natural compounds.

The methodology used in the larvicidal bioassays followed WHO's recommendations. The initial bioassays were carried out with 25 4th-instar *Aedes aegypti* larvae in four repetitions in 250-mL disposable plastic cups with 25 mL of solution. The larvae were considered dead if they could not reach the surface of the solution when the recipient was agitated.

In consonance with the objective of the LPqRN of developing a larvicidal for the control of *A. aegypti*, we evaluated the plants extracts, synthetic and isolated compounds from plants in the search of a potential larvicidal for use in the control of the mosquito in its larval phase.

In the first chapter, it is described the activity of four diterpenes isolated from *Xylopija langsdorffiana* St-Hil & Tul. The acids *ent-7- α -acetoxyrachiloban-18-oic* and *ent-7- α -Hidroxytrachiloban-18-oic* stood out, demonstrating high larvicidal potential and lethal concentrations comparable to that of rotenone, a well-known vegetable insecticide. The second chapter describes the evaluation of the larvicidal activity of eleven quinones. They represent an excellent alternative for the control of *Aedes aegypti*. Compound 3-bromo-5-hydroxy-1,4-naphthoquinone stood out among the quinones tested for its low lethal concentration.

The third chapter reports on the evaluation of the activity of the ethanolic extracts obtained from the leaves, stem, roots, twigs, and tubers of *Turbina cordata*. Despite the low activity values of the leaf and stem ethanol extracts comparatively to those of other extracts of the plants of the same family, they still are outstanding. Furthermore, the fourth chapter reports on the larvicidal activity of terpenoids and phenylpropanoids, compounds commonly found in several essential oils. Limonene stood out among the substances evaluated.

These results point to the potential of some of the compounds evaluated as natural larvicidals.

I - INTRODUÇÃO

O mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) foi introduzido no Brasil durante o período colonial. Devido à sua importância como vetor da febre amarela, foi intensamente combatido em nosso território tendo sido considerado erradicado em 1955 (Consoli & Oliveira, 1994). Porém o mesmo combate não foi realizado nos países vizinhos. O que proporcionou sua reintrodução no Brasil em 1967, e do primeiro registro de ocorrência do *Aedes albopictus* (Skuse), no Brasil, em 1986, o estudo dos mosquitos pertencentes a família Culicidae tornou-se mais necessário. Além disso, o recrudescimento da malária e os surtos frequentes de arboviroses transmitidas especialmente por dípteros das tribos Sabethini e Culicini, faz com que se priorize o estudo dos culicídeos (Neves, 2000). A dispersão do *A. aegypti* acompanhou a movimentação humana e a sua proliferação foi beneficiada pelas modificações antrópicas do meio ambiente. Esse mosquito é o mais associado ao homem, criando-se nos mais diversos ambientes artificiais resultantes, na maioria das vezes, do lixo urbano.

O *A. aegypti* atua como vetor da febre amarela na América Central, na América do Sul e no Oeste da África. Este mosquito é também um dos vetores da dengue, que é endêmica no Sudoeste da Ásia, ilhas do Pacífico e Américas (Ciccia & Mongelli, 2000).

A dengue é uma doença infecciosa causada por um arbovírus e transmitida de uma pessoa doente a uma pessoa sadia através da picada da fêmea do mosquito *A. aegypti* contaminada (Santiago *et al*, 2005). A dengue é considerada atualmente a arbovirose mais importante no mundo, com estimativa de 50 milhões de infecções por ano. Vários fatores são responsáveis pelo ressurgimento dessa doença em vários países: crescimento sem precedente da população humana, urbanização não controlada, abastecimento de água e tratamento de resíduos inadequados, aumento da densidade e da distribuição dos mosquitos vetores e também disseminação dos vírus da dengue, ausência de um controle efetivo do mosquito e deterioração da infra-estrutura da saúde pública (Torres, 2005).

Devido a sua grande dispersão no ambiente urbano, o *A. aegypti* tem sido amplamente combatido com inseticidas químicos. O uso de inseticidas organoclorados ou organofosforados de ação residual, como o Dicloro-Difenil-Tricloroetano (DDT), Hexaclorocicloexano (BHC), e posteriormente Dieldrin, para ataque de formas adultas do vetor, mostraram no início bons resultados, mas em pouco tempo esses produtos tornaram-se ineficazes contra os vetores (Neves, 2000). A elasticidade e a adaptabilidade da natureza são a principal causa do fracasso dos inseticidas de largo espectro. Os inseticidas naturais degradam-se com maior velocidade que os sintéticos; não deixando resíduos no alimento ou no ambiente. Inseticidas naturais como o piretro, originalmente extraído das folhas de *Chrysanthemum* apresentam baixa toxicidade em mamíferos e ação contrária em insetos; os rotenóides extraídos de plantas do gênero *Derris* e *Lonchocarpus*; e os limonóides que possuem ação fagoinibidora e podem também interferir no crescimento do inseto, são encontrados nas famílias Meliaceae e Rutaceae (Macêdo *et al.*, 1997 ; Ferreira *et al.*, 2001).

Em vista das crescentes dificuldades no controle de mosquitos com inseticidas químicos sintéticos em função do surgimento de resistência, da toxicidade em mamíferos, tem sido dada ênfase à busca por novos compostos oriundos de plantas, estes acreditam-se poder oferecer maior seletividade aos mosquitos, baixa toxicidade em mamíferos e maior biodegradabilidade, além de estarem amplamente disponíveis na natureza.

II - Revisão Bibliográfica

2.1 Sistemática e Biologia do *Aedes aegypti* (Linnaeus , 1758)

O *Aedes aegypti* (figura 1) é o principal transmissor do vírus da dengue e da febre amarela urbana no mundo (Neves, 2000). Ele é facilmente identificado pelo escudo com faixas branco-prateada formando um desenho em forma de lira, e possui clipeo com dois tufos de escamas branco-prateadas (Marcondes, 2001). Os adultos são escuros ou praticamente negros embora de tonalidade um tanto variável desde a marrom claro (Forattini, 2002). Pertence ao filo Arthropoda, a classe Insecta, que comporta o maior número de espécie deste filo e dos demais conhecidos, compreendendo cerca de 60% das espécies de animais. A ordem de maior importância médica e veterinária, a Díptera, se enquadrando na Família Culicidae e Subfamília Culicinae (Leventhae & Cheadle, 1997).

A sistemática do *A. aegypti* é a seguinte:

Filo	Arthropoda
Classe	Insecta
Ordem	Díptera
Subordem	Nematocena
Família	Culicidae
Sub família	Culicinae
Tribo	Culicini
Gênero	<i>Aedes</i>
Espécie	<i>Aedes aegypti</i> L.



Figura 1. Fêmea adulta de *A. aegypti* Fonte: www.med.sc.edu:85/mhunt/dengue-aedes.jpg

A família Culicidae (latim Culex = mosquito) apresenta o maior número e as mais importantes espécies hematófagas, além de possuírem grande adaptabilidade biológica, variabilidade genética, e ampla valência ecológica. É uma família com grande número de espécie (cerca 3600), distribuídas por todas as regiões do globo. Algumas dessas espécies são membro da sub família Culicinae, pertencentes a tribos Culicini, Sabethini e Aedini que atinge de forma mais grave os países pobres e os em desenvolvimento, principalmente nos trópicos. A tribo culicini possui dois gêneros importantes, *Haemagogus* e *Aedes*, respectivamente, vetor da febre amarela silvestre e urbana e da dengue (Consoli & Oliveira, 1994). No Brasil, existem cerca 500 espécies descritas, das quais pouco mais de 20 têm importância médico-veterinário, podendo estas serem vetores de algumas doenças (Neves, 2000).

2.2 Biologia

O vetor da dengue é um inseto holometabólico, passa por quatro estágios biológicos distintos (Figura 2): ovo, larva (com quatro estádio = L₁, L₂, L₃ e L₄), pupa e adulto (Marcondes, 2001).

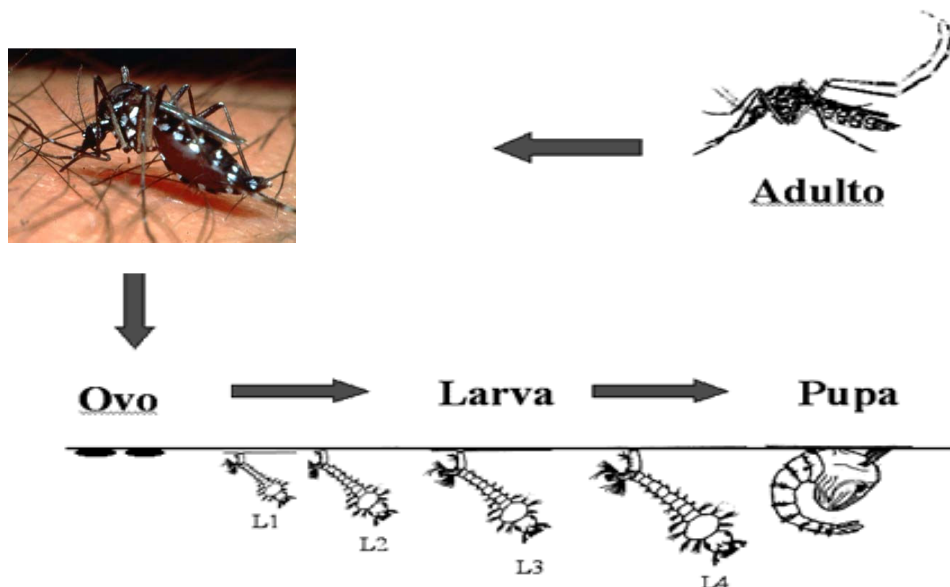


Figura 2. Ciclo biológico do *Aedes aegypti* Fonte: [www.cdc.gov/dvbid/dengpics htm](http://www.cdc.gov/dvbid/dengpics.htm).

Após a cópula, as fêmeas armazenam os espermatozóides em espermatecas. A fecundação dos óvulos vai-se processando à medida que a fêmea necessita. As fêmeas fecundadas têm a necessidade de alimento sanguíneo, para que ocorra a maturação dos ovos. Os ovos do *A. aegypti* medem cerca de 1mm, são fusiformes e alongados e depositados pelas fêmeas nos mais diversos recipientes e ambientes (Marcondes, 2001).

A fase larvária do mosquito é o período de crescimento e de intensa alimentação do inseto. A duração do tempo entre cada um dos quatro ínstaras depende de fatores como: temperatura, disponibilidade de alimento e densidade da população dentro do criadouro. Na fase seguinte, chamada de pupa, ocorre as modificações mais significativas para a formação do adulto, nesta fase não há alimentação (Marcondes, 2001).

O adulto é a forma reprodutiva do *A. aegypti* na qual as fêmeas se alimentam de sangue no horário diurno, com pico de maior atividade alimentar ocorre no amanhecer e pouco antes da tarde. As fêmeas realizam a oviposição em criadouros artificiais, geralmente em pequenas coleções de água limpa e parada, localizadas nas proximidades das residências urbanas. Contudo o *A. aegypti* também se desenvolve em água poluída. Nesse caso a oviposição é feita nas paredes dos recipientes, imediatamente acima da superfície da água, onde os ovos podem ser vistos como pequenos pontos escuros (Marzochi, 1994; Gubler, 1998; Silva *et al.*, 1998; Silva *et al.*, 1999; Silva *et al.*, 2002; Forattini & Brito, 2003).

Os machos não se alimentam de sangue, mas sim de néctar, mas podem ser encontrados juntos as fêmeas para o acasalamento. O número de posturas de cada fêmea dependerá fundamentalmente da disponibilidade de sangue ingerido para o desenvolvimento ovariano, o repasto completo implica em cerca de 3,0 a 3,5 mg de sangue. Logicamente, desde que cada fêmea possa realizar mais de uma postura e desde que haja sangue em quantidade satisfatória, deduz-se que o número de ovos produzido por um indivíduo é considerável grande. Todavia, em condições naturais ocorre grande mortalidade do inseto, fato que contribui para diminuir consideravelmente o número de oviposições. Em média, uma fêmea produz 120 ovos (Forratini, 2002 ; Neves, 2000).

2.3 Distribuição no mundo

O *A. aegypti* é uma espécie oriunda do velho mundo, Etiópia e Egito, (Consoli & Oliveira, 1994). Sendo assim, trata-se de mosquito classicamente tido como tropical e subtropical. Segundo localização, pode-se considerá-lo como distribuído entre os paralelos de 45° de latitude norte e 40° de latitude sul. Raramente este inseto é encontrado além desses limites e mesmo quando observando próximo a eles, dificilmente tende a se manter como população estável. É o que se tem verificado em latitudes extremas do limite setentrional (Cookman & Lebrun, 1986; Christie & Lebrun, 1990).

Tal distribuição, beirando o cosmopolitismo, resulta do concurso por parte da atividade humana. Em decorrência e especialmente nas regiões que sofreram a invasão desse culicídeo, a presença do mosquito assume o aspecto pontilhado, ou seja, com focos delimitados, entre os quais podem se intercalar regiões aonde ele está ausente. Não obstante, essa ausência poderá ser considerada como temporária, uma vez que sempre existirá o potencial de se instalarem populações desse vetor. Assim, de maneira obviamente acidental, os meios de transporte cada vez mais rápidos, tanto por via aérea, marítima ou terrestre, podem apresentar sempre o potencial de darem lugar a focos do mosquito. Assim sendo, no estado atual dos conhecimentos menciona-se apenas o nome específico de *A. aegypti*. Contudo, no que concerne à região afrotropical, haverá de se considerar a variedade *formosus* como limitada especialmente à parte oriental do continente africano, meridional ao deserto do Saara. Nas Américas, o *A. aegypti* é considerado como clássico vetor da dengue e da febre amarela, esta em sua forma epidemiológica urbana e rural (Forattini, 2002).

2.4 Distribuição no Brasil

O *A. aegypti* foi introduzido no Brasil durante o período colonial, provavelmente na época do tráfico de escravos. Foi erradicado diversas vezes no Brasil, ou, acreditava-se que tivesse sido. No entanto, alguns países da porção norte da América do Sul, Estados Unidos e Cuba, não o erradicaram, servindo assim de reservatório, provocando sua reintrodução no Brasil. A figura abaixo mostra situação relativa a infestação do *A. aegypti* nos anos 1930, 1970 e 2002 (Figura 3). Em 1977, foi reintroduzido na cidade de Salvador (BA), e logo foi detectado, na cidade do Rio de Janeiro (RJ), além de outras cidades litorâneas. O combate, realizado de maneira esporádica, não foi eficiente acarretando surtos de dengue no Brasil (Consoli & Oliveira, 1994).

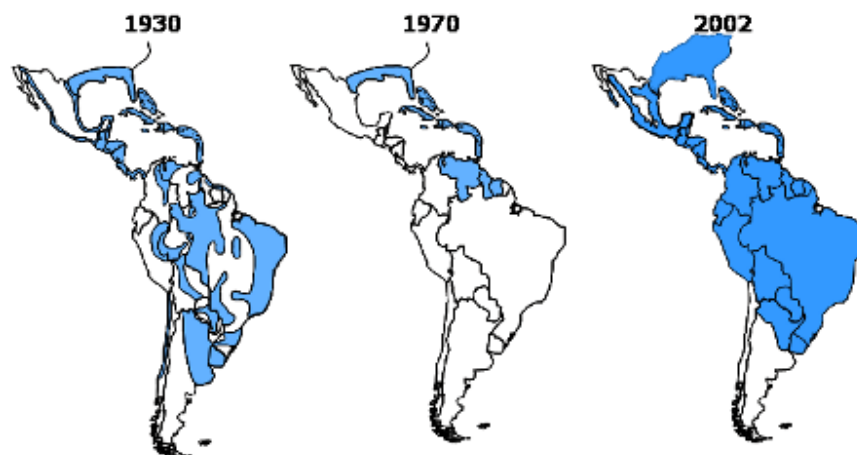


Figura 3. Distribuição geográfica do *A. aegypti* nos anos de 1930, 1970 e 2002

2.5 A Dengue no mundo

A dengue constitui hoje a doença viral humana mais importante transmitida por mosquitos pertencentes ao gênero *Aedes*. O principal vetor é a espécie *A. aegypti*, também vetor da febre amarela urbana, embora outras espécies como *A. albopictus* (Skuse, 1894) e *A. polynesiensis* (Marks, 1951), possam estar envolvidas na transmissão destas doenças (Guzman & Kouri, 2001).

A dengue foi descrita desde 1779-1780 entretanto, essa é uma hipótese baseada na ocorrência de doenças com sintomas semelhantes relatados em alguns continentes. O vírus da dengue é um complexo antigênico do gênero flavivirus, família flaviviridae com quatro sorotipos conhecidos (Den-1, Den-2, Den-3 e Den-4). Este agente tem formato esférico de 40-60nm de diâmetro, tem um envelope de lipídeo genoma viral de aproximadamente 11kb de comprimento cujo genoma é constituído de RNA de fita simples (Racz, 2004; Stephenson, 2005). Esse agente pode causar a Dengue Clássica (DC) e a Febre Hemorrágica da Dengue (FHD). Esta última pode evoluir para uma forma mais severa conhecida como Síndrome do Choque da Dengue (SCD). No início do século passado, a dengue foi associada a um agente infeccioso filtrável como agente etiológico da doença. Durante a Segunda Guerra Mundial foram isolados os dois primeiros sorotipos do vírus da dengue (DEN-1 e DEN-2) e, em 1956, ocorreu em Manilha uma epidemia de dengue hemorrágica, onde foram isolados mais dois sorotipos que foram denominados DEN-3 e DEN-4 (SANTOS, 2003).

A transmissão da dengue ao homem ocorre através da picada da fêmea de *A. aegypti* infectada com um dos quatro sorotipos do vírus. Após 8 a 12 dias da infecção ocorre a incubação, a replicação e a disseminação do vírus por todo o corpo do mosquito. A fêmea pode passar por ciclos de reprodução durante o período de incubação e replicação do vírus, dando a ele a oportunidade de entrar no ovo e de ser passado para a prole por uma transmissão vertical (Monath, 1994).

A infecção por um sorotipo provê imunidade vitalícia para aquele vírus, mas a proteção cruzada para outro sorotipo é apenas passageira, o que torna possível ocorrer uma infecção seqüente por outro sorotipo (Monath, 1994; Schatzmayr, 2000; Derouich et al., 2003).

A dengue clássica caracteriza-se principalmente por febre, que pode ter início repentino ou ser antecedida por alguns sintomas como: mal-estar; calafrios e cefaléia; mialgia (dor muscular) e artralgia (dor articular); linfadenopatia, processo patológico que afeta os linfonodos, exantema, erupção cutânea que desaparece com a descamação; náuseas; vômitos; anorexia; adinamia (grande fraqueza muscular); e manchas na pele. Raramente a dengue clássica leva ao óbito (Brooks *et al.*, 2000;

Santos, 2003; Rodriguez, 2004; Nascimento, 2006). No adulto, a doença tem uma duração média de dez dias e em crianças de pouca idade, em média, três dias (Brooks *et al.*, 2000).

A dengue hemorrágica é caracterizada por quatro manifestações clínicas principais: febre elevada, hemorragia, hepatomegalia e insuficiência circulatória (Santos, 2003; Rodriguez, 2004). Esta síndrome pode ser observada em indivíduos com anticorpos heterólogos contra a dengue adquirida, em infecções anteriores causadas por outros sorotipos do vírus ou de forma passiva (anticorpos maternos) (Brooks *et al.*, 2000).

Aproximadamente 1,3 bilhões de pessoas estão em risco constante de infecção principalmente em países tropicais cuja temperatura e umidade favorecem a proliferação do mosquito vetor, que pertence aos culicídeos do gênero *Aedes* (Furtado *et al.*, 2005, Costa *et al.*, 2005). Em 2006 a WHO lançou um mapa com as regiões do planeta onde são consideradas de risco para transmissão da dengue (Figura - 4).



Figura 4. Áreas do planeta com risco de transmissão em 2006.
Fonte:www.who.it

Estima-se que no mundo, anualmente, cerca de 50 à 100 milhões de pessoas são infectadas pelo vírus da dengue, por volta de 500 mil evoluem para dengue hemorrágica e cerca de 12 mil vão a óbito (Stephenson, 2005; Teixeira *et al.*, 2005).

A doença é endêmica nas Américas, sul da Ásia, oeste Pacífico, África e Oriente Médio, com o maior número de incidências nas três primeiras regiões citadas (Figura 5).

A temperatura (isotermas de 10 °C em latitudes norte e sul) impõe limites à distribuição de dengue no mundo. Projeções de elevação de 2 °C da temperatura para o final do século XXI provavelmente aumentarão a extensão da latitude e altitude da distribuição do dengue no planeta. Como consequência, espera-se a ampliação do período de transmissão sazonal, a diminuição da idade média de infecção primária e secundária, e o aumento dos casos de reinfecção, de febre hemorrágica do dengue e de síndrome do choque do dengue em populações ainda pouco acometidas (Jetten, 1997). A influência da temperatura na transmissão do dengue foi largamente investigada, pois interfere nas atividades de repasto sanguíneo das fêmeas dos mosquitos, em sua longevidade e no período de incubação extrínseco do vírus. Principalmente as temperaturas mínimas registradas no dia, mais que as médias diárias, foram associadas à transmissão de dengue sazonal em Bangkok.

Em estudo epidemiológico realizado no México por Koopman *et al.*, (1991) verificou que a temperatura média durante a estação chuvosa correspondeu ao mais forte preditor de infecção por dengue naquele país. Modelo matemático estimou o período de incubação extrínseco do vírus a 22°C de 16,67 dias e a 32°C de 8,33 dias ou seja, fêmeas infectadas submetidas a elevadas temperaturas (32°C) teriam 2,64 vezes mais chance de completar o período de incubação extrínseco do que aquelas submetidas a baixas temperaturas (Donalísio & Glasser; 2002).

Durante os últimos oito anos a incidência de dengue tem crescido nas áreas endêmicas, particularmente nas Américas, entretanto nos últimos três anos tem aumentado o número de casos fatais no Sudeste da Ásia e regiões do Sudeste do Pacífico.

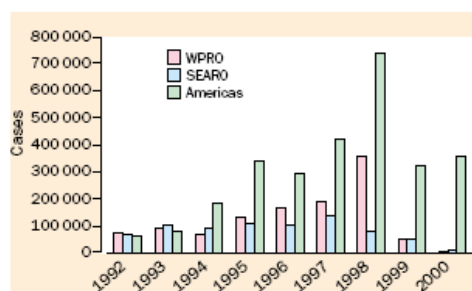


Figura 5. Casos de dengue reportados pela WHO para os continentes entre 1992 e 2000. Fonte:www.who.it

Em 1981, a dengue ressurgiu em Boa Vista, Roraima, envolvendo os vírus sorotipos 1 e 3 que circulavam na América Sul e Central na ocasião. Porém, foi com a extensa epidemia de 1986 no Rio de Janeiro e a disseminação para regiões vizinhas que as ações de vigilância e controle dos vetores do dengue tornaram-se prementes no Brasil. Estas ações foram sendo organizadas pelo Ministério da Saúde (MS), Secretarias Estaduais de Saúde e municípios em regiões acometidas, de forma heterogênea e intermitente. A partir de 1997, com o Plano Diretor de Erradicação do *Aedes aegypti* no Brasil (PEAa), seguido pelo Plano de Intensificação das Ações de Controle de Dengue, o MS aumentou o repasse de recursos a municípios brasileiros para descentralizar e reorganizar ações de eliminação dos vetores e educação em saúde (Donalísio & Glasser; 2002).

2.6 A Dengue no Brasil

No Brasil, durante os quatro primeiros meses de 1998 - período do verão no hemisfério sul - cerca de 234.828 casos foram notificados, tornando o país responsável por 60% de todos os casos registrados nas Américas (Wandscheer *et. al.*, 2004). Em 2002 esse valor cresceu para 791.245 casos notificados e então começou a decair, chegando a 117.519 casos notificados em 2004; número que voltou a crescer em 2005, atingindo 248.189 casos.

Segundo a Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde -SVS/MS registrou até semana epidemiológica nº 18 (abril), deste ano de 2007, **246.833** casos de D.C., **288** casos de F.H.D. e a ocorrência de **38** óbitos. Ou seja em menos de quatro meses desse ano o número já foi maior que o ano de 2005.

Ao compararmos janeiro a abril de 2007 com o mesmo período do ano anterior, verifica-se um aumento de 20% dos casos de dengue no país, com o mês de março registrando o maior número de notificações no período.

Importante destacar que, no mês de abril, observa-se a redução do número de casos de dengue no país em relação ao mês de março. Com os dados notificados pelas Secretarias Estaduais de Saúde até o presente momento, em abril houve uma redução de 53% nas notificações quando comparado com o mês de março (Figura 6). O declínio das notificações no mês de abril é observado em todas as regiões com destaque para as regiões Sudeste (-62%) e Centro-Oeste (- 61%).

O Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD) caracteriza as áreas do país de acordo com a taxa de incidência:

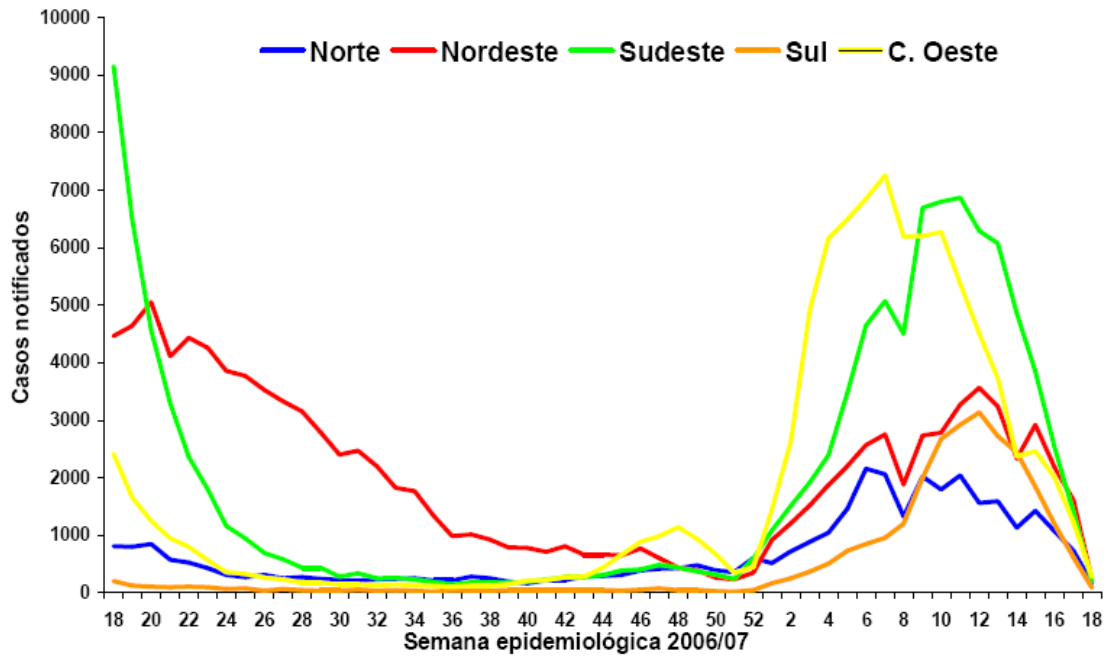
- Áreas de baixa incidência: regiões, estados ou municípios com taxa de incidência menor que 100 casos por 100.000 habitantes;
- Áreas de média incidência: regiões, estados ou municípios com taxa de incidência entre 100 e 300 casos por 100.000 habitantes;
- Áreas de alta incidência: regiões, estados ou municípios com taxa de incidência maior que 300 casos por 100.000 habitantes.

A análise das taxas de incidências por região demonstra alta incidência na Região Centro-Oeste, média incidência na Região Norte e baixa incidência nas Regiões Nordeste, Sudeste e Sul (Tabela 1, Figura 6). A situação mais detalhada do nível de transmissão por unidade federada e municípios que estão concentrando o maior número de notificações é apresentada abaixo, no descritivo por regiões.

Tabela 1 -Taxas de incidências dos casos notificados de dengue por residência ,Brasil, 2007.

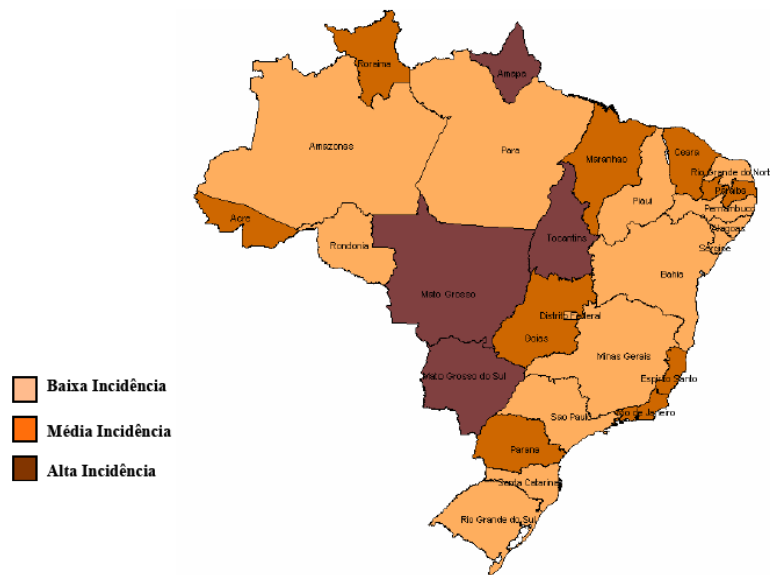
Regiões	Taxas de Incidência /100.000 habitantes	Incidência
Centro-Oeste	654,8	Alta
Norte	153,5	Média
Nordeste	75,8	Baixa
Sudeste	85,6	Baixa
Sul	88,9	Baixa
Brasil	129,5	Média

Fonte: SVS/SES (Dados até SE 18, sujeitos a alteração)



Fonte: Secretarias de Estado da Saúde

Figura- 6 Casos notificados de dengue por semana epidemiológica por região, Brasil, 2006-2007



Fonte: SVS/SES (Dados até SE 18, sujeitos a alteração)

Figura – 7 Distribuição dos estados por ares de incidência, Brasil, 2007 Fonte: SVS/SES (Dados Até SE 18, sujeitos a alteração)

2.7 Dengue em Alagoas

Desde a reintrodução do *A. aegypti* no Brasil nos anos 80, Alagoas vem sofrendo várias epidemias de dengue. No ano de 1981 houve uma grande epidemia no Brasil tendo atingido vários estados entre eles Roraima e Alagoas (Osanai *et al.*, 1983).

Alagoas em 2007, já registrou um aumento de 30% no número de casos suspeitos de dengue em comparação ao mesmo período do ano passado (Janeiro a Abril). Em 2006, o Estado tinha notificado até o mês de maio 1003 casos já em 2007, nesse mesmo período mais de 1300 casos de dengue foram notificados. Os municípios com maior incidência em números absolutos são Teotônio Vilela, com 578 casos notificados; Maceió, com 577; Maragogi, 236, e Matriz do Camaragibe, com 149 notificações. Os números foram divulgados recentemente pela coordenadora de vigilância epidemiológica do Estado (SESAU-AL, 2007).

2.8 Controle Vetorial

Um dos problemas, com relação ao vírus da dengue, é o fato de não existir vacina disponível para a prevenção da doença, já que poderia acarretar no agravamento da doença para a febre hemorrágica da dengue, entretanto, duas vacinas estão em estágios avançados de testes. Por este motivo, o controle da dengue ainda é baseado na erradicação dos mosquitos transmissores do vírus (Bobadilla *et al.*, 2005 , Stephenson, 2005).

O controle do *A. aegypti* tem constituído um importante desafio, especialmente nos países em desenvolvimento. Segundo Halstead, (2002) mesmo em situações em que os recursos destinados ao controle do vetor são apropriados para a implementação do programa, muitas vezes não se tem alcançado sucesso, em função principalmente de cinco fatores: desejo de encontrar soluções fáceis, perda de habilidades técnicas e gerenciais do pessoal responsável pelo programa, agravamento da dimensão do problema, desconsideração de experiências passadas

e expectativa de fracasso, espelhada em outras experiências mal sucedidas no controle de dengue e de outras doenças transmitidas por insetos vetores.

Nas últimas décadas, vem sendo reiterada a recomendação do controle integrado do *A. aegypti* com implementação descentralizada, envolvendo o poder público e a sociedade. Esse tipo de estratégia teria maior sustentabilidade que aquelas verticais centralizadas e baseadas em um único método (Donalísio & Glasser, 2002).

No controle integrado do *A. aegypti*, as medidas preventivas são direcionadas principalmente aos criadouros, constituindo-se de ações simples e eficazes, especialmente aquelas que consistem em cuidados a serem adotados pela população. A tecnologia atualmente disponível abrange medidas de controle físico, químico e biológico, sendo os dois primeiros grupos mais intensamente utilizados (PAHO, 2005).

Dentre as medidas de controle utilizadas contra os mosquitos vetores da dengue, podem ser citadas medidas de controle químico com ação larvicida em formulação com liberação lenta que vem sendo empregada mundialmente, destacando-se o Temefós como o larvicida de mais ampla utilização (tratamento focal). A maioria dos programas de controle do *A. aegypti* emprega duas modalidades de controle químico adulticida: a borrifação de inseticida de ação residual denominada de tratamento perifocal, indicada para uso rotineiro específico em imóveis que, além de concentrarem muitos recipientes em condições que favorecem a proliferação das formas imaturas, contribuem para a dispersão passiva do vetor (FNS, 2001) e a aplicação espacial de inseticida a ultra baixo volume (UBV), indicado para situações de transmissão.

O controle biológico é feito através de *Bacillus thuringiensis* e *B. sphaericus*, de peixes larvívoros e outros, adicionados aos depósitos domésticos de água (Donalísio & Glasser, 2002; Claro et al., 2004); a aplicação de multas para controlar os focos, como foi utilizado em Cuba e Cingapura; campanhas informativas, mas estas possuem eficácia limitada (Claro et al., 2004,); a utilização de métodos genéticos, onde machos são esterilizados e soltos no ambiente é uma outra medida. Outro método seria a produção de cepas não suscetíveis a agentes de doenças,

visando substituir as populações locais por essas cepas refratárias. No entanto, ainda não foi possível incorporar nenhum desses métodos em programas de controle (Donalísio & Glasser, 2002).

2.9 Atividade Larvicida de Produtos oriundos de Plantas

Das larvas de mosquito de importância médica, três gêneros são mais estudados: *Aedes*; *Anopheles* e *Culex*. Todos apresentam sensibilidade em maior ou menor escala para alguns produtos fitoquímicos.

A atividade dos produtos de plantas sobre larvas de mosquitos causadores de doenças pode variar significadamente dependendo da espécie da planta, parte da planta, idade da planta, solvente utilizado para extração e da espécie de mosquito (Shaallan *et al.* 2003). A maioria dos estudos em fitoquímica foca em plantas com atividade medicinal, isso porque historicamente o saber empírico e alguns estudos científicos tem mostrado ação sobre certos organismos.

Larvas de diferentes espécies de mosquitos manifestam diferentes susceptibilidade para amostras fitoquímicas. Em geral, as larvas do *Aedes* são mais resistentes e menos susceptível para inseticidas e extratos botânicos que a larva do *Culex quinquefasciatus*. O *A. aegypti* é comumente usado em triagem de inseticidas porque ele é usualmente menos susceptível e porque ele é mais fácil para colonização em laboratório (Shaallan *et al.*, 2005).

Nesta revisão os valores de CL_{50} para extratos brutos foram observado que alguns apresentavam doses promissoras entretanto outros apresentavam doses com valores com pouca chance de aproveitamento no controle em larga escala. A mais promissora dose foi registrada para o extrato bruto do caule de *Callitris glaucophylla* sobre o *A. aegypti* por Shaallan *et al.* (2003) $Cl_{50} = 0,69\text{mg/L}$. Se a eficiência da ação do extrato bruto não é segura a partir do sinergismo ou efeitos cumulativos, os compostos ou frações dos extratos podem, se necessário sofrer maior purificação e nisto podem torna-se mais potente. A menor Cl_{50} , observada nessa revisão, descrita para compostos de origem botânica foi $0,004 \mu\text{g/mL}$ registrada para a piperacide, um dos constituintes das frutas *Piper nigrum*, sobre as larvas *Culex pipiens pallens* por (Park *et al.*, 2002). Essa pequena dose é comparada a muitos inseticidas sintéticos.

Entretanto, entre os óleos essenciais avaliados o que forneceu melhor resultado foi o extraído da *Copaifera langsdorffii* (Fabaceae) apresentando $CL_{50} = 0,041 \mu\text{g/mL}$ (Mendonça *et al.*, 2005).

A atividade larvicida de *Myroxylon balsamum* (Óleo Vermelho) e de Terpenóides e Fenilpropanóides foi avaliada frente larvas do mosquito *Aedes aegypti*, foram utilizados cinco larvas do terceiro instar e as leituras foram realizadas após 24h. Os resultados obtidos mostraram que a fração mas ativa do *Myroxylon balsamum* foi derivada da fração hexânica e denominada pelo autor de MB-4 apresentando $CL_{50} = 4,0 \mu\text{g/ml}$. Já entre as substância químicas avaliadas destacaram-se o farnesol (**8a**) (CL_{50} 13ppm); Nerolidol (**8b**) (CL_{50} 17ppm); Aldeído cinâmico (**8c**) (CL_{50} 24,4ppm); β -Pinoeno (**8d**) (CL_{50} 42,5ppm); Carvona (**8e**) (CL_{50} 43,8ppm); Eugenol (**8f**) (CL_{50} 44,5ppm); Safrol (**8g**) (CL_{50} 49,0ppm); α -Pinoeno (**8h**) (CL_{50} 74,3ppm); Geraniol (**8i**) (CL_{50} 81,6ppm) entretanto Mentol, Linalool e Citronellal apresentaram ($CL_{50} > 100\text{ppm}$). Neste trabalho ficou evidente a importância da lipofilicidade das moléculas para a atividade larvicida em *A. aegypti*, quando se compararam monoterpenos e sesquiterpenos de estruturas correlatas. Também foi observado menor atividade de fenilpropanóides contendo núcleos benzênicos que possuem substituintes nucleofílicos, como hidroxila, metoxila e benzodioxila. Plantas brasileiras ricas em óleos essenciais contendo sesquiterpenos abundantes como Nerolidol e Farnesol, monoterpenos como α e β -Pinoeno, Carvona e Geraniol e fenilpropanóides como Safrol, Eugenol e Aldeído cinâmico são alternativas interessantes para o controle de larvas de *A. aegypti* (Simas *et al.*, 2004).

Na busca de alternativas para o controle do *A. aegypti* e obtenção de estruturas químicas passíveis de aprimoramento da atividade pela via sintética de outros derivados (Silva *et al.*, 2004) realizou estudo fitoquímico das frações larvicidas, isoladas da *Magonia pubescens*, monitorado pelo estudo de eficácia sobre larvas de 3º estágio de *Aedes aegypti*. Os bioensaios com as frações foram realizados em quintuplicata, à temperatura de $28 \pm 1^\circ\text{C}$, $80 \pm 5\%$ de umidade relativa e foto fase de 12 horas. Foram avaliadas três frações *Magonia pubescens* destas as concentrações letais encontradas da fração MP-9 (**8j**), que apresentou o maior potencial larvicida, CL_{50} e CL_{90} , foram de 3,1 e 36,6 ppm, respectivamente. Todos os

experimentos foram acompanhados por uma série controle, contendo o mesmo número de larvas.

Óleo essencial obtido das folhas de *Cinnamomum osmophloeum*, cuja caracterização de sua composição química utilizando cromatografia gasosa acoplada ao detector de massas (GC-MS), possui cinco classes de compostos: cinnamaldeído, Linalool, cânfora, classe acetato de cinnamaldeído e um classe mista. Dentro dessas cinco classes foram avaliadas a atividade larvicida de onze compostos que apresentaram respectivamente as seguintes concentrações letais: Cinnamaldeído (CL₅₀ 21 ppm); Acetato de Cinnamaldeído (CL₅₀ 26ppm); Benzaldeído (CL₅₀ 33 ppm); Cânfora (CL₅₀ >50 ppm); Benzopropanal (CL₅₀ >50 ppm); Eugenol (CL₅₀ 13 ppm); Acetato bronyl (CL₅₀ 48 ppm); β-Cariofileno (CL₅₀ 34 ppm); Óxido de Cariofileno (CL₅₀ >50 ppm); Anetol (CL₅₀ 16 ppm); Linalool (CL₅₀ >50 ppm) entre estes destacou-se o Eugenol que apresentou (CL₅₀ 13 ppm) frente as larvas de quarto instar de *A. aegypti* (Cheng *et al.*, 2004).

Em 2005, Park e colaboradores isolaram do rizoma da *Phryma leptostachya* variedade asiática dois compostos, o acetato de leptostaquiol e 8-acetoxi-2,2,6-trimetoxi-3,4,4,5-dimetilenodioxifenil-7,7dioxibiciclo[3.3.0]-Octano, os quais foram submetidos a avaliação da atividade larvicida frente *A. aegypti*, *Culex pipiens* e *Ocheratatos togo*. Estes bioensaios foram realizados em triplicata, no terceiro instar das respectivas espécies após 24h. Dentre os compostos isolados o acetato leptostaquiol foi ativo para o *A. aegypti* com CL₅₀ de 2,10 ppm.

Em 2006, Santiago e colaboradores realizaram estudos das espécies *Pentaclethra macroloba* (Fabaceae) e *Cordia piauhiensis* (Boraginaceae) determinando a ação inseticida, com o isolamento de quatro saponinas monodesmosídicas(1-4) de *Pentaclethra macroloba* e uma bidesmosídicas(5) para *Cordia piauhiensis*. Os resultados indicaram atividade com CL₅₀ alcançando: 18,6 µg/mL; 25,1µg/mL; 27,9µg/mL (**8 I,m**).

Estudos realizados por Furtado *et al.*, (2005), demonstraram a atividade de dez óleos essenciais de plantas frente larvas do 3º instar do *A. aegypti*. Os óleos essenciais foram diluídos em solução aquosa com dimetil sulfóxido nas concentrações de 100, 50, 10 e 1 µg/mL. A atividade larvicida, baseada na percentagem de larvas mortas, foi avaliada 24h após o tratamento. O óleo essencial de *Vanillosmopsis arborea* Baker induziu a maior atividade larvicida, com CL₅₀ de 15,9 µg/ml.

Estudos fitoquímicos dos extratos hexânico e metanólico dos frutos de *Pterodon polygalaeflorus* Benth forneceu três diterpenos furânicos: vouacapano (**8n**), 6-α-acetoxivouacapano (**8o**) e 6-α-hidroxiouacapano (**8p**) avaliados frente as larvas do 3º instar do *A. aegypti* e apenas o extrato hexânico mostrou boa atividade com CL₅₀ 23,99 µg/mL (Pimenta *et al.*, 2006).

Estudos realizados em *Albizzia amara* e *Ocimum basilicum* para observação de uma possível atividade repelente e larvicida para o *A. aegypti* foi realizada por (Murugan *et al.*, 2007) que verificou a atividade para todos instares apresentando os seguintes valores de CL₅₀ respectivamente para cada planta citada acima: larva I instar 5,412 µg/mL e 3,734 µg/mL, II instar 6,480 µg/mL e 4,154µg/mL, III instar 7,106µg/mL e 4,664µg/mL IV instar 7,515µg/ml e 5,124µg/mL, respectivamente. Os valores para CL₅₀ e CL₉₀ para pupas 6.792%, 5.449% e 16.925%, 15.474%. Pode-se observar que quanto menor o instar da larva mais susceptíveis ela é ao agente químicos.

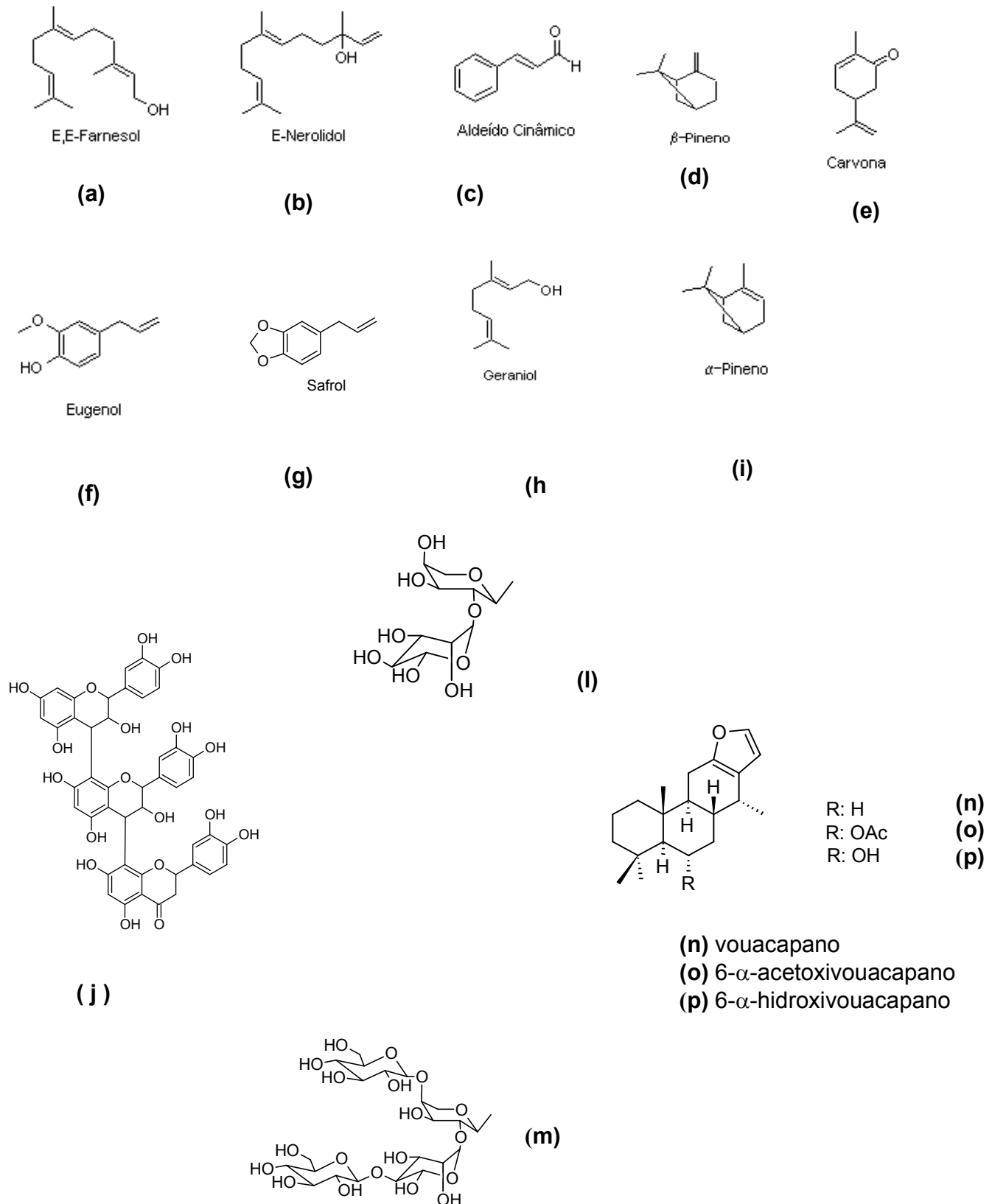


Figura – 8. Estrutura de alguns compostos com atividade Larvicida.

III- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bobadilla, M. *Revista Peruana de Biología*. **2005**, 12, n. 1, 152.

Brooks, G. F.; Butel, J. S.; Morse, S. A. *Microbiologia Médica*. 21. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.a., 2000. 38, 393.

Ciccía, G.; Coussio, J.; Mongelli, E.; *J. Ethnopham*. **2000**, 72, 189.

Consoli, R.A.G.B.; Lourenço-de Oliveira, R.; Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Rio de Janeiro, Ed. Fundação Oswaldo Cruz, 1994, 228.

Costa, J. G. M. *Flavour And Fragrance Journal*. **2004**, 19, 531.

Cheng, S. S. ;Liu, J.;Tsai, K.H.; Chang, S. T.; *J. Agric. Food Chem*. **2004**, 52, 14, 4400.

Claro, L. B. L.; Tomassini, H. C. B.; Rosa, M. L. G. *Cadernos de Saúde Pública*, **2004**, 20, 1457.

Donalísio, M. R; Glasser, C. M.; *Rev. Braz. de Epid.*. **2002**, 5, 272.

Forattini, O.P.; *Culicidologia médica*. São Paulo: Editora Edusp 2002. 860.

Ferreira, J. T.B.; Corrêa, A. G. ; Vieira, P. C.; - Produtos Naturais No Controle De Insetos- Série De Textos Da Escola De Verão Em Química. Vol. III Editora Ufscar- São Carlos. **2001**, 65.

Furtado, R. F.; Lima M.G.A.; Andrade, M.N.; Bezerra J.N.S.; Silva M.G.V. *Neo.Entom*. **2005**, 847.

Glasser, C.M.; Gomes A.C.; *Rev Saúde Pública*, **2002** ,36, 166.

Gluber, D.J.; *Trends Microbiol*. **2002**, 10, 103.

Guzmán, M.G., Kouri, G. *Infect. Dis*. **2002**, 2, 42.

Jetten, T.H., Yang, F D.A. *Am.J.Trop.Med.Hyg*. **1997**, 57, 285.

Ribeiro Jr., K.A.L. Produtos Utilizados no Controle...2007

Leventhal, R.; Cheadle, R. Parasitologia Médica: Texto e Atlas. São Paulo: Editora Premier, 4 ed. 1997.

Macêdo, M.E.; Consoli, R.A.G.B.; Grandi, S.M.T.; Anjos A.M.G.; Oliveira, A.B.; Mendes, N.M.; Queiroz R.O.; Zani, C.L.; *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **1997**, 92, 570.

Marcondes, C. B.; - Entomologia médica e veterinária . São Paulo: Editora Atheneu 2001.432.

Marzochi, K.B.F.; *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **1994.** 89, 245.

Matos, F.J. Plantas medicinais. Guia de seleção e emprego das plantas usadas na *Fitoterapia* no Nordeste do Brasil. Fortaleza, Edições UFC, 2000. 2a ed., 346.

Mendonça, F.A.C.; Silva K.F.S.; Santos K.K.; Ribeiro júnior, K.A.L.; Sant'ana A.E.G.; *fitoter*, **2005**, 76, 636.

Monath, T.P.; *Proc Natl Acad Sci. USA*, **1994** 91: 2400.

Murugan, K. ; Murugan, P.; Noortheen, A.; *Bio Techn.* **2007**, 98, 201.

Neves, D. P. Parasitologia Humana. Rio de Janeiro, Livraria Atheneu, 1999, 462.

Osanai C.H, Rosa A.P.A.T, Tang A.T, Amaral R.S . *Rev Inst Med Trop*; **1983**, 25, 54.

Park I.K., Lee S.G., Shin SC, Park JD, Ahn YJ. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2002.** 50:1870.

Pinheiro, M.M.; Sandroni, M.; Lummerzheim, M. & Oliveira, D. E. *Ciência Hoje*, **1999**, 47, 78.

Racz, M. L. ; Menck, C. F. M.; *Microbiologia.* 4a ed. Rio de Janeiro: Editora Atheneu, 2004, 73, 509.

Rodrigues, A. M. et al. Larvicidal activity of *Cybistax antisiphilitica* against *Aedes aegypti* larvae. *Fitoter.* **2005.** 76, 8, 757.

Ribeiro Jr., K.A.L. Produtos Utilizados no Controle...2007

Pimenta, A.T.A.; Santiago, G.M.P.; Arriaga, A.M.C.; Meneses, H.A.G.; Bezerra, S.B.; *Rev. Bras. de Farmacogn.* **2006**, 16, 505.

Santiago, G.M.P.; Viana, F.A.; Pessoa, O.D.L.; Santos, R.P, Pouliquen, Y.B.M.; Arriaga, A.M.C.; Andrade-Neto M.; Braz-Filho R.; *Rev Braz Farmacogn* , **2005**, 15, 190.

Santos, O. O. Estudo epidemiológico da dengue em Maceió, Alagoas,.. Tese (Doutorado) - Faculdade de Saúde Pública, USP, São Paulo, 2003.

Silva, H.H.G.; Silva I.G.; *Rev. Soc.Bras. Med. Trop.* **1999**, 32, 355.

Silva, H.H.G.; Silva, I.G.; Lira, K.S.; *Rev. Soc.Bras. Med. Trop.* **1998**, 27, 63.

Simas, N.K.; Lima, E.C.; Conceição, S.R.; Kuster, R.M.; Oliveira, F.A.M.; *Quím. Nova*, **2004**, 27, 49.

Sthempson, J. R. Understanding dengue pathogenesis: implications for vaccine design. *Bulletin Of The World Health Organization.* **2005** 83, 4.

Santiago, G. M. P. ; Viana F.A.; Pessoa, O.D.L.; Santos R.P.; Pouliquen, Y.B.M. *Rev. Braz. de Farm.*, **2005**, 15, 3, 190.

Shalam E. A.; Canyon D.; Younes, M. W.; F., Wahab.; Mansour A.H.; *Environment international.* **2005**. 31, 1166.

Teixeira, M. G. *Cadernos de Saúde Pública*, **2005**. 5, 21, 1315.

Vieira, P.; Fernandes E.; Plantas Inseticidas. In: *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 1ª ed. UFSC e UFRGS, Florianópolis, **1999**, 759.

Wandscheer, C. B.; Duque J.E. Silva M.A.N. Fukuyama Y.; Wohlke J.L.; Fontana, J.D.; *Toxicon.* **2004**. 835.

WHO - World Health Organization. *Strategic direction for research :Dengue Geneva.*, 2002. 4p.

www.cdc.gov/dvbid/dengpics.htm acessado em 25 de março de 2007.

www.who.it/dengue acessado em 15 de janeiro de 2007

www.med.sc.edu:85/mhunt/dengue-aedes.jpg

Objetivos

Geral

Contribuir para o desenvolvimento de uma alternativa para o controle do mosquito *A. aegypti*.

Específicos

- a) Verificar a atividade larvicida de extratos de plantas
- b) Compostos isolados de plantas
- c) Compostos de origem sintética.

Os resultados do projeto de pesquisa realizado durante o curso de mestrado em química e biotecnologia estão descritos em quatro artigos científicos que serão enviados para os respectivos periódicos: **Natural Product Research, Journal of Agricultural and Food Chemistry, Revista Brasileira de Farmacognosia**, os dois últimos. As instruções de cada periódico seguem em anexo.

Estudo fitoquímico e avaliação da atividade larvívica de diterpenos isolados de *Xylopiá langsdorffiana* A. St. Hil. & Tul (Annonaceae) sobre *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)

Karlos Antônio Lisboa Ribeiro Júnior¹ ; Sâmia Andrícia Souza da Silva^{1,2}; Marcelo Sobral da Silva³ ; Josean Fachine Tavares³ ; Antonio Euzébio Goulart Sant'ana¹

Mestrado em Química e biotecnologia - Instituto de Química e Biotecnologia/Universidade Federal e Alagoas, Cidade Universitária, 57072-970, Maceió-AL, 2- Escola de Enfermagem e Farmácia Universidade Federal e Alagoas, Cidade Universitária, 57072-970, Maceió-AL; 3-Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba, Cidade Universitária , 58059-900, João Pessoa-PB.

Karlos Antonio Lisboa Ribeiro Junior

Laboratório de Pesquisa em Recursos Naturais/I.Q.B.

Cidade Universitária, 57072-970, Maceió-AL

Campus A.C.Simões-UFAL, Maceió -AL

CEP: 57072-970

Email:Kalrj@qui.ufal.br

Telefone:82-32141388

Resumo

A atividade larvicida de diterpenos isolados da *Xilopia langsdorffiana* foi testada frente as larvas do quarto instar do mosquito *Aedes aegypti*. Os bioensaios foram realizados seguindo metodologia descrita pela WHO, utilizados 25 larvas em quatro repetições com suas concentrações delimitadas pelos resultados preliminares. As larvas foram consideradas mortas quando não conseguiram atingir a superfície da solução quando o recipiente era agitado. O ácido *ent-7 α -acetoxitraquiloban-18-óico* apresentou CL₅₀ 19,8 $\mu\text{g/mL}$, O ácido 8(17),12 *E*,14-labdatrien-18-óico (CL₅₀ 25,2 $\mu\text{g/mL}$), o Ácido *Ent-7 α -hydroxitrachilobano-18-óico* (CL₅₀ 25,7 $\mu\text{g/mL}$), e o Xylodiol (*Ent-atisan-7 α ,16 α -diol*) (72,9 $\mu\text{g/mL}$), O ácido *ent-7- α -acetoxitraquiloban-18-óico* apresentou valor de CL₅₀ próximas a da rotenona (CL₅₀ 6,16 $\mu\text{g/mL}$).

Palavras Chaves: Atividade larvicida, *Aedes aegypti*, Diterpenos, *Xilopia langsdorffiana*

Abstract

The larvicidal activity of diterpenes isolated from *Xylopi langsdorffiana* against 4th-instar larvae of the *Aedes aegypti* mosquito was tested. In the bioassays, 25 larvae were used in four repetitions. Compound concentrations were determined from preliminary results. Bioassays were in accordance with the methodology proposed by WHO. The larvae were considered dead if they could not reach the surface of the solution when the recipient was agitated. Acid *ent-7- α -acetoxitraquiloban-18-oic* presented CL₅₀ 19.8 $\mu\text{g/mL}$ CL₅₀. Acid 8(17), 12 *E*,14-labdatrien-18-oic (CL₅₀ 25.2 $\mu\text{g/mL}$), acid *ent-7 α -hydroxytrachiloban-18-oic* (CL₅₀ 25.7 $\mu\text{g/mL}$), and xylodiol (*Ent-atisan-7 α ,16 α -diol*) (CL₅₀ 72.9 $\mu\text{g/mL}$), acid *ent-7 α -acetoxitraquiloban-18-oic* presented CL₅₀ values close to that of rotenone (CL₅₀ 6.16 $\mu\text{g/mL}$).

Key words: Larvicidal activity, *Aedes aegypti*, diterpenes, *Xilopia langsdorffiana*.

1. Introdução

A família Annonacea é constituída por aproximadamente 2300 espécies e 130 gêneros distribuídos nas regiões tropicais do globo[1]. Diversos estudos químicos de espécies vegetais da família Annonaceae têm mostrado o acúmulo de diferentes metabólitos secundários com importantes atividades farmacológicas tais como: citotóxica (flavanonas), antitumoral (diterpenos, alcalóides), bactericida (alcalóides) e antifúngica (terpenos) e larvicida (acetogenina) [2-4]. O gênero *Xylopia*, pertencente à família Annonaceae, é constituído por aproximadamente 160 espécies, das quais diversas são usadas na medicina popular brasileira, tais como *X. aethiopica* para o tratamento de bronquite e disenteria, *X. aromatica* como agente diurético e para edema de pele, *X. sericeae* como antiinflamatório e *X. cayennensis* para transtornos cardiovasculares [5-7]. Da espécie *Xylopia langsdorfiana* conhecida popularmente como “pimenteira da terra” já foram isolados do seu caule dois diterpenos do tipo labdano, cinco alcalóides derivados do núcleo isoquinolínico e dois diterpenos do tipo trachylobano [8-10].

A dengue, infecção viral transmitida por mosquitos do gênero *Aedes*, é considerada uma das maiores preocupações mundiais de Saúde Pública [11]. O controle dos culicídeos utilizando inseticidas, como *temefós*, *malation* e *fenitrothion* constituem a principal medida adotada pelos Programas de Saúde Pública. Entretanto, em diferentes partes do mundo e no Brasil tem sido registrada resistência desse díptero aos inseticidas convencionais [12,13].

A busca de novos inseticidas e o crescente estímulo às pesquisas que visam o uso de plantas como uma alternativa para o controle de mosquitos, vetores de doenças, como a dengue, são motivados pela baixa toxicidade destes produtos naturais a animais e plantas, e pelo fato de serem biodegradáveis, o que evita a contaminação do meio ambiente. Em contraste, os inseticidas sintéticos, aos quais os insetos se tornam cada vez mais resistentes são tóxicos e poluentes [14].

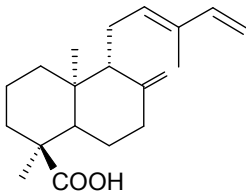
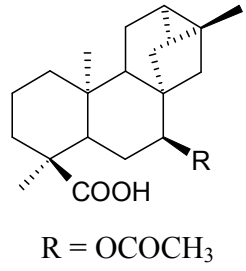
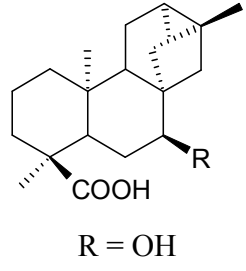
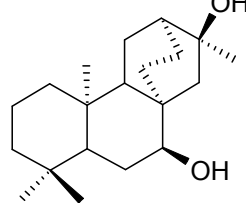
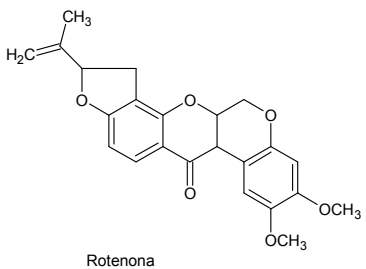
Nosso objetivo foi avaliar a atividade larvicida de quatro diterpenos, sendo um labdano (XL-1) outro Xylodiol (XLF-3) e dois trachilobanos (XLC-1) (XLC-3), sendo estes últimos pertencente a uma classe de produtos naturais rara e pouca estudada farmacologicamente, além do óleo essencial obtido das folhas da *Xylopi langsdorffiana*.

2. Resultados e Discussão

Os diterpenos isolados para *Xylopi langsdorffiana* foram: ácido 8(17),12 *E*,14-labdatrien-18-óico (XL-1); ácido *ent-7 α* -acetoxitraquiloban-18-óico (XLC-1); Ácido *Ent-7 α* -hydroxitraquilobano-18-óico (XLC-3) e o Xylodiol (*Ent-atisan-7 α* ,16 α -diol) (XLF-3) (Tabela 1).

Após os bioensaios iniciais, verificou-se que todos os diterpenos avaliados, da *Xylopi langsdorffiana*, foram capazes de causar 100% de mortalidade larval a concentração de 100 $\mu\text{g/ml}$. O ácido 8(17),12 *E*,14-labdatrien-18-óico, ácido *ent-7 α* -acetoxitraquiloban-18-óico como o ácido *Ent-7 α* -hydroxitraquilobano-18-óico e o Xylodiol (*Ent-atisan-7 α* ,16 α -diol), apresentaram CL_{50} , respectivamente de 25,20 $\mu\text{g/ml}$, 19,84 $\mu\text{g/ml}$, 25,70 $\mu\text{g/ml}$ e 72,9 $\mu\text{g/ml}$ (Tabela- 1) após 48 horas frente as larvas do quarto ínstar do mosquito *Aedes aegypti*.

Tabela 1: Valores de CL₁₀, CL₅₀ e CL₉₀ de diterpenos para *Xylopia langsdorffiana* St-Hil & Tul sobre *Aedes aegypti*.

COMPOSTOS	ESTRUTURA	RESULTADOS (µg/mL)
Ácido 8(17),12 <i>E</i> ,14-labdatrien-18-óico (XL-1)		CL ₁₀ = 8,0 [6,3 – 11,3] CL ₅₀ = 25,2 [18,3- 30,8] CL ₉₀ = 78,5 [63,2 – 89,1]
Ácido <i>ent</i> -7 α -acetoxitraquiloban-18-óico (XLC-1)	 R = OCOCH ₃	CL ₁₀ 6,1 [3,9 – 10,5] CL ₅₀ 19,8 [17,3 - 22,0] CL ₉₀ 65,1 [62 ,1 – 72,9]
Ácido <i>Ent</i> -7 α -hydroxitraquiloban-18-óico (XLC-3)	 R = OH	CL ₁₀ 14,5 [11,2 – 17,9] CL ₅₀ 25,7 [19,2 - 28,0] CL ₉₀ 45,3 [40,1 - 55,2]
Xylodiol (<i>Ent</i> -atisan-7 α ,16 α -diol) (XLF-3)		CL ₁₀ 28,0 [22,7 – 32,9] CL ₅₀ 72,9 [68,9 – 80, 4] CL ₉₀ 189,7 [163,2-201,2]
Rotenona	 Rotenona	CL ₁₀ 1,510 [0,8 – 2,1] CL ₅₀ 6,160 [4,7 – 7,8] CL ₉₀ 25,215 [18,6 – 37, 9]

Os trachilobanos são uma classe de produtos naturais rara e pouca estudada farmacologicamente pertencentes a classe dos diterpenoides. Estes constituem uma grande família de produtos naturais e são encontrados nas mais diversas plantas em diferentes substratos sendo encontrados também em fungos, alguns organismos marinhos e em insetos. Os diterpenos constituem uma classe de terpeno muito estudado[15].

Recentemente foi registrado o isolamento de três diterpenos do *Pterodon polygalaeflorus* (Benth) a partir de extratos etanólicos e a verificação da bioatividade larvicida frente as larvas do *A. aegypti*. Os componentes isolados foram diterpenoides furanos 6 α -hidroxivouacapan-7 β ,17 β -lactone, ácido 6 α ,7 β -dihidroxivouacapan-17 β -oico e metil 6 α ,7 β -dihidroxivouacapan-17 β -oate apresentaram respectivamente as seguintes valores para CL₅₀ 50,08 μ g/mL, 14,69 μ g/mL e 21,76 μ g/mL [16]. Esses resultados quando comparados ao diterpenos avaliados nesse trabalho apresentam melhores concentrações letais ao passo que o composto que apresentou maior CL₅₀ foi o 6 α -hidroxivouacapan-7 β ,17 β -lactona (50,08 μ g/mL) apresentando um valor menor que *Ent-atisan-7 α ,16 α -diol* (72,9 μ g/mL).

O óleo essencial das folhas apresentou inatividade. É interessante lembrar que a maioria dos óleos essenciais extraídos de plantas possui alta atividade larvicida, provavelmente, por possuírem uma grande variedade de compostos. Estudos realizados com o óleo essencial extraídos das folhas do *Ageratum conyzoides* e avaliou também frente às larvas do *A. aegypti* obtendo CL₅₀ =

0,148µg/mL[4]. Já o óleo essencial de *Ipomoea cairica* (Convolvulaceae) avaliado frente às larvas do *A. aegypti* apresentou uma $CL_{50} = 0,0223 \mu\text{g/mL}$ [17].

A atividade larvicida apresentada pelos compostos isolados da *Xylopia langsdorffiana* destaca-se a do ácido *ent-7 α -acetoxitraquiloban-18-óico* que apresentou melhores porcentagem de mortalidade que a rotenona. A atividade observada para o ácido *Ent-7 α -hydroxitrachiloban-18-óico* e o Xylodiol (*Ent-atisan-7 α ,16 α -diol*) é estatisticamente comparável observada para a rotenona (Tabela-2). Basta lembrar que a rotenona é um inseticida distribuído comercialmente, também é um produto de planta.

Os ácidos *Ent-7 α -acetoxitraquiloban-18-óico* (XLC-1) e *Ent-7 α -hydroxitraquiloban-18-óico* (XLC-3) não haviam sido descritos na literatura, e demonstraram ter alto potencial larvicida.

Tabela 2 – Porcentual médio de mortalidade devido ao efeito dos diferentes tratamentos. Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste Tukey a 5%.

compostos	% mortalidade	Tukey
Rotenona	66,25	A
XLC1	61,75	AB
XLC3	59,50	AB
XL1	59,25	AB
XLF3	26,50	B

3. Experimental

3.1 Obtenção dos extratos

O material botânico (caule e folha) foi coletados em Cruz do Espírito Santo (PB) e posteriormente identificado pela prof^a Dra. Maria de Fátima Agra. Um exemplar desta espécie encontra-se depositado no Herbário Prof. Lauro Pires Xavier (AGRA 5541) na UFPB. Em seguida o material foi desidratado em estufa a 45°C, depois triturado em moinho e submetido a maceração com EtOH a 95%. Todo o processo de obtenção e isolamento dos compostos avaliados foram realizados pelos professores Josian Fachine Tavares e Marcelo Sobral da Silva no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

3.2 Isolamento dos compostos

Para o isolamento dos compostos a partir do caule, 60 g do extrato bruto, foi suspenso em uma solução metanol+água (4:6) e efetuado uma partição com hexano, clorofórmio e acetato de etila e uma fase hidroalcoólica. Após a remoção do solvente foram obtidos as frações em Hexano (20 g), Clorofórmio (16 g), acetato de etila (12 g) e hidrometanólica. O extrato hexânico foi submetido à cromatografia em coluna com gel de sílica e eluída com hexano e acetato de etila em gradiente crescente de polaridade obtendo-se 95 frações. Após análise em CCDA foram reunidas em 12 grupos. A fração F-1 foi recristalizada com metanol obtendo-se o

ácido *ent-7a-acetoxitraquiloban-18-óico*. A fração F- 4 foi purificada por CCDP obtendo-se o ácido *8(17),12E,14-labdatrien-18-óico*. As substâncias tiveram suas estruturas elucidadas através de RMN ¹H e ¹³C 1D e 2D, IV e espectroscopia de massas (EM) [10].

O extrato etanólico da folha foi submetido a partição nas mesmas condições fornecendo as frações em Hexano (20 g), clorofórmio (16 g) e acetato e etila (12 g). A fração em hexano foi submetido à cromatografia em coluna com de gel sílica e eluída com hexano e acetato de etila em gradiente crescente de polaridade. As frações com placa preparativas iguais foram reunidas. As frações 13 –28 foram purificadas utilizando-se placa preparativas novamente. Usando sílica gel hexano em EtOAc (4:1) para produzir o xylodiol (72 mg). Já as frações de 29-40 foram reunidas e purificadas usando hexano/ EtOAc (7:3) para produzir o *8 (17),12E,14-labdatrien-18-óic acid* (83mg). As substâncias tiveram suas estruturas elucidadas através de RMN ¹H e ¹³C 1D e 2D, IV e Espectroscopia de Massas (EM).[9]

3.3 Manutenção da Colônia de *Aedes aegypti*

A colônia da espécie *A. aegypti* é mantida no Laboratório de Pesquisa em Recursos Naturais – Laboratório de Larvicidas do Instituto de Química da Universidade Federal de Alagoas. Esta colônia está sob temperatura, umidade e fotoperíodo controlados (27°C; 85 ±5% de UR e 12:12, luz: Escuro).

Três vezes por semana, as fêmeas receberam repasto sanguíneo, para tal foram utilizados pombos, *Columba lívia*, que foram colocados em uma bacia,

contidos e posteriormente colocou-se a gaiola, sobre a bacia, o qual eles estava deixando-os em contato com a tela das gaiolas durante cerca de 2 h. Sendo utilizado como substrato para oviposição um papel de filtro dentro de um recipiente com água, além disso fora adicionado uma efusão de gramíneas fermentada.

As larvas eclodidas foram alimentadas em dias alternados com ração para gatos peletizadas e esterilizada em autoclave. As pupas foram recolhidas diariamente e transferidas para emergência dos adultos em gaiolas teladas. As gaiolas são feitas de madeira com tela de nylon, medindo 36x20x30 cm³ e providas de uma manga de tecido de algodão .

3.4 Preparo das Soluções

As soluções foram preparadas com água destilada a 1% de DMSO, a 100 (µg/mL) para os compostos. Em seguida, as amostras foram colocadas em um aparelho de ultra-som a fim de melhorar a solubilização [16].

3.5 Bioensaios

Os extratos que tiveram um percentual de mortalidade igual ou superior a 50% em bioensaios preliminares seguiram para os testes apurados, nos quais eram utilizadas 25 larvas, em quatro repetições e suas concentrações foram delimitadas pelos resultados preliminares. As larvas foram consideradas mortas quando não conseguirem atingir a superfície da solução à medida quando o recipiente era agitado. A contagem das larvas foi realizada a hora 0 (início do experimento), 24 h e

Ribeiro Jr., K.A.L. Produtos Utilizados no Controle...2007

48 h, como controle negativo foi utilizado uma solução à 1 % de DMSO e como controle positivo foi usado a rotenona à 10% [4].

3.6 Análise estatística

Para o cálculo das Concentrações letais (CL_{10} , CL_{50}) dos compostos avaliados foi utilizado o Probit analyses. Com a finalidade de comparar a eficiência dos diversos tratamentos testados utilizou-se o teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade para comparar as médias, após a transformação dos dados em arco seno $\sqrt{x}/100$.

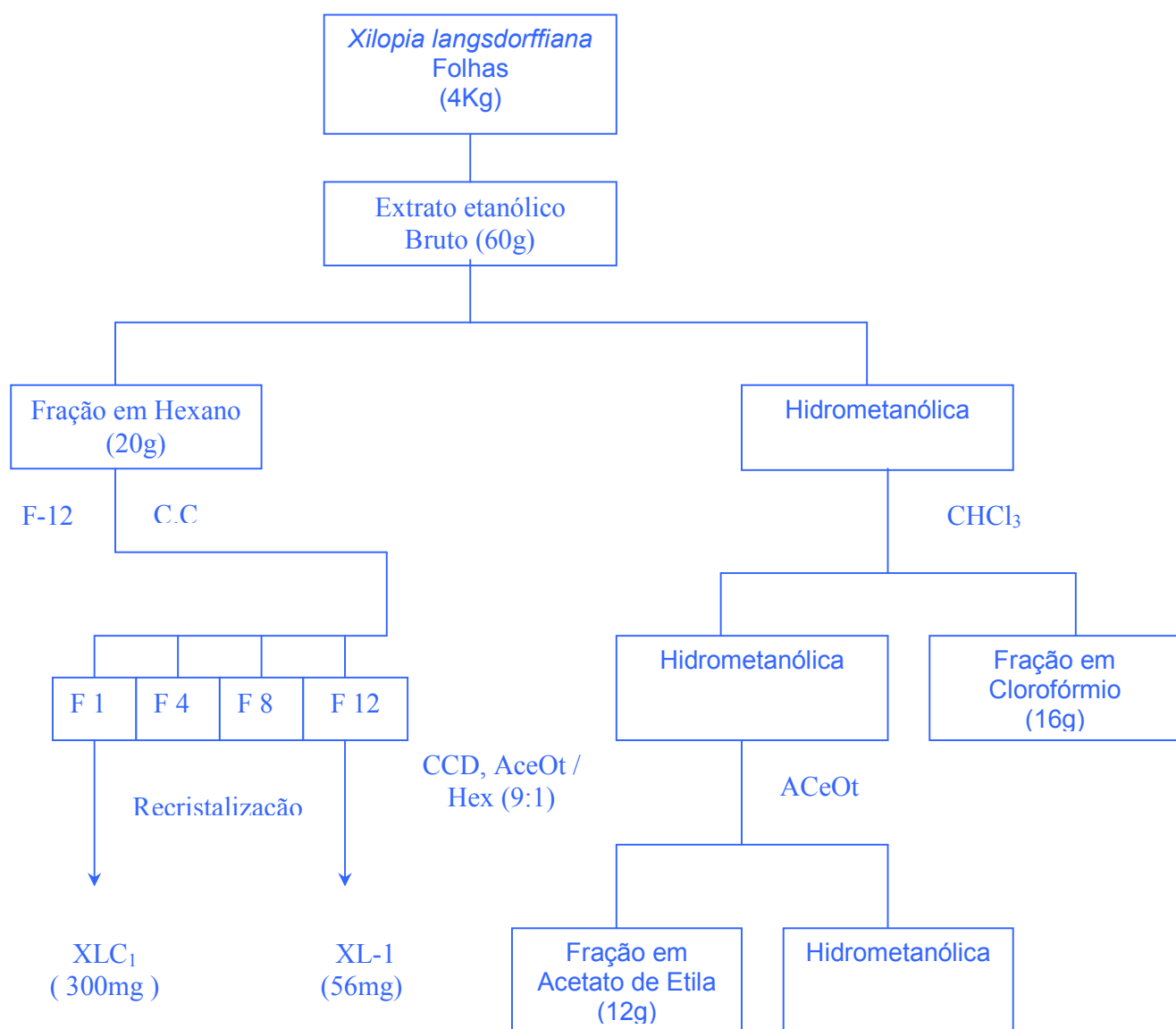
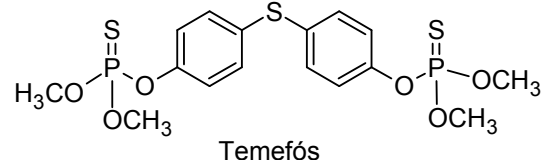
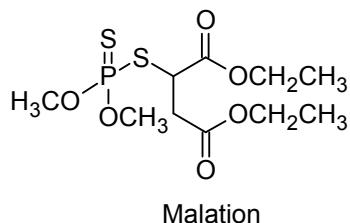
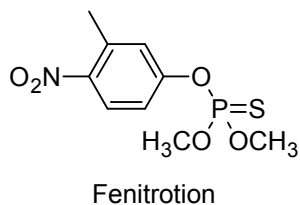
4. Referências Bibliográfica

- [1] Maas, P.J. M.; Kamer, H. M. V.; Junikka, L.; Mello-Silva, R.; Rainer, H. *Rodriguesia*, 52, 65, (2001).
- [2] Martins D. *Alcalóides, flavonóides e terpenóides de Xylopiá aromática*. São Paulo. Tese de Doutorado-Instituto de Química, Universidade de São Paulo. 134 (1996).
- [3] Moreira IC, Lago JHG, Young MCM, Roque NF. *J Braz Chem Soc* 14, 83, (2003).
- [4] Mendonça, F.A.C.; Silva K.F.S.; Santos K.K.; Ribeiro júnior, K.A.L., Sant'Ana, A.E.G., *Fitoterapia*, 76, 636, (2005).
- [5] Moreira IC. *Estudo químico de Xylopiá emarginata e Xylopiá brasiliensis*. São Paulo. Tese de Doutorado - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, 203 (1999).
- [6] Macedo M, Ferreira A. R., *Rev Bras Farmacogn* 14(Supl. 1): 44,(2004).
- [7] Nascimento A.A, Ribeiro E.A.N, Oliveira J.M, Medeiros F.A, Silva M.S, Medeiros I.A. *Rev Bras Farmacogn*, 16: 21,(2006).
- [8] Pio Correa, M. *Dicionário de Plantas Úteis do Brasil e Exóticas Cultivadas*. IBDF, RJ, (1984).
- [9] Tavares, J .F., Queiroga K. F., Silva M.V.B., Diniz, M.F.F.M., Filho, J.M.B., da-Cunha, E.V.L., Simone, C.A., Araújo júnior, J.X., Melo, P.S. Haun, M., Silva, M. S., *J. Nat. Prod.* IN:PRESS.(2005)
- [10] Tavares, J .F Andrade, N. C.; Barbosa-Filho, J. M.; Silva, M. S.; Da-Cunha, E. V. L.; Maia, J. G. S. *Biochem. Syst. Ecol.*, 32, 1058. (2004).

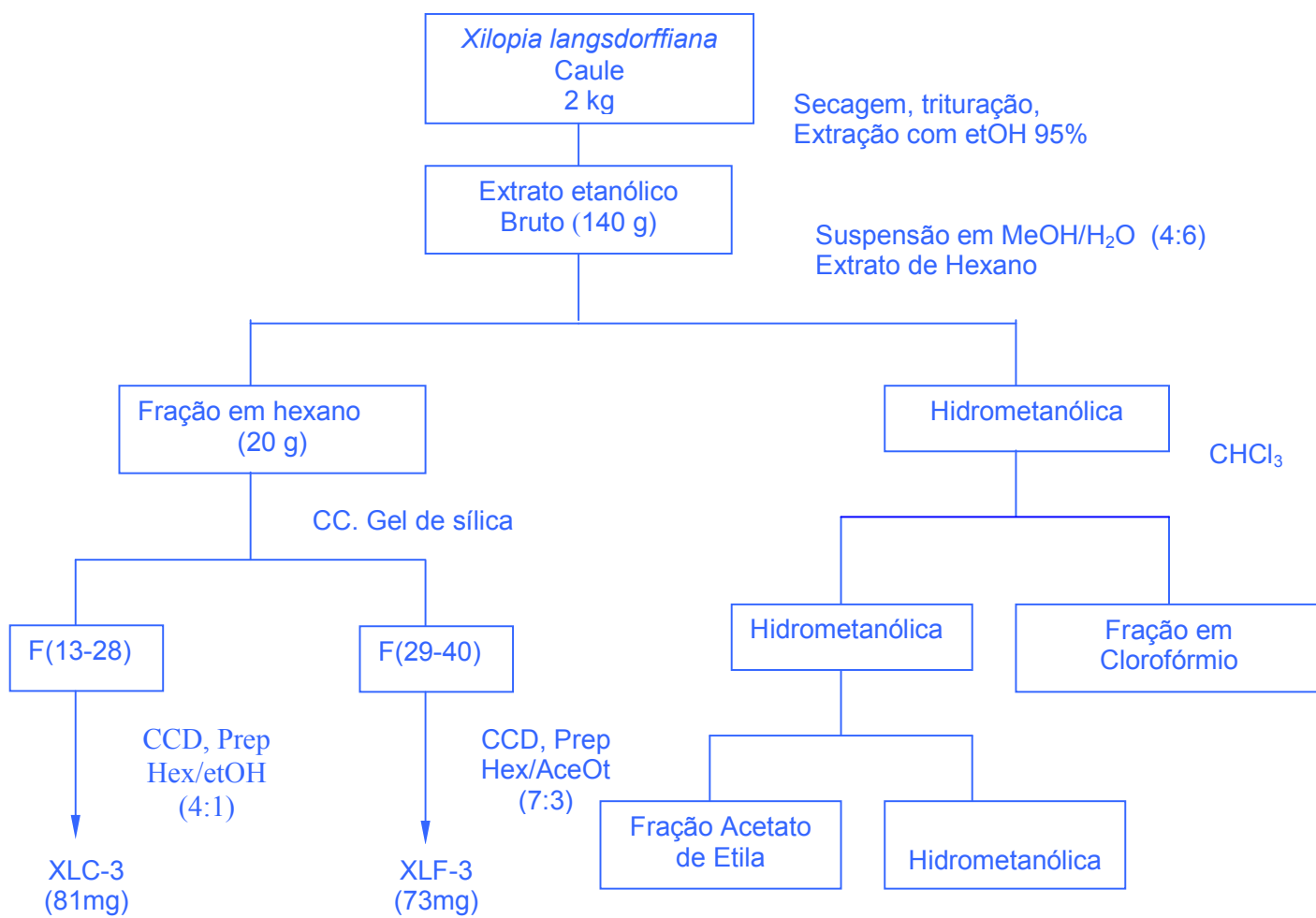
- [11] World Health Organization. Dengue bulletin: Situation of dengue/dengue haemorrhagic fever in SEA countries (2004).
- [12] Wirth, M.C. & G.P. Georghiou. *J. Am. Mosq. Control Assoc*, 15: 320,(1999).
- [13] Macoris, M.L.G., M.T.M. A.ndrighetti, L. Takaku, C.M. Glasser, V.C. Garbeloto & J.E. Bracco. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, 98: 703-708(2003).
- [14] Santiago G.M.P., Viana F.A, Pessoa, O.D.L, Santos R.P, Pouliquen Y.B.M., Arriaga A.M.C, Andrade-Neto M., Braz-Filho R. *Rev Bras Farmacogn* , 15: 190 (2005).
- [15] Hanson, J. R., *Methods in Plant Biochemistry*, Vol. 7, 263, (1991).
- [16] Omena M. C., Bento, E. S. , De Paula J. E., Sant'Ana, A. E. G. *vector Borne Zoonotic Dis.* 6:216 (2006).
- [17] Thomas, T. G., RAO, S.; L.A.L, S., *Japanese Journal Of Infectious Diseases*, 57:177, (2004).

www.arbovirus.health.nsw.gov.au acessado 01 de julho de 2007

5.0 Material Complementar



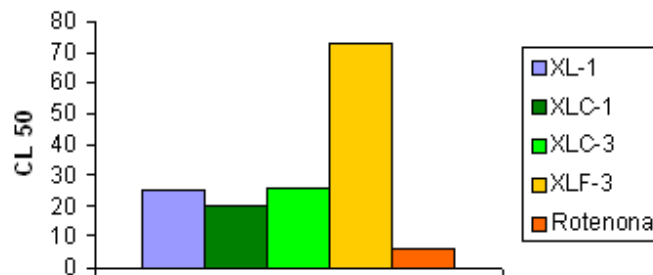
Representação da marcha química para os isolamentos dos compostos XLC-1 e XL- 1 a partir do caule da *Xylopija langsdorffiana*



Representação da macha química para os isolamentos dos compostos XLC-3 e XLF- 3



Larvas de *A. aegypti* do quarto ínstar FONTE : www.arbovirus.health.nsw.gov.au



Relação das Cl_{50} dos compostos XL-1, XLC-1, XLC-3 e XLF-3 em relação a Rotenona

Atividade de Naftoquinonas sobre as larvas do *Aedes aegypti*, o vetor da dengue

Karlos Antônio L. Ribeiro Júnior* ; Earlle C. da Silva* ; Marília Oliveira Fonseca Goulart, Maria Tereza Molina** ; Antonio Euzébio G. Sant'Ana*

¹ Instituto de Química e Biotecnologia/Universidade Federal de Alagoas, Cidade Universitária, 57072-970, Maceió-AL, Brasil

² Instituto de Química Médica, (Consejo Superior de Investigaciones Científicas) Juan de Cierva, 3, 28006-Madrid, Spain.

Atividade larvicida de 11 quinonas foram determinadas usando o *Aedes aegypti* para os bioensaio larvicida. Os bioensaios iniciais, foram realizados na concentração de 50µg/mL realizados em quatro repetições com 25 larvas, em copos descartáveis contendo 25mL de solução. A contagem das larvas foi realizada a hora 0 (início do experimento), 24 h e 48h. Como controle negativo foi utilizado uma solução a 1 % de DMSO e como controle positivo foi usado temefós a 5%. As quinonas: 3-Bromo-5-acetoxi-1,4- naftoquinona, 2-Bromo-5-acetoxi-1,4- naftoquinona apresentaram alta atividade com valores de CL_{50} 0,873 e 1,117 µg/mL, respectivamente . A aplicação potencial das quinonas que apresentaram melhores valores no controle do vetor da dengue e febre amarela, pode ser proposto.

Palavras chaves: lapachol, isolapachol, atividade larvicida, juglona, Naftoquinonas

The insecticidal activity of 11 quinones against *Aedes aegypti* was determined by larvicidal bioassay. The initial bioassays were carried out with 25 *Aedes aegypti* larvae in four repetitions with 25 mL of solution in concentration of 50 µg/mL. The larvae were counted at 0 (beginning of the experiment), 24, and 48 h. The negative control used was a 1% DMSO solution and the positive control was temefos at 5%. Quinones: 3-Bromo-5-acetoxy-1,4- naphthoquinone, 2-Bromo-5- acetoxy -1,4- naphthoquinone were highly active with CL_{50} values of 0.873 and 1.117 µg/mL, respectively. The potential application of quinones with the best dengue and yellow fever vector control values is proposed.

Key words: lapachol, isolapachol, larvicidal activity, juglone, Naftoquinones.

INTRODUÇÃO

Mosquitos são incômodos para os humanos e devido a sua existência há disseminação de doenças como malária, filariose, dengue e outras encefalites. O mosquito *Aedes aegypti* transmissor da febre amarela e principal transmissor da Dengue, demonstram ter uma dependência maior do sangue humano do que qualquer outro vertebrado. Entretanto, em geral a maioria dos insetos, em particular o *A. aegypti*, desenvolve resistência para a maioria dos inseticidas. Esses fatores tem criado uma busca por inseticidas específicos e biodegradáveis para o seu combate (1).

Quinonas são compostos orgânicos que podem ser considerados como produtos de oxidação de fenóis; da mesma forma, a redução de quinonas pode originar os correspondentes fenóis. Sua principal característica é a presença de dois grupos carbonílicos que formam um sistema conjugado com pelo menos duas ligações duplas C-C apenas algumas nafto-, antra-, e fenantraquinonas podem ser classificadas como substância com caráter aromático. As orto e para-quinonas são 1,2- e 1,4-dicetona cíclicas conjugadas: meta ou 1,3-quinonas não existem (2). Desde a antiguidade, plantas contendo quinonas têm sido usadas por suas atividades biológicas ou como fonte de corantes naturais. A alizarina, uma antraquinona obtida das raízes de *Rubia tinctorum* L. (Rubiaceae) são usadas desde o antigo Egito, Pérsia e Índia (3).

Até o momento, são conhecidos na natureza mais de 1500 quinonas, encontradas em bactérias, fungos, líquens, gimnospermas e angiospermas. No reino animal também já foram encontradas quinonas em ouriços-do-mar e certos

artrópodes como cochonilhas e os chamados besouros bombardeadores. Plastiquinonas e filoquinona são metabólicos primários presentes provavelmente em todos tecidos que realizaram fotossíntese, enquanto as ubiquinonas (como o nome já diz) tem sido encontradas na maioria das plantas e também em animais. As ubiquinonas e as naftoquinonas da série da vitamina K são exemplos de bioquinonas de ampla distribuição na natureza (2-3).

As quinonas desempenham papel fundamental na bioquímica celular e exercem relevante atividade biológica. Devido ao fato de serem facilmente oxidadas e reduzidas, algumas quinonas participam da fosforilação oxidativa, transportando elétrons entre a coenzima da flavina e os citocromos, outras participam da fotossíntese e algumas participam dos processos enzimáticos onde atuam como cofatores (4)

Em estudos farmacológicos as quinonas mostram variadas biodinamicidades, destacando-se, dentre muitas, as propriedades microbicidas, tripanossomicidas, viruscidas, antitumorais e inibidoras de sistemas celulares reparadores, processos nos quais atuam de diferentes formas. Como exemplo, destaca-se o estresse oxidativo que provocam, ao induzirem a formação deletéria endógena de espécies bioativas derivadas do oxigênio (1O_2 , $\cdot OH$, $O_2^{\cdot -}$ e H_2O_2)⁵, como ocorre no *Trypanosoma cruzi*, agente causador da doença de Chagas. Outra atividade marcante destas substâncias, descoberta um tanto recentemente, é a inibição do complexo das topoisomerasas, ação que provoca o desencadeamento da apoptose celular (suicídio celular). A interferência das quinonas na apoptose constitui-se hoje em pesquisa interdisciplinar de fronteira na química medicinal, existindo grande

expectativa quanto à delimitação de estratégias racionais visando o combate de neoplasias, principalmente as relacionadas ao câncer de próstata.(5)

Dentre as naftoquinonas naturais destaca-se o lapachol que pode ser considerado um dos principais representantes do grupo de quinonas das tabebuias. É conhecido desde 1858 e até então, tem sido encontrado como constituinte de várias plantas das famílias Bignoniaceae, Verbenaceae e Proteaceae. Entretanto, sua ocorrência é maior na família Bignoniácea, particularmente no gênero *Tabebuia* (*Tecoma*), juntamente com outras quinonas heterocíclicas não menos importantes do grupo (6).

Naftoquinonas tais como Menadiona e Plubamgina mostraram atividade contra diferentes tripanossomatídeos, Leishmanias responsáveis pela doença do sono Africana (*Trypanosoma bruceirhodesiense* e *Trypanosoma brucei gambiense*), doença de Chagas (*Trypanosoma cruzi*) e Kala-azar (*Leishmania donovani*). Este protozoário parasito da ordem dos cinetoplastídeos são particularmente sensíveis ao estresse oxidativo e tem desenvolvido um sistema antioxidante específico (2,6).

Outras atividades farmacológicas foram atribuídas ao lapachol e a seus derivados semi-sintéticos, tais como atividade antimicrobiana e antifúngica, atividade cercaricida (prevenção da penetração de Cercárias *Schistosoma mansoni* na pele); ação moluscicida (atividade contra caramujos *Biomphalaria glabrata*, hospedeiro intermediário do *Schistosoma mansoni*); leishmanicida [ação intracelular nas formas amastigotas de *Leishmania (viann)braziliensis*; tripanossomicida ; (atividade contra o *Trypanosoma cruzi*, que é o agente causador da doença de Chagas em sua fase tripomastigota); antimalárico (atividade contra eritrócitos parasitados por *Plasmodium falciparum*); uso contra enterovirose; antiinflamatória; antineoplásica e

antiulcerantes. Há ainda relatos da forte atividade anticonceptiva em ratas, com índice de 100% de mortalidade fetal/embrião sem, contudo, causar aparente efeito tóxico aos animais (5-8). Outros exemplos para estas substâncias é a significativa atividade contra o vírus HIV-1, agindo especificamente sobre as enzimas proteases (9).

Produtos de plantas têm sido usados tradicionalmente por comunidades humanas em muitas partes do mundo sobre vetores e espécies específicas de insetos. Os fitoconstituintes em muitos casos possuem poder de ação larvicida, inibidores de crescimento de insetos, repelentes e atraentes de oviposição e atividade deterrentes observadas por muitos pesquisadores (10). O presente trabalho teve como objetivo a verificação da atividade larvicida de quinonas análogas ao Lapachol sobre as larvas do mosquito *Aedes aegypti*.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção das Quinonas

As quinonas em alguns casos foram obtidas a partir de reações de substituição na 1,4-naftoquinona, sendo obtidas em parceria pelos grupos da professora Marília O. G. Goulart (UFAL) e a professora Maria Teresa Molina (Instituto de Química Médica - Espanha).

Lapachol de origem natural, extraído de diversas plantas da família bignoniaceae, principalmente das espécies de Tecoma e de Tabebuia (11) foi cordialmente fornecida por PVP (Produtos Vegetais faz Piauí, Parnaíba, Piauí, Brasil). Isolapachol [2-hidroxi-3-(3-metil-1-butenil) - 1,4-naftoquinona] foi facilmente sintetizada por procedimentos estabelecidos, seguido, por uma reação de 2 hidroxy-1,4-naphthoquinona (Aldrich) e de isovaleraldeído (Aldrich), em meio ácido (12). Os sais de Lapachol e de isolapachol respectivamente) foram preparados pelo uso de uma quantidade equivalente de KOH em etanol, os produtos puros foram obtidos após remoção do solvente e lavagens com éter frio para eliminar resíduos dos compostos iniciais. O sal de potássio do isolapachol foi relatado anteriormente (6). Acetil-isolapachol (q5) foi preparado por procedimentos usuais (acetato de sódio anidro e piridina em hidrogenação catalítica, usando PtO_2 com carvão vegetal em etanol). Todos os compostos foram catalisados pelos métodos físicos de análise que estão de acordo com as estruturas indicadas.

Determinação da atividade larvicida

Os bioensaios foram conduzidos no Laboratório de Pesquisa em Recursos Naturais/ Setor Larvicida do Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas-UFAL, utilizando-se uma colônia de *Aedes aegypti* mantida para essa finalidade.

A metodologia utilizada nos bioensaios larvicida segue a recomendada pela WHO a qual foi utilizada em todos ensaios realizados (13). Os bioensaios iniciais, foram realizados na concentração de 50 µg/mL, com larvas do *A. aegypti* 4º instar, e realizados em quatro repetições com 25 larvas, em copos descartáveis (250 mL) contendo 25 mL de solução. As larvas foram consideradas mortas quando não conseguiram atingir a superfície da solução quando o recipiente era agitado. A contagem das larvas foi realizada a hora 0 (início do experimento), 24 h e 48h. Como controle negativo foi utilizado uma solução a 1 % de DMSO e como controle positivo foi usado temefós a 5%.

Análise estatística

Para a realização dos cálculos concentrações letais (CL₁₀, CL₅₀, CL₉₀) utilizou-se a método probit análises. (14) Com a finalidade de comparar a eficiência dos diversos tratamentos testados utilizou-se o teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade para comparar as médias, após a transformação dos dados em arco seno $\sqrt{x/100}$.

RESULTADOS

Todas as quinonas testadas apresentaram atividade larvicida contra *A. aegypti* (tabela I). Na tabela seguinte encontra-se a fórmula estrutural e a respectiva concentração letal para 50% dos indivíduos (CL₅₀), para cada quinona avaliada, obtido de acordo com as concentrações citadas na metodologia. Desta forma, os valores estipulados do intervalo para CL₅₀ para o 3-Bromo-5-hidroxy-1,4-naftoquinona não estão dentro de nenhum intervalo de confiança das outras quinonas testadas, destacado assim o seu elevado potencial larvicida em relação as demais. As naftoquinonas apresentam várias atividades biológicas descritas na literatura, mas as estudadas nesse trabalho não foram encontradas em nenhum outro estudo.

Tabela I-Valores CL₁₀, CL₅₀ e CL₉₀ de Quinonas sobre *Aedes aegypti*

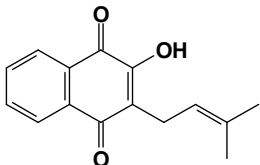
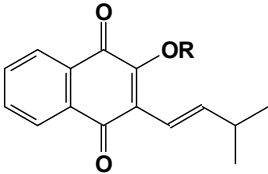
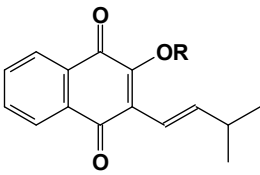
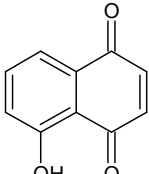
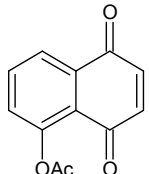
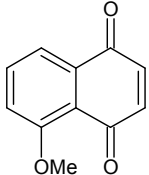
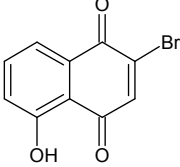
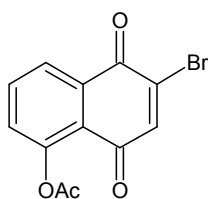
COMPOSTOS	ESTRUTURA	RESULTADOS (µg/mL)
Lapachol (L)		CL ₅₀ 20,79* CL ₅₀ 26,30*
Acetato Isolapachol (AL)	 R= Ac	CL ₁₀ 1,937 [1,389 – 2,397] CL ₅₀ 3,587 [3,035 – 4,065] CL ₉₀ 6,641 [5,882 – 7,774]
Sal de lítio isolapachol (SI)	 R= Li ⁺	CL ₁₀ 2,020 [1,26 – 2,63] CL ₅₀ 3,780 [2,99 – 4,51] CL ₉₀ 7,060 [5,83 – 9,46]
5-Hidroxi-1,4-naftoquinona (juglone) (q1) C ₁₀ H ₆ O ₃		CL ₁₀ 1,937 [1,89 – 2,97] CL ₅₀ 3,587 [3,035 – 4,065] CL ₉₀ 6,641 [5,882 – 7,774]
5-Acetoxi-1,4-naftoquinona C ₁₂ H ₈ O ₄ (q2)		CL ₁₀ 2,593 [1,415 – 3,758] CL ₅₀ 4,553 [2,405 – 5,844] CL ₉₀ 7,993 [6,178 – 20,475]
5-Metoxi-1,4-naftoquinona C ₁₁ H ₈ O ₃ (q3)		CL ₁₀ 5,789 [5,162 – 6,294] CL ₅₀ 7,919 [7,415 – 8,419] CL ₉₀ 10,833 [10,081 – 11,900]
2-Bromo-5-hidroxi-1,4-naftoquinona C ₁₀ H ₅ BrO ₃ (q4)		CL ₁₀ 0,773 [0,664 – 0,868] CL ₅₀ 1,391 [1,220 – 1,690] CL ₉₀ 2,501 [1.982 – 3.718]

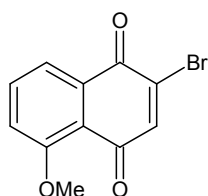
Tabela I-Valores CL₁₀, CL₅₀ e CL₉₀ de Quinonas sobre *Aedes aegypti*

2-Bromo-5-acetoxi-1,4-
naftoquinona
 $C_{12}H_7BrO_4$ (q5)



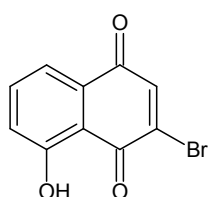
CL₁₀ **0,301** [0,171 – 0,442]
CL₅₀ **1,170** [0,891 – 1,451]
CL₉₀ **4,550** [3,636 – 6,078]

2-Bromo-5-metoxi-1,4-
naftoquinona
 $C_{11}H_7BrO_3$ (q6)



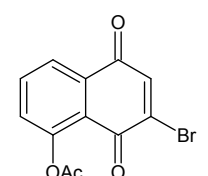
CL₁₀ **5,538** [4,686 – 6,253]
CL₅₀ **9,703** [8,827 – 10,749]
CL₉₀ **16,999** [14,739 – 20,844]

3-Bromo-5-hidroxi-1,4-
naftoquinona
 $C_{10}H_5BrO_3$ (q7)



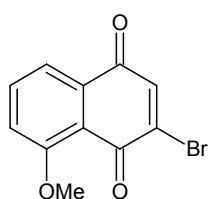
CL₁₀ **0,538** [0,459 – 0,599]
CL₅₀ **0,873** [0,807 – 0,955]
CL₉₀ **1,417** [1,242 – 1,739]

3-Bromo-5-acetoxi-1,4-
naftoquinona
 $C_{12}H_7BrO_4$ (q8)



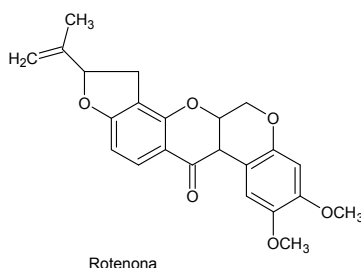
CL₁₀ **5,084** [4,551 – 5,529]
CL₅₀ **7,287** [6,819 – 7,784]
CL₉₀ **10,445** [9,616 – 11,645]

3-Bromo-5-metoxi-1,4-
naftoquinona $C_{11}H_7BrO_3$
(q9)



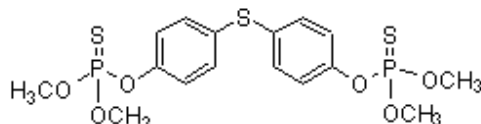
CL₁₀ **2,656** [1,055 – 3,874]
CL₅₀ **5,752** [3,977 – 7,664]
CL₉₀ **12,453** [9,068 – 25,069]

Rotenona (L)



CL₁₀ **1,510** [0,890 – 2,180]
CL₅₀ **6,160** [4,730 – 7,834]
CL₉₀ **25,215** [18,698 – 37, 906]

Temefós (T)



CL₁₀ **0, 985** [0,890 – 1,180]
CL₅₀ **1,589** [4,730 – 7,834]
CL₉₀ **3,115** [2,698 – 5, 815]

*Dados Literatura

Das quinonas avaliadas destacaram-se a 5-Hidroxi-1,4-naftoquinona (q1); 5-Acetoxi-1,4-naftoquinona (q2) ; 2-Bromo-5-hidroxi-1,4-naftoquinona (q4) ; Acetato Isolapachol (AL), além do 3-Bromo-5-hidroxi-1,4- naftoquinona (q7). Todas estas quinonas causaram mortalidade de 100% frente as larvas de *A. aegypti* a concentração de 10 µg/mL.

DISCUSSÃO

Todos análogos do lapachol testados apresentaram maior potencial que o lapachol descrito na literatura. O lapachol apresentou (CI₅₀ 26,3 µg/mL) quando submetido a larvas do terceiro ínstar mosquito *A. aegypti* durante o período de 24h(15).

O principal interesse em compostos derivados do lapachol está relacionado à sua capacidade de induzir o estresse oxidativo através da formação intracelular de espécies reativas do oxigênio, como o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), o ânion-radical superóxido (O₂-•) e o radical hidroxila (HO•). Estas espécies podem danificar alguns componentes celulares importantes, tanto de células normais como de malignas. Esta interferência xenobiótica altera o balanço natural de sinais que interferem na divisão celular em pontos específicos da evolução morfogênica natural (“checkpoint” ou ponto de checagem). A alteração da normalidade pode induzir a apoptose como alternativa, caso não se consiga eliminar por completo o estresse oxidativo (16). Metodologia similar, no que diz respeito à geração de espécies reativas do oxigênio, se baseia a terapia fotodinâmica, onde estas espécies são geradas por interação de

luz de comprimento de onda adequado com um fotossensibilizador e oxigênio, capazes de induzir a inviabilização de células (17).

Dentre as naftoquinonas avaliadas destacou-se significativamente o 3-Bromo-5-hidroxi-1,4-naftoquinona (q7), (Tabela II), apresentando valores melhores que a rotenona (L), inseticida de origem vegetal e vendido comercialmente, e o temefós, inseticida organofosforado um dos principais compostos utilizados atualmente no controle do vetor da dengue.

Estudos realizados com as naftoquinonas demonstram que a presença de um grupo hidroxila na posição 5 no anel aromático tem mostrado um considerado aumento na toxicidade para hepatócitos em ratos (18). Nossos resultados confirmam esse estudos uma vez que as quinonas que apresentaram melhor resultados possuem essas características.

A posição do grupo bromo na naftoquinona esta relacionado diretamente com o aumento da atividade larvicida , quando este grupo encontra-se na posição 3 da naftoquinona apresentam melhores valores de CL_{50} desde que na posição 5 da molécula esteja presente um grupo hidroxila.

A espécie *Cassia obtusifolia* é conhecida popularmente por seu potencial larvicida sobre o *A. aegypti* e *Culex pipiens pallens*, essa espécie de planta não apresenta somente importância inseticida mas também diversas propriedades medicinais. A partir de extrato da referida planta isolaram e avaliaram a atividade larvicida da emodina frente as larvas do *A. aegypti* apresentando uma CL_{50} 1,9 $\mu\text{g/mL}$.(19). Este valor é inferior ao observado para a 3-Bromo-5-hidroxi-1,4-naftoquinona (CL_{50} 0,873 $\mu\text{g/mL}$). Á 3-bromo-5-hidroxi-1,4-naftoquinona(q7) um

Tabela II -Percentual médio de mortalidade devido ao efeito dos diferentes tratamentos. Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste Tukey a 5%.

Tratamentos	% mortalidade	Tukey
q7	91,00	A
T	85,00	AB
q5	83,00	AB
q4	80,50	AB
q10	76,25	AB
q1	68,25	AB
SI	63,50	AB
q2	63,00	AB
L	61,00	AB
AL	60,25	AB
q9	53,75	AB
q8	49,00	AB
q3	46,75	AB
q6	39,50	B

potencial larvicida muito bom , sendo comparado aos larvicidas em uso como o temefós($CL_{50} = 1,510 \mu\text{g/mL}$).

Atualmente, há um grande interesse pelo conhecimento da farmacologia e do modo de atuação destas substâncias, como pode ser demonstrado pelo número crescente de publicações sobre o mecanismo de atuação da β -lapachona. O progresso quanto aos conhecimentos da bioquímica das atividades enzimáticas, além dos recentes avanços da química computacional, em muito pode contribuir para o esclarecimento em maior profundidade dos mecanismos de atividade de fármacos e, em conseqüência, para o planejamento de novas drogas comerciais (20).

Resultados *in vitro* reforçaram o potencial uso de hidroquinonas substituídas e derivados como drogas bem promissoras para uso como larvicida. Contínuos estudos tem sido realizado com essa classe de compostos. A maior desvantagem são as evidências de degradação dos metabólicos (21).

Vale salientar que a quinona que apresentou menor atividade larvicida foi o 2-Bromo-5-metoxi-1,4- naftoquinona ($CL_{50} 9,70 \mu\text{g/mL}$) mesmo assim um valor inferior que a CL_{50} descrita para o lapachol($CL_{50} 26,70 \mu\text{g/mL}$).

Baseados nos resultados aqui citados as quinonas testadas mostraram-se promissoras para serem utilizadas como biocontrole para as larvas do mosquito ^a *Aegypti* .

REFERÊNCIAS

- (1) Murugan, K.; Murugan, P.; Noortheen ^a Larvicidal and repellent potential of *Albizzia amara* boivin and *Ocimum basicum* Linn against dengue vector, *Aedes aegypti*(Insecta:Diptera:Culicidae) *Bio Techn.* **2007**, 98, pp 198-201.
- (2) Simões, C.M.; Vieira, C.P.; Fernandes, B.J. Farmacognosia – da planta ao medicamento. Porto Alegre **2002**, ed 5, pp.739–754.
- (3) Abreu F.C.; Ferraz, P.A,F.; Goulart M.O.F. Some applications of lectrochemistry. Emphasis on the correlation of electrochemical and bioactive proprties. *J. Raz. Chem. Soc.* **2002**, 13, pp 19-35.
- (4) Salmon-Chemin, L.; Buisine E.; Yardley V.; Kohler S.; Debreu M. A.; Landry V.; Sergheraert C.; Croft S. L.; Krauth-Siegel R. L.; Davioud-Charvet E. *J. Med. Chem.* **2001**, 44, pp 543-548.
- (5) Santos, A. F.; Ferraz, P.A.L.; Pinto, A.V.; Pinto, M.C.F.R.; Goulart M.O.F.; Sant’Ana A. E. G. *Int. J. Parasitol* 2003, 30, pp 1195-1199.
- (6) Santos, A. F.; Ferraz, P. A. L.; Abreu, F. C.; Chiari, E.; Goulart M. O. F.; Sant’Ana A.E.G. Molluscicidal and trypanocidal activities of lapachol derivatives. *Planta Med* **2001**, 67, pp 92-93.

- (7) Morrison, R. K.; Brown D. E.; Leson J. J.; Cooney D. A. Oral toxicology studies with lapachol *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1970, 17, pp 1-10
- (8) Guerra, M.O.; Mazoni A.S.B.; Brandão M.A.F.; Peters V.M. Interceptive effect of Lapachol in rats. *Contraception.* **1999**, 60, pp 305-307.
- (9) Mazunder, A.; Wang, S.; Neamati, N.; Nicklaus, M.; Sunder, S.; Chen, J.; Milne G.; Rice, W.; Burke, R.T.; Pommer, Y. *J. Med. Chem.* **1996**, 39, pp 2472 –2476.
- (10) Bambu, R.; Murungun, K. Interactive effect of neem seed kernel and neem gum extract on the control of *Culex quinquefasciatus* say. *Neem Newslett.* **1998**, 15, pp 9-11.
- (11) Thomson R.H. *In Naturally Occurring Quinones*, Academic Press, New York, **1971**. p 203.
- (12) Hooker, S.C. The constitution of lapachol and its derivatives. The structure of Paterno's isolapachol. *J. Am. Chem. Soc.* **1936**, 59, pp 1190-1195.
- (13) World Health Organisation. Report of WHO informal consultation on the evaluation and testing of insecticides, CTD/WHOPES/IC/96; **1996**. p.59.
- (14) Finney, D.J. *Probit Analysis*, third ed. Cambridge University Press, **1971** Cambridge.

- (15) Rodrigues, A.M.S.; Paula J.E.; Roblot, F.; Fournet, A.; Espindola L.S. Larvicidal activity of *Cybistax antisiphilitica* against *Aedes aegypti* larvae. *Fitoterap.* **2005** 76, pp755-757.
- (16) Amarantes-Mendes, G. P.; Green, D.R. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **1999**, 32, pp1053-1057.
- (17) Machado, A. E. H.; *Quim. Nova* **2000**, 23, 237.
- (18) Munday, R.; Smith, B.L. and Munday, C.M.; Comparative toxicity of 2-hydroxy-3-alkyl-1,4-naphthoquinones in rats. *Chemico-Biol. Interact.* **1995**, 98, pp 185-192.
- (19) Montanari C. A.; Bolzani V.S.;. *Quim. Nova* , **2001**, 24, pp105-109.
- (20) Yang, H.Y.C.; Lim, M.Y.; LEE H.S. Emodin isolated from *Cassia obtusifolia* (Leguminosae) Seed Shows Larvicidal Activity Against Three Mosquito Species. *Journal Of Agricultural an Food Chemistry* . **2003**, 51, pp 7629-7631
- (21) Teixeira, M.J.; Almeida, Y.M.; Viana, J.R.; Holanda, J.G.; Rodrigues T.P.; Prata J.R.C.; Coelho, I.V.B.; Rao V.S.; Pompeu M.M.L. In vitro and in vivo leishmanicidal activity of 2-hydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)-1,4-naphthoquinone (lapachol). *Phytotherap. Res.* **2003**, 15, pp 44-48.

Material Complementar

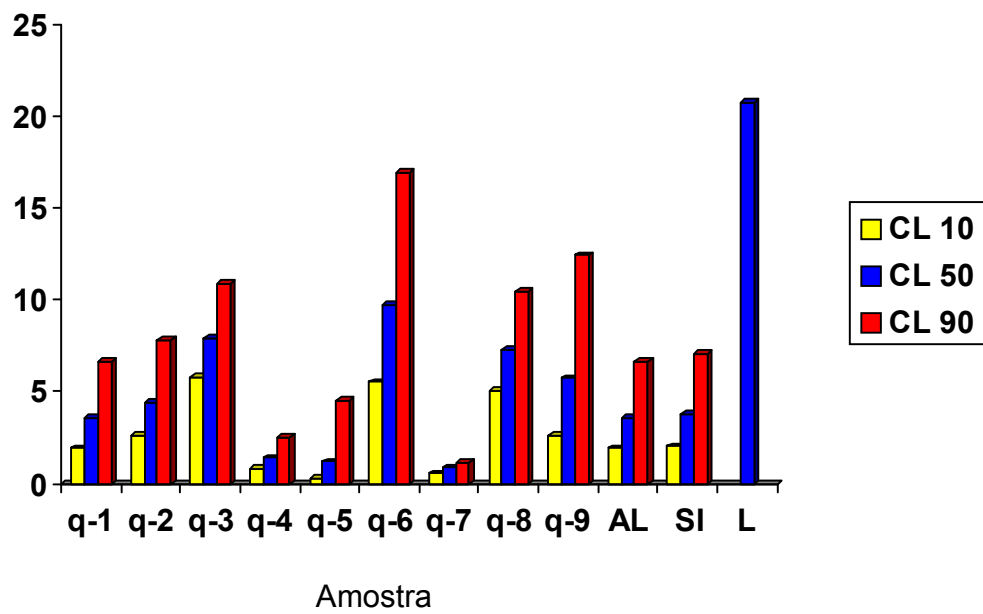


Gráfico. Relação das CL₁₀; CL₅₀; CL₉₀ para quinonas avaliadas

**Atividade Larvicida de Extratos Obtidos de *Turbina cordata*
(Choisy) Austin & Staples (Convolvulaceae) sobre *Aedes aegypti*
(DIPTERA: CULICIDAE)**

Karlos Antonio L. Ribeiro Junior^{*1}; Earlle C. da Silva¹; Chales Estevan dos Santos²;
Antonio Euzébio G. Sant'Ana¹

¹ Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Cidade
Universitária, 57072-970, Maceió-AL,

² Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Sergipe,
Av. Marechal Rondon s/n - Cidade Universitária Prof. José Aloísio de Campos
Rosa Elze, 49100-000 - São Cristóvão, SE – Brasil

Resumo: Os extratos etanólicos das folhas, caule, raiz, ramos novos e tubérculos de *Turbina cordata* foram avaliados quanto a atividade larvicida. Os ensaios da atividade foram realizados utilizando-se larvas, no quarto instar, do mosquito *A. aegypti*. Os extratos foram submetidos a investigação da atividade biológica em três concentrações diferentes, na ordem decrescente de 500, 250 e 100 µg/mL. As classes de compostos presentes foram determinados pelos testes químicos. Os extratos etanólicos da folha e do caule da *T. cordata*, apresentaram melhores atividade larvicida com os valores das CL₅₀ 175,743 µg/mL e 297,930 µg/mL respectivamente.

Unitermos: *A. aegypti*, Atividade Larvicida, *Turbina cordata*, Dengue.

Summary: The ethanol extracts of the leaves, stem, roots, twigs, and tubers of *Turbina cordata* were evaluated for larvicidal activity. The activity assays were carried out with 4th-instar larvae of mosquito *A. aegypti*. The extracts were investigated for biological activity in three decreasing concentrations of 500, 250, and 100 µg/mL. The compound classes present were determined by chemical assays. The ethanol extracts of leaves and stem of *T. cordata* presented the best larvicidal activity, with CL₅₀ values of 175.743 µg/mL and 297.930 µg/mL, respectively.

Key words: *A. Aegypti*, Larvicidal activity, *Turbina cordata*, Dengue.

INTRODUÇÃO

A importância médica de mosquitos vetores são devido à transmissão de doenças severas que causa diversos fatores como mortalidade e grandes problemas sociais e econômicos como a malária, filariose linfática e doenças virais que atualmente tem sido bastante relatados. *Aedes aegypti* é o primeiro vetor do vírus que causa a dengue, dengue hemorrágica e a febre amarela. Estes são encontrados em grandes áreas dos trópicos e subtropicais (Chainthong et al., 2006).

Até o presente momento não existe vacina efetiva para dengue, entretanto, só existe redução na incidência de casos desta doença devido ao controle do vetor que freqüentemente depende das aplicações de inseticidas sintéticos convencionais. Compostos químicos utilizados em programas de combate ao mosquito eram inicialmente considerados ativos para o decréscimo da população, mas estes têm falhado devido o seu uso constante e a grande capacidade de mutação dos insetos. Entretanto, problemas criados pelo uso de inseticidas sintéticos incluindo o desenvolvimento de resistência dos mosquitos, poluição ambiental e outros efeitos em humanos (Stepherson, 2005).

Diversos estudos comprovam a atividade larvicida de extratos vegetais contra diferentes espécie de mosquitos (Mastor et al., 1995, Furtado et al,2005, Katade et al.,2006).

A família Convolvulaceae é composta por aproximadamente 50 gêneros, com 1.800 espécies, distribuídas especialmente nas regiões tropicais (Barroso, 1986). No Brasil, está representada em todo território nacional com 14 gêneros e mais de 300

espécies (Bianchini, 1991). Nessa família, o gênero *Turbina* e está representado por 14 espécies, distribuídas principalmente pelas regiões tropicais e subtropicais do mundo, tendo como característica marcante frutos lenhosos e indeiscentes, geralmente com uma única semente (Mabberley, 1987). Segundo Bianchini (2002), *Turbina cordata* (Choisy) Austin & Staples é conhecida popularmente como “capoteira”, “batata de peba” ou “moita de calango”. É uma espécie perene, que se apresenta em diversas áreas da caatinga, (Principalmente em áreas deterioradas). *T. cordata* inicia o seu crescimento durante estação seca, setembro-outubro, ocorre florescência em março-abril, a frutificação ocorre entre os meses de maio e junho (Kiill & Ranga, 2004). A literatura descreve o isolamento de diversas classes de fitoconstituíntes nessa família, dentre os quais podem ser citados policetídeos, terpenóides, esteróides, flavonóides, xantonas, alcalóides, lignanas e, mais recentemente, glicolipídeos e ésteres de oligossacarídeos (Pereda & Hernández, 2002). Estudos com *T. cordata* verificaram que a sua ingestão causa morte em caprinos e identificaram que a substância responsável por essa causa é a swainsonina. Entretanto outros ruminantes fazem sua ingestão não ocasionando nenhum problema (Dantas et al., 2007).

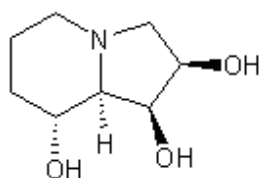


Figura 1. Fórmula estrutural da Swainsonina

Vários estudos têm sido realizados na busca e desenvolvimento de substâncias naturais para o controle dos mosquitos, sendo que diversos produtos naturais isolados tem sido encontrados. Estes têm se apresentado como uma alternativa em substituição as substâncias sintéticas, pois possuem alta atividade biológica e são compatíveis com animais, humanos e o meio ambiente (Jeyabalan et al.,2003). O presente estudo descreve a atividade larvicida e a prospecção fitoquímica de partes da *T. cordata*.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta da planta e preparação do extrato

A planta foi coletada e identificada pela Dra Lúcia Helena Piedade Kiill da Empresa Brasileira de Pesquisa agropecuária (EMBRAPA no município de Juazeiro-Ba, foram coletados: caule (167,50 g); folhas (127,20 g); ramos novos (255,30 g); raiz (215,30 g) e tubérculos (127,50 g). Após secas foram reduzidas a pó e extraídas com as seguintes quantidades de etanol, caule (500 mL), folhas (200 mL), Raiz (500 mL), tubérculos (200 mL), à temperatura de $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$ por um período de 72h por 3 dias. O solvente foi removido por destilação à pressão reduzida e o extrato obtido foi submetido aos testes de atividade. O rendimento obtido para os respectivos extratos foram caule (2,3 %); folhas (5,5 %); ramos novos (2,9 %); raiz (4,0 %) e tubérculos (15,72 %).

Ensaio de Atividade Larvicida

Os ensaios de atividade foram realizados utilizando-se larvas, no quarto instar, do mosquito *A. aegypti*. Os extratos do caule, tubérculo, ramos novos, raiz e folha foram submetidos a investigação da atividade biológica em três concentrações diferentes, na ordem decrescente de 500, 250 e 100 µg/ml.

Análise estatística

Para o cálculo das concentrações letais (CL₅₀) dos compostos avaliados foi utilizado o Probit análises. Com a finalidade de comparar a eficiência dos diversos tratamentos testados utilizou-se o teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade para comparar as médias, após a transformação dos dados em arco seno $\sqrt{x}/100$.

Prospecção Fitoquímica

Os extratos da planta utilizados neste trabalho foram submetidos à prospecção fitoquímica, seguindo-se a descrição de (Matos, 1997). Esta metodologia teve como objetivo detectar a ocorrência de diversos constituintes químicos presentes nos extratos da *T. cordata*. Para os testes sete porções de 3-4 mL de cada extrato foram dissolvidos em etanol e colocados em tubos de ensaios.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos cinco extratos etanólicos obtidos da *T. cordata*, os que se destacaram foram o extrato da folha e do caule apresentaram maior atividade larvicida (tabela 1), de acordo com os resultados desta tabela calculou-se os valores CL_{50} para os extratos respectivamente 175.743 $\mu\text{g/mL}$ e 297.930 $\mu\text{g/mL}$ e os demais $CL_{50} < 500\mu\text{g/mL}$.

Ipoema cairica (Convolvulaceae) foi estudada por Thomas, *et al.*, 2004 que avaliou o óleo essencial e registrou uma forte atividade larvicida CL_{50} 0,00223 $\mu\text{g/mL}$. Nossos resultados quando comparados aos encontrados por Thomas não são promissores.

Comparando o porcentual médio de mortalidade dos extratos testados o que apresentou resultado significativo entre foi o extrato obtido das folhas visto que este apresentou maior mortalidade. Comparados-se as médias de mortalidades verificou-se após a aplicação do teste que os extratos turbina cordata raiz e caule apresentaram níveis de mortalidade estatisticamente próximos. (tabela 2)

Tabela 1. Porcentagem de mortes, em testes de atividade contra a larva do mosquito *A. aegypti* de folhas e caule da espécie *T. cordata* com indicação dos extratos etanólicos e das concentrações utilizadas.

Extratos	Concentrações ($\mu\text{g/mL}$)			CL_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
	500	250	100	
Turbina cordata (Folhas)				

	100 %	80 %	8 %	175.743
Turbina cordata (Caule)				
	100%	30%	2%	297.930
Turbina cordata (Ramos Novos)				
	10%	1%	-	*
Turbina cordata (Raiz)				
	20%	5%	1%	*
Turbina cordata (Tubérculos)				
	4%	-	-	*

* CL₅₀ < 500µg/ml.

Tabela 2 – Percentual médio de mortalidade devido ao efeito dos diferentes tratamentos. Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Tratamentos	% mortalidade	Tukey
<i>T. cordata (Folhas)</i>	62,67	A
<i>T. cordata (Caule)</i>	44,0	AB
<i>T. cordata (Raiz)</i>	8,67	AB
<i>T. cordata (Ramos Novos)</i>	3,67	B
<i>T. cordata (Tubérculos)</i>	1,33	B

Estudos recentes com a *T. cordata* descrevem a obtenção do alcalóide (swainsonina), que a substância responsável por causar uma doença que o ataca sistema nervoso central dos caprinos levando-os à morte. A concentração da swainsonina na planta varia de 0,001% a 0,14% (Dantas *et al.*, 2007). Essa substância é encontrada facilmente no gênero *Turbina* e está relacionada com a inibição da α -mannosidase e Golgi mannosidase II causado assim doenças neurológicas (Haraguchi *et al.*, 2003; Barbosa *et al.*, 2006). Entretanto é interessante lembrar que apenas caprinos que se alimentam dessa planta são acometidos com a doença neurológica, apesar de que outras espécies como os ovinos também se alimentam e, não desenvolvem tal patologia.

Como existem poucos trabalhos conduzidos com essa planta e com interesse de se conhecer um pouco melhor a *T. cordata* realizamos o estudo de prospecção fitoquímica o qual visou conhecer os grupos químicos que podem estar presente nos seus extratos (Tabela-3).

Os resultados da prospecção fitoquímica indicaram a presença de diversas classes de compostos orgânicos entretanto vale salientar a presença de flavonóides, xantonas e catequinas em todas as partes dos extratos estudados. Já os fenóis estiveram presentes apenas nos ramos novos e caule. Entretanto alcalóides foram encontrados apenas no caule.

Tabela-3 Resultados da prospecção fitoquímica em extratos *Turbina cordata*.

Parte da planta	Resultado
Tubérculo	Taninos, Catéquinicos, Flavonas ,Xantonas ,Catequinas,Flavonóides Esteróides livres, cumarinas
Folhas	Taninos, Flabobênicos,Flavonas,Xantonas,Flavonóides, Catequinas
Ramos novos	Fenóis, Xantonas ,Flavonóides ,Catequinas
Caule	Fenóis, Catequinas, Flavonóides, Xantonas, Alcalóide

CONCLUSÃO

O estudo dos extratos obtidos da *Turbina cordata* não apresentaram atividade larvicida significativa quando comparados a outros extratos da sua família. Dentre os extratos avaliados o extrato das folhas apresentou o maior porcentual de mortalidade. Já o estudo da prospecção fitoquímico verificou um grande número de substâncias presentes nas diversas partes da planta estudada sendo que o grupo presente em todas as partes foram as xantonas.

REFERÊNCIAS

- Barbosa RC, Riet-Correa F, Medeiros, RM, Lima EF, Barros S S., Gimeno E J, Molyneux R J, Gardner D R , 2006 , Intoxication by *Ipomoea sericophylla* and *Ipomoea riedelii* in goats in the state of Paraíba, Northeastern Brazil. *Toxicon*, 47, 379.
- Chaithong U, Chochote W, Kittichain K, Jitpakdi A, Tippawangkosol P., Chaiyasit Champakaew D, Tuetun BPB, 2006, Larvicidal effect of pepper plants on *Aedes aegypti*. *Journal of Vector ecology*, 31(1): 144 -147.
- Dantas AFM, Riet-Correa F, Gardnerb D R, Medeirosa RMT, Barrosc BL, Anjosa SS, Lucena RB, 2007, Swainsonine-induced lysosomal storage disease in goats caused by the ingestion of *Turbina cordata* in Northeastern Brazil. *Toxicon*, , 49, 112-116.
- Ferreira AA.; Oliveira PM, Evangelista EA, Alves RB. Pizziollo VR, Brasileiro BG, Rodrigues FMO, Silveira D, Raslan, DS, 2006, Atividades biológicas das partes aéreas de *Ipomoea cairica* (Convolvulaceae) *Rev. Bras. Pl. Med.*, , 8, n.2, 16-18.
- Furtado RF, Lima MGA, Neto MA, Bezerra JNS, Silva MG, 2005, Atividade Larvicida de Óleos Essenciais Contra *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). *Neotropical Entomology*, 34(5) 843-847.

Haraguchi M, Gorniak SL, Ikeda K, Minami H, Kato, A., Watson, A.A., Nash, R., Molyneux, R.J., Asano N, 2003, Alkaloidal components in the poisonous plant, *Ipomoea carnea* (Convolvulaceae). *J. Agric. Food Chem.* 51, 4996-5000.

Kiill LHP, Ranga NT, 2004, Biologia da reprodução de *Turbina cordata* (Choisy) Austin & Staples (Convolvulaceae) no sertão Pernambucano, Brasil. *Sitientibus* série Ciências Biológicas, 4 (1/2), 14 -19.

Luna J S, Santos AF, Lima MRF, Omena MC, Mendonça FAC, Bieber LW e. Sant'Ana AEG, 2005, A Study Of The Larvicidal And Molluscicidal Activities Of Some Medicinal Plants From Northeast Brazil. *Journal Of Ethnopharmacology*, V. 97, N. 2, 199-206,.

Marston A, Hostettmann K, Msonthi, J D, 1995, Isolation of Antifungal and larvicidal Constituents of *Diplolophium buchanani* by Centrifugal Partition Chromatography. *J. of Nat. Prod.*, v. 58, n. 1, p.128-130.

Park IK, Shin SC, Kim CS, Lee HJ, Choi WS, 2005, Larvicidal Activity of Lignans Identified in *Phryma leptostachya* Var. *asiatica* Roots against Three Mosquito Species. *Journal of Agricultural And Food Chemistry*, v. 53, n. 4, p.969-972.

Ribeiro Jr., K.A.L. Produtos Utilizados no Controle...2007

Pereda R M, Hernández B C, 2002, HPLC isolation and structural elucidation of diastereomeric niloyl ester tetrasaccharides from Mexican scammony root. *Tetrahedron*, 58, 3154-3159.

Stephenson JR, Understanding dengue pathogenesis: implications for vaccine design. *Bulletin Of The World Health Organization*, v. 83, n. 4, Apr. 2005

Thangam T S, Kathiresan K, 1994, Studies on Mosquito Larvicidal Activity of *Rhizophora apiculata*. *International Journal of Pharmacognosy* 32, n 1, 36-39.

Thomas TG, RAO S, LAL S, 2004, Mosquito larvicidal properties of essential oil of an indigenous plant, *Ipomoea cairica* Linn. *Japanese Journal Of Infectious Diseases*, v. 57, n. 4, p.176-177.

MATERIAL COMPLEMENTAR



Foto da planta da espécie *Turbina cortada*, Fonte: Dantas *et al.*, 2007



Foto do Bioensaio Larvicida em Quadruplicata.

Teste para Fenóis e Taninos

No tubo de ensaio de número 1, foi adicionado três gotas de solução alcoólica de FeCl_3 1mol/L^{-1} . Agitou-se bem e observou-se qualquer variação de cor e/ou formação de precipitado escuro abundante. O resultado foi comparado com um teste em branco, usando-se água e FeCl_3 .

A coloração variando entre azul e vermelho é indicativo de fenóis. A formação de um precipitado azul escuro indica a presença de taninos pirogálicos (taninos hidrolisáveis) e de cor verde a presença de taninos flobabênicos (taninos condensados ou catéquicos).

A solução de cloreto férrico (FeCl_3) foi preparada adicionando-se 9g deste reagente em 50mL de água destilada contendo 2mL de ácido clorídrico 3mol/L^{-1} . Em seguida completou-se o volume para 100mL com etanol em um balão volumétrico. A solução de HCl 3mol/L^{-1} foi obtida através da adição de 33,3 mL do ácido concentrado em água destilada suficiente para 100mL de solução, em um balão volumétrico.

Teste para Antocianinas, Antocianidinas e Flavonóides

Tomou-se os tubos numerados de 2 a 4. O tubo de número 2 foi acidulado a pH 3 com HCl 3mol/L^{-1} e os tubos 3 e 4 foram alcalinizados respectivamente a pH 8,5 e 11 com NaOH 1mol/L^{-1} . A observação de qualquer mudança da coloração (Tab – 1) da solução foi interpretada como mostrado a seguir :

Tabela . indicadores de pH para identificação dos constituintes (Antocianinas , antocianidinas, flavonas, flavonóis e xantonas) de extratos.

Constituintes	COR		
	Ácido pH=3	Alcalino pH=8,5	Alcalino pH=11
antocianinas e antocianidinas	Vermelha	Lilás	Azul-púrpura
flavonas, flavonóis e xantonas	-	-	Amarela
chalconas e auronas	Vermelha	-	Vermelho Púrpuro
Flavanonóis	-	-	Vermelho Laranja

Para se obter a solução de NaOH 1mol/L^{-1} dissolveu-se 4g deste reagente em água destilada para 100mL de solução em balão volumétrico.

Teste para Leucoantocianidinas, Catequinas e Flavononas

Acidulou-se o tubo 5 por adição de HCl 3mol/L^{-1} até pH 1-3 e alcalinizou-se o tubo 6 com NaOH 1mol/L^{-1} até pH 11. Os quais foram aquecidos cuidadosamente. Foi observada modificação na coloração, por comparação com os tubos correspondentes usados no teste anterior(tabela abaixo). A interpretação dos resultados foi feita como mostrado a seguir:

Tabela . indicadores de pH para identificação dos constituintes (Leucoantocianidinas , catequinas (Taninos catéquicos), Flavononas.

Constituintes	COR	
	Meio Ácido	Meio Alcalino
Leucoantocianidinas	Vermelha	-
catequinas (Taninos catéquicos)	Pardo-amarelada	-
Flavononas	-	Vermelho Laranja

Teste para Flavonóis, Flavanonas, Flavanonóis e Xantonas

No tubo de número 7, foram adicionados alguns miligramas de magnésio granulado e 0,5 mL de HCl concentrado. O término da reação foi indicado pelo fim da efervescência. Observou-se por comparação a mudança na cor da mistura da reação nos tubos 5 e 7. O aparecimento ou intensificação da cor vermelha foi indicativo da presença de flavonóis, flavanonas, flavanonóis e/ou xantonas, livres ou seus heterosídeos.

Teste para Esteróides e Triterpenóides Liebermann-Buchard

Adicionou-se 10mL de uma solução etanólica de cada extrato em béqueres e deixou-se secar em banho-maria. Extraíu-se o resíduo seco de cada becker três vezes com porções de 1-2mL de CHCl_3 . Separou-se os extratos em tubos diferentes e colocou-se algumas gotas de CHCl_3 . Filtrou-se a solução clorofórmica em um pequeno funil fechado com uma bolinha de algodão, coberta com miligramas de Na_2SO_4 anidro, para um tubo de ensaio bem seco. Adicionou-se 1 mL de anidrido

acético e agitou-se suavemente. Adicionou-se cuidadosamente três gotas de H₂SO₄ concentrado. Agitou-se suavemente e observou-se o rápido desenvolvimento de cores. A coloração azul seguida da verde permanente é um indicativo da presença de esteróides livres. Coloração parda até vermelha indica triterpenóides pentacíclicos livres.

Teste para Saponinas

Tomou-se os resíduos insolúveis em clorofórmio, separados no teste anterior, solubilizou-se em água destilada e filtrou-se a solução para um tubo de ensaio. Agitou-se fortemente o tubo com a solução, por dois a três minutos e observou-se a formação da espuma.

Uma espuma persistente e abundante (colarinho) indica a presença de saponinas.

Teste para Alcalóides

Os extratos foram separados em tubos diferentes, solubilizados com metanol e submetidos à cromatografia em camada delgada. Após eluição, o cromatograma foi revelado com reagente de Dragendorff. O surgimento de manchas de cor alaranjada sugere a presença de alcalóides.

Teste para Antraquinonas, Antronas e Cumarinas

Foram marcados os pontos com os extratos-teste em placas cromatográficas que foram eluídas em clorofórmio. As placas foram borrifadas com uma solução de hidróxido de potássio à 10% e observou-se a presença das cores indicativas em luz

Ribeiro Jr., K.A.L. Produtos Utilizados no Controle...2007

UV 365nm. A cor vermelha indica antraquinona, a amarela indica antrona e a azul indica cumarina.

Atividade Larvicida de Terpenóides e Fenilpropanóides frente às larvas de *Aedes Aegypti* L.

Karlos Antônio L. Ribeiro Júnior^{*1} ; Earlle C. da Silva¹; Amaro de Mendonça
Cavalcante^{1,2} ; Antonio Euzébio G. Sant'ana¹

¹ Instituto de Química e Biotecnologia/Universidade Federal e Alagoas, Cidade
Universitária, 57072-970, Maceió-AL.

² Faculdade de Odontologia , Universidade Federal e Alagoas, Cidade
Universitária, 57072-970, Maceió-AL.

Resumo: Na busca por controle químico alternativo contra a *Aedes Aegypti* L. avaliamos a atividade de diversos terpenóides e fenilpropanóides de origem natural e sintética. Grande parte dos óleos vegetais possuem na sua composição estes terpenóides e fenilpropanóides avaliados. Os bioensaios foram realizados com larvas do quarto ínstar de *A. aegypti*. Dentre os compostos avaliados destacou-se o Limoneno com CL₅₀ 17,87µg/mL.

Unitermos: Dengue, Atividade Larvicida, Terpenóides, Fenilpropanóides.

Summary: In search of an alternative chemical control of *Aedes aegypti* L., we evaluated several natural and synthetic terpenoids and phenylpropanoids, which are part of the composition of a large number of vegetal oils. The bioassays were carried out with 4th-instar larvae of *A. aegypti*. Among the compounds evaluated, limonene stood out with CL₅₀ of 17.87µg/mL.

Uniterms: Dengue, Larvicidal Activity, Terpenoids, Phenylpropanoids.

INTRODUÇÃO

O *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) é atualmente o mosquito que apresenta a maior dispersão em áreas urbanas no mundo. A importância médica dessa espécie está na sua capacidade vetorial de transportar os quatro sorotipos dos vírus da dengue e o vírus amarelo. As altas densidades do mosquito estão relacionadas ao comportamento sinantrópico e ao antropofílico dessa espécie. Além disso, sua atividade hematofágica diurna e a complexidade dos centros urbanos têm maximizado os problemas de combate por aplicações espaciais de inseticidas (Silva et al., 2004).

Até o momento não existe uma vacina efetiva para o controle da dengue, nem tratamento específico da doença. Embora existam pesquisas, progresso e perspectivas de obtenção de ferramentas de controle do vetor e a medida mais eficiente na prevenção de surtos desta doença (Silva & Silva., 1999).

Na tentativa de manter a incidência da enfermidade sob controle, são destinadas, continuamente, quantias significativas de recursos para programas de controle do vetor, porém surtos de epidemias são freqüentes. Esse fato decorre de fatores relacionados a biologia e ao comportamento do vetor, somado a problemas típicos dos centros urbanos (Monart, 1994; Furtado et al., 2005).

As plantas, como organismos que co-evoluem com insetos e outros microrganismos, são fontes naturais de substâncias inseticidas e antimicrobianas, já que as mesmas são produzidas pelo vegetal em resposta a um ataque patogênico. Inúmeras substâncias acumulam-se no vegetal para sua defesa contra microrganismos, algumas delas sendo denominadas de fitoalexinas (Grayer et

al.,2001). As plantas sintetizam e emitem inúmeros compostos voláteis (aleloquímicos) para atrair polinizadores e se defender de herbívoros (Pichersky & Gershenzon, 2001). No que concerne à defesa contra herbívoros, as plantas desenvolveram dois tipos de defesa, a direta e a indireta. Na defesa direta estão envolvidas substâncias como sílica, metabólitos secundários, enzimas, proteínas além de órgãos como tricomas e espinhos que afetam diretamente a performance do inseto. Na defesa indireta estão envolvidas substâncias emitida pela planta, que atraem parasitas e predadores dos insetos fitófagos (Baldwin *et al.*,2001).terpenos e fenil propanóides voláteis sintetizados por espécies vegetais podem ter, dependendo do inseto em análise propriedades, atrativas (alimentação, polinização) e/ou repelentes e inseticidas (Silva *et al.*,2004).

Diversos estudos comprovam a atividade inseticida de terpenóides e fenilpropanóides contra diferentes espécies de insetos (Kelsey *et al.*,1984; Franzios *et al.*,1997; Knio *et al.*, 2007).

Tendo em vista a grande diversidade de vegetais existentes no Brasil, de um total estimado entre 350 e 550 mil espécies (Sandes & Blasi, 2000), estudos a partir de extratos e óleos vegetais surgem com a expectativa da obtenção de substâncias com propriedades inseticidas seletivas para serem usadas em futuras formulações de um produto comercial.

Atualmente tem sido dada ênfase na busca por novos compostos oriundos de plantas, estes apresentam seletividade contra inimigos naturais, baixa toxicidade e biodegradabilidade, além de estarem amplamente disponíveis na natureza. A plasticidade e a adaptabilidade do *A. aegypti* da natureza são as principais causas do fracasso dos inseticidas de largo espectro. os inseticidas naturais degradam-se

com maior velocidade que os sintéticos; não deixando resíduos nos alimentos ou no ambiente (Ferreira et al., 2001).

O presente trabalho teve como objetivo determinar o potencial larvicida de terpenóides e fenilpropanóides comuns a plantas.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram testados os seguintes compostos:

Álcool Culinário; Anetol ; (+) Citronelal, (+)- α -Pino; E,E- Farnesol; Safrol, isosafrol; (D)-Limoneno; (R)-Limoneno; (S)-Limoneno; (-) - trans Cariofileno , (-) - Fenchona, Cineole, Felandreno, Guaiazuleno , Cis-nerolidol, Mirceno obtidos da sigma-aldrich.

Preparo das Soluções

As soluções foram preparadas com água destilada a 1% de DMSO, para os testes iniciais na concentração de 50 μ g/mL. Para solubilizar utilizamos um aparelho de ultra-som.

Bioensaios

Nos bioensaios foram utilizadas larvas do quarto ínstar de *A. aegypti*, em quatro repetições, sendo que cada parcela experimental constou de 25 larvas, que

eram colocadas em copos descartáveis (250 mL), contendo 25 mL de solução e suas concentrações foram delimitadas pelos resultados iniciais. As larvas foram consideradas mortas quando não conseguirem atingir a superfície da solução quando o recipiente era agitado. A contagem das larvas foi realizada a hora 0 (início do experimento), 24 h e 48h, como controle negativo foi utilizado uma solução a 1 % de DMSO e como controle positivo foi usado a temefós 3 µg/mL.

Análise Estatística

Para a realização dos cálculos das concentrações letais (CL₁₀, CL₅₀, CL₉₀) utilizou-se a método Probit análises (Finney,1971). Com a finalidade de comparar a eficiência dos diversos tratamentos testados utilizou-se o teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade para comparar as médias, após a transformação dos dados em arco seno $\sqrt{x/100}$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das dezessete substâncias avaliadas das classes de terpenóides e fenilpropanóides o limoneno racêmico pertencente a classe dos terpenóides destacou-se em relação aos demais compostos avaliados apresentando o valor CL₅₀ 17,47 µg/mL (Figura-1) contra as larvas do mosquito *Aedes aegypti* . Logo após seguem os dois estereoisômeros do (+) e (-) limoneno que apresentaram estatisticamente os mesmos valores. Os terpenóides ; Citronellal, (-)- trans-cariofileno, Fenchona, Álcool Culminico, Mirceno, Cineole não apresentaram atividade

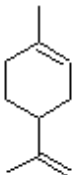
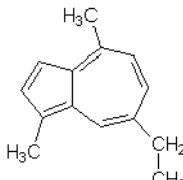
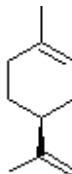
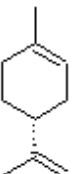
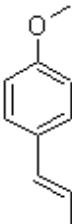
significativa. Segundo Silva e colaboradores (1999) os compostos que apresentaram CL_{50} ($>100 \mu\text{g/mL}$) não são considerados ativos.

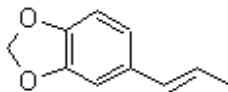
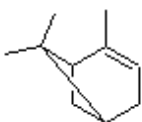
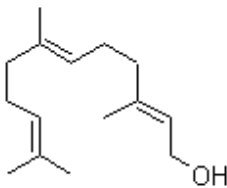

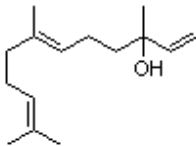
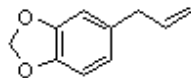
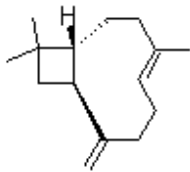
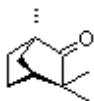
Os resultados indicam claramente que algumas características estruturais são importantes para determinar atividade biológica, o terpenóide farnesol CL_{50} ($45,34 \mu\text{g/mL}$), uma forma isomérica do *cis*-nerolidol CL_{50} ($70,19 \mu\text{g/mL}$) apresentou ser muito mais ativo que o mesmo. O mesmo acontecendo com o safrol CL_{50} ($85,93 \mu\text{g/mL}$) e o iso-safrol este apresentou uma atividade melhor CL_{50} ($33,31 \mu\text{g/mL}$).

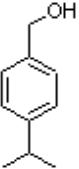
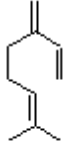

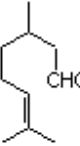
Existem relatos na literatura sobre alguns desses compostos avaliados entretanto para o guaiazuleno ainda não havia sido descrito a sua atividade, este componente de diversos óleos essenciais apresentou uma boa atividade com CL_{50} ($23,05 \mu\text{g/mL}$). Investigações recentes em vários países confirmaram que alguns óleos essenciais vegetais não somente repelem insetos, mas também apresentam ação inseticida contra insetos pragas específicos (Ismar, 2000). Outros terpenos e fenilpropanóides, como eugenol, cineol e citronellal repelem o mosquito *A. aegypti* (Coats et al, 1991) Deste modo muitos terpenos tem recebido atenção especial por parte dos pesquisadores (Alcaraz et al, 1991).

Existem relatos na literatura de alguns terpenos avaliados, (Silva et al, 2004) apresentaram as respectivas CL_{50} : Farnesol ($13,0 \mu\text{g/mL}$), *Cis*-nerolidol ($17,0 \mu\text{g/mL}$), safrol ($49,0 \mu\text{g/mL}$), carvona ($43,8 \mu\text{g/mL}$), Geraniol ($81,6 \mu\text{g/mL}$), Citronellal, ($>100,0 \mu\text{g/mL}$), Linalool ($>100,0 \mu\text{g/mL}$), Mentol ($>100,0 \mu\text{g/mL}$). Algumas dessas concentrações letais relatadas não estão de acordo com as observadas no nosso trabalho como por exemplo o farnesol e o safrol. O farnesol

Tabela 1. Terpenos e fenilpropanóides ensaiados sobre larvas de quarto estágio de *A. aegypti*

COMPOSTOS	ESTRUTURA	RESULTADOS CL ₅₀ (µg/ml)
Limoneno		17,47 (15,36 – 19,71)
Guaiazuleno		23,05 (20,65 – 25,56)
(S)-limoneno		24,46 (22,25 - 26,75)
R-limoneno		24,98 (21,64 - 28,51)
Anetol		25,44 (23,49 – 27,47)

Iso – safrol		33,31 (30,75 –36,00)
α - Pineno		42,17 (38,09 – 46,71)
Farnesol		45,34 (40,89 - 49,85)
Felandreno		67,32 (56,19 –79,79)
Cis -Nerolidol		70,19 (65,96 – 74,68)
Safrol		85,93 (72,74 –107,70)
(-)- trans Cariofileno		> 100,00
Fechona		> 100,00

Álcool Culminico	 <chem>CC1=C(C)C=C(CO)C1CO</chem>	> 100,00
Mirceno	 <chem>CC(=C)C=CC(=C)C</chem>	> 100,00
Cineole	 <chem>CC1=C(C)C2=C(C1)OCC2</chem>	> 100,00
Citronellal	 <chem>CC(=C)C(C)CC=O</chem>	> 100,00

apresentou segundo Silva e colaboradores (2004) uma CL_{50} (13,0 $\mu\text{g/mL}$) e o safrol (49,0 $\mu\text{g/mL}$), entretanto observamos valores bem maiores para o farnesol, Cl_{50} (45,34 $\mu\text{g/mL}$), e também para safrol (85,93 $\mu\text{g/mL}$). Tal discrepância pode esta no tipo de larva utilizado para o ensaio uma vez que estes autores utilizaram apenas larvas do terceiro instar. Outro fato também pode ser o número de larva utilizado para cada parcela dos bioensaios.

Comparando os compostos avaliados (tabela 2.) observamos que o limoneno apresentou a melhor atividade, além do mais os compostos: Limoneno, Guaiazuleno, (S)-limoneno, R-limoneno, Anetol, Iso-safrol apresentaram valores significativos quando comparados ao temefós.

Alguns resultados foram coincidentes como os citados para o citronelal e para o mirceno que não apresentaram atividade significativa em nenhum dos trabalhos e para o álcool culminico, Cineol e trans-cariofileno que também apresentaram valores para CL_{50} maior que 100 $\mu\text{g/mL}$. Tais resultados foram observados também por Omena (2005).

Tabela 2 – Percentual médio de mortalidade devido ao efeito dos diferentes tratamentos. Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Compostos	% mortalidade	Tukey
Temefós	85,00	A
Limoneno	72,00	AB
Guaiazuleno	63,25	AB
(S)-limoneno	62,00	AB
R-limoneno	61,25	AB
Anetol	61,00	AB
Iso – safrol	52,00	AB
α - Pineno	43,00	ABC
Farnesol	41,50	ABC
Felandreno	29,75	BC
Cis -Nerolidol	26,50	BC
Safrol	23,00	BC
(-)- trans Cariofileno	0,75	C
Fechona	0,25	C
Álcool Culminico	0,25	C
Mirceno	0,00	C
Cineole	0,00	C
Citronellal	0,00	C

CONCLUSÃO

Dentre os diversos terpenóides avaliados destacou-se o Limoneno com CL_{50} 17,47 μ g/ml. Algumas características estruturais são importantes para atividade biológica. O terpenóide farnesol CL_{50} (45,34 μ g/mL), uma forma isomérica do nerolidol CL_{50} (70,19 μ g/mL) apresentou ser mais ativo que o nerolidol, outro exemplo ocorreu entre o iso-safrol (33,31 μ g/mL) e o safrol (85,93 μ g/mL). O estereoisomerismo não mostrou ser sempre um fator determinante para atividade larvicida podendo acontecer em alguns casos como os citados acima. Entretanto, vale salientar que entre os isômeros do Limoneno os valores das CL_{50} foram estatisticamente os mesmos.

O Limoneno, Guaiazuleno, (S)-limoneno, R-limoneno, Anetol, Iso-safrol apresentaram valores significativos quando comparados ao temefós.

REFERÊNCIA

Alcaraz M, Rios J L, 1991, *Ecological chemistry and biochemistry of plants*; ed.; Clarendon press:Oxford, U.K, 230-263.

Baldwin J.T, Halitschke R, Kessler A, Schittko U, *Curr. Opin. Plant. Biol.*, 4, 351.

Coats J.R, Karr L, Drewes C D, Hedin, PA, 1991, naturally Occurring pest Bioregulators; ed.; ACS Symposium series 449; American chemical society: Washington,DC, 306-316.

Ferreira, JTB, Corrêa AG, Vieira PC, 2001, Produtos Naturais No Controle De Insetos- Série De Textos Da Escola De Verão Em Química. Vol. III Ed. Ufscar.

Franzios G, Mirotso M, Hatziapostolou E, Kral J, Scouras ZG, Mavragani-Tsipidou P 1997, *J. Agric. Food Chem.*, 45, 2690-2695.

Furtado RF, Lima MGA, Neto MA, Bezerra JNS, Silva MGV, 2005, Atividade Larvicida de Óleos Essenciais Contra *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). *Neotropical Entomology*, 34(5) 843-847.

.Finney DJ, 1971 Probit Analysis, third ed. Cambridge University Press, Cambridge.

Ribeiro Jr., K.A.L. Produtos Utilizados no Controle...2007

Grayer R.J; Kokubum, T.; *Phytochemistry*; 2001,56,253.

Ismar MB, 2000, *Crop Prot.* 19,603-607.

Kelsey RG, Reynolds GW, Rodriguez E, Healey PL, 1984, *Biology and chemistry of plant trichomes*, Ed I, Plenum Press: New York.

Knio K M, Usta J, Dagher S, Zournajian H, Kreydiyyeh S, 2007, Larvicidal Activity of essential oils extracted from commonly used herbs in Lebanon against the seaside mosquito, *Ochlerotatus caspius*. *Bioresourse technology*. In press

Monath T.P, 1994 Dengue: The risk to developed and developing countries. *Proc Natl Acad Sci USA*. 91: 2395-2400.

Omena MC, ES Bento, De Paula JE, Sant'Ana AEG, 2006, ES, Vector Borne Zoonotic Dis. 6:216.

Pichersky, E; Gershenzon, *J.Curr. Opin. Plant Biol.* 2002,5, 237.

Sandes ARR, Blasi G, 2000, Biodiversidade química e genética. *Biotec. Cie. Des.* 13: 28-37.

Ribeiro Jr., K.A.L. Produtos Utilizados no Controle...2007

Silva HHG, Silva IG, Santos RMG, Filho ER, Elias CN, 2004, Larvicidal activity of tannins isolated of *Magonia pubescens* St. Hil. (Sapindaceae) against *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 37: 396-399.