



## Avaliação da atividade larvicida de saponinas triterpênicas isoladas de *Pentaclethra macroloba* (Willd.) Kuntze (Fabaceae) e *Cordia piauhiensis* Fresen (Boraginaceae) sobre *Aedes aegypti*

G.M.P. Santiago<sup>1,3\*</sup>, F.A. Viana<sup>2</sup>, O.D.L. Pessoa<sup>3</sup>, R.P. Santos<sup>3</sup>, Y.B.M. Pouliquen<sup>3</sup>, A.M.C. Arriaga<sup>3</sup>, M. Andrade-Neto<sup>3</sup>, R. Braz-Filho<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Farmácia, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará, Rua Capitão Francisco Pedro, 1210, Rodolfo Teófilo, 60430-370, Fortaleza, CE, Brasil,

<sup>2</sup>Departamento de Química, Universidade do Estado do Rio Grande do Norte, 59610-210, Mossoró, RN, Brasil,

<sup>3</sup>Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, CP 12200, 60021-970, Fortaleza, CE, Brasil,

<sup>4</sup>Setor de Química de Produtos Naturais, LCQUI, CCT, Universidade Estadual do Norte Fluminense, 28013-600, Campos, RJ, Brasil

**RESUMO:** A atividade larvicida de quatro saponinas monodesmosídicas (1-4) isoladas de *Pentaclethra macroloba* e de uma saponina bidesmosídica (5) isolada de *Cordia piauhiensis* foi avaliada sobre larvas de estágio 3 de *Aedes aegypti*. As larvas foram expostas a várias concentrações (500, 250, 100, 50, 25 e 12,5 µg/mL) das saponinas por um período de 24 h. Os resultados indicam que somente as saponinas 1-3 mostraram alta atividade larvicida, com CL<sub>50</sub> variando de 18,6 a 27,9 µg/mL. Estes resultados ressaltam as potencialidades destas saponinas como possíveis agentes larvicidas naturais.

**Unitermos:** *Aedes aegypti*, *Pentaclethra macroloba*, *Cordia piauhiensis*, saponinas.

**ABSTRACT:** "Evaluation of larvicidal activity of triterpenoid saponins isolated of *Pentaclethra macroloba* (Willd.) Kuntze (Fabaceae) and *Cordia piauhiensis* Fresen (Boraginaceae) against *Aedes aegypti*". The larvicidal activity of the four monodesmoside saponins (1-4) isolated from *Pentaclethra macroloba* and one bidesmoside saponin (5) from *Cordia piauhiensis* was evaluated on 3<sup>rd</sup> instar larvae of *Aedes aegypti*. The larvae were exposed to serial concentrations (500, 250, 100, 50, 25 and 12.5 µg/mL) saponins for a period of 24 h. The results indicate that, only the saponins 1-3 showed high larvicidal activity, with LC<sub>50</sub> ranging of 18,6-27,9 µg/mL. These results suggest that these can be used as natural larvicidal agents.

**Keywords:** *Aedes aegypti*, *Pentaclethra macroloba*, *Cordia piauhiensis*, saponins.

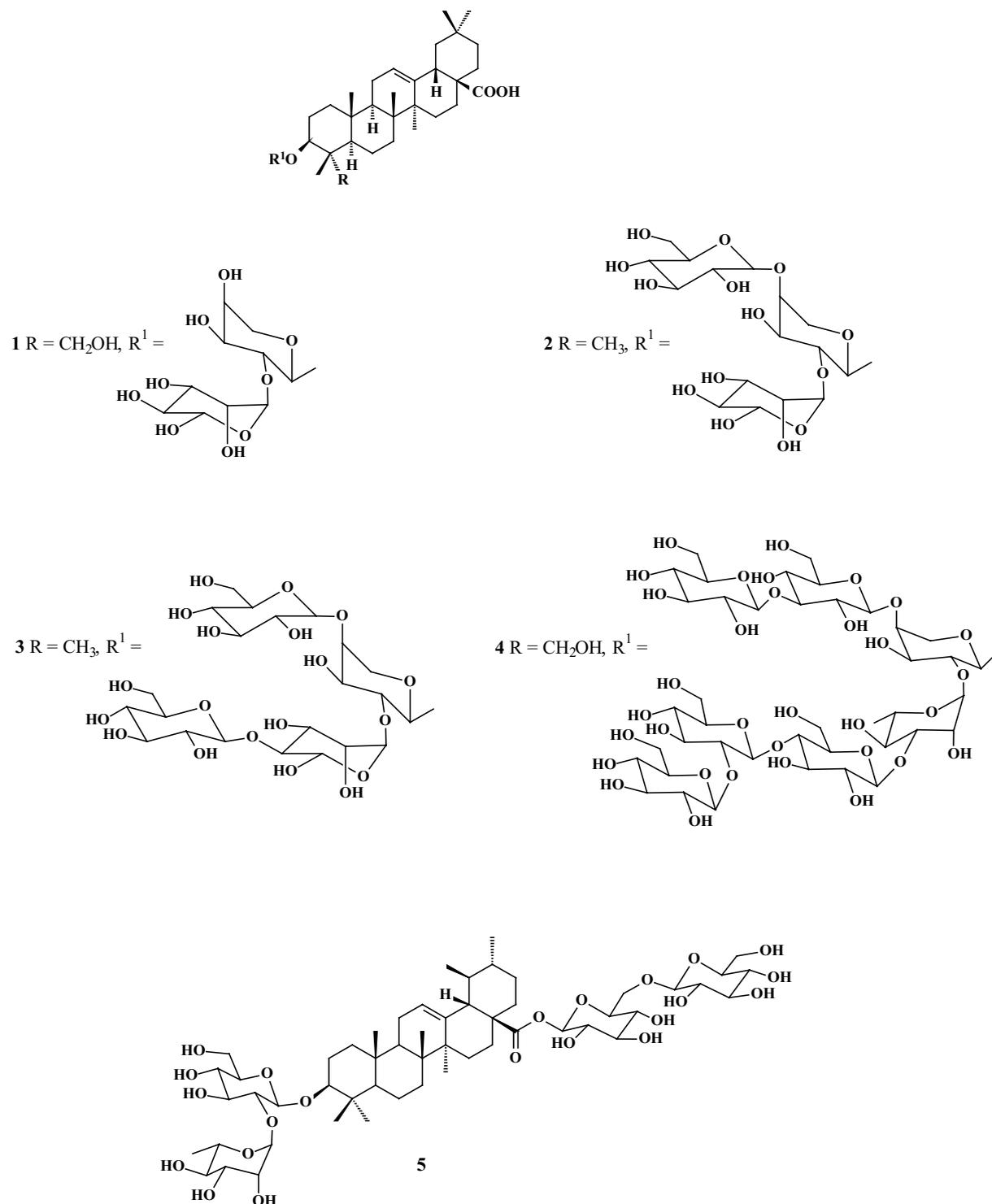
### INTRODUÇÃO

Mosquitos atuam como vetores de diversas doenças, causando sérios problemas à saúde do homem e em alguns casos levando ao desenvolvimento de epidemias de difícil controle. O uso contínuo e indiscriminado de inseticidas químicos no combate a mosquitos causadores em potencial de certas doenças infecciosas tem provocado danos à saúde do homem e ao meio ambiente, além de promover a seleção de resistência nestes aos inseticidas comerciais. Estes efeitos indesejáveis têm instigado pesquisadores a buscar medidas alternativas de erradicação de mosquitos. Desta forma, pesquisas estão sendo realizadas no sentido de descobrir inseticidas naturais, efetivos e seguros. Muitas plantas produzem

metabólitos secundários que apresentam atividade inibitória de crescimento de insetos (Chariandy et al., 1999), enquanto outras, agem como repelente (Mohan; Fields, 2002). O uso destes constituintes de plantas como agentes de controle de insetos e como controle de larvas é uma interessante perspectiva.

O *Aedes aegypti* atua como vetor da febre amarela na América Central, na América do Sul e no Oeste da África. Este mosquito é também o vetor da dengue, que é endêmica no Sudoeste da Ásia, ilhas do Pacífico e Américas (Ciccia; Cousio; 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 contaminada.

Para se evitar a doença fez-se necessário



**Figura 1.** Estruturas das saponinas 1 - 5 testadas sobre as larvas de *Aedes aegypti*. As saponinas 1-4 foram isoladas de *Pentaclethra macroloba* e a saponina 5 foi isolada de *Cordia piauhiensis*.

intensificar as ações de prevenção e combate ao vetor da dengue.

Existem inúmeros trabalhos descrevendo o uso de produtos naturais (Yang et al., 2002; Araujo et al., 2003; Albuquerque et al., 2004), inclusive de saponinas como agentes larvicidas (Pelah; Abramovich; Wiesman, 2002).

Tendo em vista a ocorrência desta classe de substâncias químicas nas espécies *Pentaclethra macroloba* (Willd.) Kuntze (Fabaceae) e *Cordia piauhiensis* Fresen. (Boraginaceae), decidiu-se avaliar a atividade larvicida das saponinas isoladas a partir destas espécies vegetais.

A espécie *Pentaclethra macroloba* (Willd.)

**Tabela 1.** Valores de percentual da mortalidade das larvas de *Aedes aegypti* causadas pelas saponinas 1-5

Conc. ( $\mu\text{g/mL}$ )	1	2	3	4	5
500	100	100	100	100	0
250	100	100	100	100	0
100	100	100	100	40	0
50	100	100	100	0	0
25	89	51	16	0	0
12,5	7	0	0	0	0

Kuntze (Fabaceae), conhecida popularmente como “pracaxi” é encontrada na região Amazônica, especificamente no Estado do Amapá e estudos relatam a atividade inseticida de suas sementes (Chun et al., 1994), enquanto *Cordia piauhiensis* Fresen. (Boraginaceae) é uma planta endêmica do Brasil, distribuída nas regiões Sul, Sudeste, Sudoeste e Nordeste (Santos et al., 2003).

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material vegetal

Galhos e sementes da espécie *P. macroloba* foram coletados na localidade de Fazendinha, no município de Macapá-AP, enquanto o caule de *C. piauhiensis* foi coletado no município do Crato-CE. As exsiccatas das plantas representando estas coletas encontram-se arquivadas no Herbário Prisco Bezerra da Universidade Federal do Ceará, sob os números EAC-2594 e EAC 29104, respectivamente.

### Constituintes químicos

As saponinas 1-4 foram isoladas e purificadas a partir dos extratos de *P. macroloba*: 1 foi isolada do extrato etanólico das sementes, 2 e 3 do extrato etanólico da casca dos galhos e a saponina 4 do extrato etanólico do lenho dos galhos. É válido acrescentar que o isolamento, a purificação e a determinação estrutural das saponinas 1-4 encontram-se descritos na literatura (Viana et al., 2004a,b). Por outro lado, a saponina 5 foi isolada do caule de *C. piauhiensis* (Santos et al., 2003).

No isolamento das saponinas 1-5 (Figura 1) foi empregado uma combinação de técnicas clássicas como cromatografia gravitacional em gel de sílica, cromatografia por exclusão molecular usando Sephadex LH-20, bem como, técnica de alta precisão e reprodutibilidade como

cromatografia líquida de alta eficiência- CLAE.

Na elucidação estrutural utilizou-se técnicas espectroscópicas de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  uni- e bidimensionais ( $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ -COSY, gs-HMQC, gs-HMBC, ROESY, NOESY e TOCSY) bem como, espectrometria de massa por ionização química por eletrospray (ESI) e por bombardeamento rápido de átomos (FAB), fundamentais na análise da sequência de ligação dos açúcares nas unidades osídicas (Santos et al., 2003; Viana et al., 2004a,b).

### Ensaio larvicida

Nos bioensaios, os ovos de *A. aegypti* foram eclodidos em água isenta de cloro, à temperatura ambiente. Em condições normais, os ovos maduros eclodem quando submersos em meio líquido e apresentam quatro estágios larvários, sendo selecionadas larvas de estágio 3 para serem utilizadas no presente estudo.

Em um béquer de 50 mL, à temperatura ambiente, as amostras testadas, em diferentes concentrações (12,5  $\mu\text{g/mL}$  a 500  $\mu\text{g/mL}$ ) foram dissolvidas em 0,3 mL de DMSO e a cada solução foram adicionadas 50 larvas de estágio 3, completando-se o volume para 20 mL com água. Após 24 horas, à temperatura ambiente, as larvas mortas foram contadas e calculada a percentagem letal e posteriormente a  $\text{CL}_{50}$ . Os testes foram feitos em triplicata (Oliveira et al., 2002). Paralelamente foram feitos testes em branco, utilizando-se DMSO e água.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O potencial larvicida das saponinas 1-5 (Figura 1) foi avaliado sobre larvas do mosquito *A. aegypti* com o objetivo de encontrar produtos naturais eficazes e seguros e que no futuro possam substituir os compostos organofosforados ou outros agentes sintéticos.

A análise do percentual de mortalidade das larvas

**Tabela 2.** Valores de  $\text{CL}_{50}$  ( $\mu\text{g/mL}$ ) apresentados pelas saponinas 1, 2, 3 e 4 frente às larvas de *Aedes aegypti*.

Amostra testada	Número de açúcares	Genina	$\text{CL}_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
1	2	hederagenina	$18,6 \pm 0,29$
2	3	ácido oleanólico	$25,1 \pm 0,41$
3	4	ácido oleanólico	$27,9 \pm 0,26$
4	7	hederagenina	$104,7 \pm 0,33$

de *A. aegypti*, partindo de uma concentração de 500 µg/mL a 12,5 µg/mL das saponinas **1-5** (Tabela 1), permitiu determinar os valores de CL<sub>50</sub> (Tabela 2). Dentre as amostras que foram submetidas aos bioensaios, observou-se que a saponina **1**, a qual contém dois açúcares em sua unidade osídica apresentou a melhor atividade larvicida, com um valor de CL<sub>50</sub> igual 18,6 ± 0,29 µg/mL. Foi também possível concluir que aquelas saponinas que continham um menor número de açúcares apresentaram uma melhor atividade (Tabela 1). Este fato tanto pode ser observado nas saponinas derivadas da hederagenina (**1** e **4**), como nas derivadas do ácido oleanóico (**2** e **3**). A saponina **5**, que tem como genina o ácido ursólico não apresentou qualquer atividade larvicida.

É válido acrescentar que as saponinas **1-4**, que apresentaram atividade larvicida, são monodesmosídicas e apresentam o grupo carboxila em C-28 livre, enquanto a saponina **5**, que não apresentou atividade larvicida, é bidesmosídica e tem o seu grupo carboxila esterificado, sugerindo, portanto, que o grupo carboxila constitui uma unidade essencial para a atividade larvicida.

Tendo em vista os resultados obtidos, pode-se sugerir que as saponinas **1, 2 e 3** são promissores agentes larvicidas, pois de acordo com a literatura (Cheng et al., 2003), substâncias com valores de CL<sub>50</sub> menores que 100 µg/mL são considerados bons agentes larvicidas.

## CONCLUSÃO

O resultado da avaliação da atividade larvicida das saponinas **1-5** mostrou que a saponina **1**, isolada das sementes de *Pentaclethra macroloba*, foi a mais ativa, confirmando, portanto, a atividade inseticida apresentada pelas sementes encontrada na literatura (Chun et al., 1994). Além do mais, observou-se um maior potencial larvicida para as saponinas monodesmosídicas e com um menor número de unidades de açúcares.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq, CAPES, FUNCAP e PRONEX pelo suporte financeiro e ao NUEND pela concessão das larvas.

## REFERÊNCIAS

- Albuquerque MRJR, Silveira ER, Uchoa DEA, Lemos TLG, Souza ES, Santiago GMP, Pessoa ODL 2004. Chemical composition and larvicidal activity of the essential oils from *Eupatorium betonicaeforme* (D.C.) Baker (Asteraceae). *J Agric Food Chem* 52: 6708-6711.
- Araújo ECC, Silveira ER, Lima MAS, Andrade-Neto M, Andrade IL, Santiago GMP, Mesquita ALM 2003. Insectidal activity and chemical composition of volatile oils from *Hyptis martiusii*. *J Agric Food Chem* 51: 3760-3762.
- Chariandy CM, Seaforth CE, Phelps RH, Pollard GV, Kambay BPS 1999. Screening of medicinal plants from Trinidad and Tobago for antimicrobial and insecticidal properties. *J Ethnopharmacol* 64: 265-270.
- Cheng SS, Chang HT, Chang ST, Tsai KH, Chen WJ 2003. Bioactivity of selected plant essential oils against the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* larvae. *Bioresource Technol* 89: 99-102.
- Chun J, Goodman CL, Rice WC, Mcintosh AH, Chippendale GM, Schubert KR 1994. *Pentaclethra macroloba* seed effect on larval growth cell viability and midgut enzyme activity of *Helicoverpa zea*. *J Econ Entomol* 87: 1754-1760.
- Ciccio G, Coussio J, Mongelli E 2000. Insecticidal activity against *Aedes aegypti* larvae of some medicinal South American plants. *J Ethnopharmacol* 72: 185-189.
- Mohan S, Felds PG 2002. A simples technique to assess compounds that are repellent or attractive to stored-products insects. *J Stored Prod Res* 38: 23-31.
- Oliveira MF, Lemos TLG, Mattos MC, Segundo TA, Santiago GMP, Braz-Filho R 2002. New enamines derivatives of lapachol and biological activity. *An Acad Bras Cienc* 74: 311-221.
- Pelah D, Abramovich Z, Wiesman MK 2002. The use of commercial saponin from *Quillaja saponaria* bark as a natural larvicidal agent against *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. *J Ethnopharmacol* 81: 407-409.
- Santos RP, Viana FA, Lemos TLG, Silveira ER, Braz-Filho R, Pessoa, ODL 2003. Structure elucidation and total assignment of <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C nmr data for a new bisdesmoside saponin from *Cordia piuihiensis*. *Magn Reson Chem* 41: 735-738.
- Viana FA, Braz-Filho R, Pouliquen YBM, Andrade-Neto M, Santiago GMP, Rodrigues-Filho E 2004a. Triterpenoid saponins from stem bark of *Pentaclethra macroloba*. *J Braz Chem Soc* 15: 595-602.
- Viana FA, Pouliquen YBM, Andrade-Neto M, Santiago GMP, Pessoa ODL, Rodrigues-Filho E, Braz-Filho R 2004b. Complete <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C assignments for two new monodesmoside saponins from *Pentaclethra macroloba* (Willd.) Kuntze. *Magn Reson Chem* 42: 695-699.
- Yang YC, Lee SG, Lee HK, Kim MK, Lee SH, Lee HS 2002. A piperidine amide extracted from *Piper longum* L. fruit shows activity against *Aedes aegypti* mosquito larvae. *J Agric Food Chem* 50: 3765-3767.