

PRODUTOS NATURAIS PARA O CONTROLE DA TRANSMISSÃO DA DENGUE – ATIVIDADE LARVICIDA DE *Myroxylon balsamum* (ÓLEO VERMELHO) E DE TERPENÓIDES E FENILPROPANÓIDES**Naomi Kato Simas, Elisângela da Costa Lima, Sheila da Rocha Conceição, Ricardo Machado Kuster* e Alfredo Martins de Oliveira Filho**

Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Bloco H, Ilha do Fundão, 21941-590 Rio de Janeiro - RJ

Celso Luiz Salgueiro Lage

Instituto de Biofísica, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Bloco G, Ilha do Fundão, 21941-590 Rio de Janeiro - RJ

Recebido em 5/12/02; aceito em 7/7/03

NATURAL PRODUCTS FOR DENGUE TRANSMISSION CONTROL– LARVICIDAL ACTIVITY OF *Myroxylon balsamum* (RED OIL) AND OF TERPENOIDS AND PHENYLPROPANOIDS. The bioassay-guided fractionation of the hexane extract obtained from the medicinal plant *Myroxylon balsamum* (red oil) was conducted in preparative thin layer chromatography on silica gel. The obtained fractions and some terpenoids and phenylpropanoids were assayed as larvicidal on third instar *Aedes aegypti* larvae, NPPN colony. The results indicate that the sesquiterpene nerolidol was the active constituent in the extract and that the sesquiterpenes were more active than the monoterpenes and phenylpropanoids utilized in this study. Lipophilicity seems to be an important property for the activity since the compounds with hydroxyl, carbonyl and methoxyl groups were less active. The results confirm also that essential oils can be a good tool for the control of dengue.

Keywords: essential oil constituents; *Aedes aegypti*; *Myroxylon balsamum*.

INTRODUÇÃO

O dengue é uma infecção reemergente que vem preocupando as autoridades sanitárias de todo o mundo em virtude de sua circulação nos cinco continentes e grande potencial para assumir formas graves e letais. No período compreendido entre 1955 e 1995 foram registrados cerca de 3 milhões de casos de febre hemorrágica do dengue e 58 mil mortes¹. Com o surgimento de formas resistentes do mosquito aos inseticidas convencionais utilizados, tem crescido a procura por extratos vegetais e substâncias naturais que sejam efetivas no combate ao mosquito adulto e/ou à larva de *Aedes aegypti* e que sejam isentas de toxicidade para o meio ambiente. Resistência a inseticidas convencionais é um dos principais obstáculos ao controle de insetos pestes de importância na agricultura e na medicina. A resistência resulta no aumento da frequência de aplicação de inseticida, dosagens crescentes, rendimentos diminuídos, danos ambientais e surgimento de doenças, quando os vetores não podem ser controlados. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o custo da resistência de insetos a inseticidas pode alcançar anualmente US\$ 1,4 bilhões nos Estados Unidos².

Plantas, como organismos que co-evoluem com insetos e outros microorganismos, 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 microorganismos, algumas delas sendo denominadas de fitoalexinas³. As plantas sintetizam e emitem inúmeros compostos voláteis (ácidos, aldeídos e terpenos) para atrair polinizadores e se defender de herbívoros⁴. 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 e proteínas,

além de órgãos como tricomas e espinhos que afetam diretamente a performance do inseto. Na defesa indireta estão envolvidas substâncias emitidas pela planta, que atraem parasitas e predadores do inseto fitófago⁵. Terpenos e fenilpropanóides voláteis sintetizados por espécies vegetais podem ter, dependendo do inseto em análise, propriedades atrativas (alimentação, polinização) e/ou deterrentes e inseticidas⁶. Nos últimos anos, óleos essenciais obtidos de plantas têm sido considerados fontes em potencial de substâncias biologicamente ativas⁷. Ênfase tem sido dada às propriedades antimicrobiana, antitumoral e inseticida de compostos voláteis, além de sua ação sobre o sistema nervoso central⁷. Os óleos essenciais obtidos, por exemplo, de *Mentha pulegium* e *M. spicata* são muito eficazes como inseticidas⁷. Pequenas quantidades já são suficientes para causar a morte de inúmeros insetos. Os monoterpenos pulegona, mentona e carvona, os principais constituintes do óleo de menta, foram considerados tóxicos para larvas de *Drosophila melanogaster*⁸.

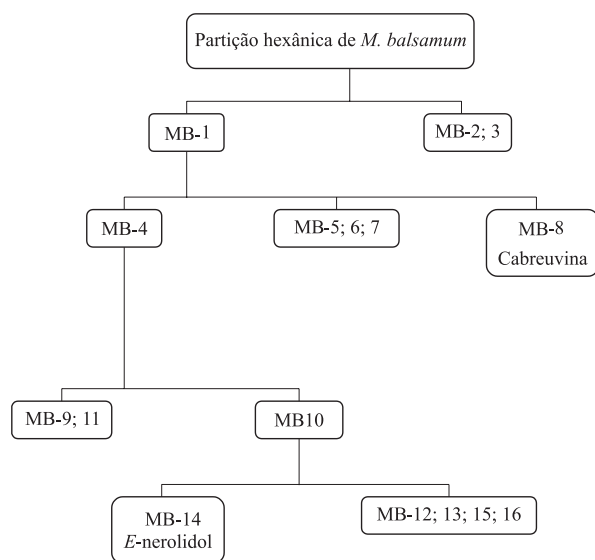
Neste trabalho, descrevemos o fracionamento do extrato hexânico de *Myroxylon balsamum* (óleo vermelho) guiado pelo ensaio biológico larvicida (larvas de terceiro estágio de *A. aegypti*) preconizado pela OMS, para se determinar a(s) substância(s) ativa(s) contra o mosquito transmissor do dengue. A planta sob estudo ocorre em todo o continente americano, inclusive no Brasil, onde o óleo extraído das cascas tem sido utilizado para propósitos medicinais e também como inseticida⁹. Além disso, mostramos para comparação, a atividade larvicida de vários constituintes de óleos essenciais vegetais brasileiros.

PARTE EXPERIMENTAL**Extração do material vegetal e fracionamento cromatográfico**

Cerca de um kg das cascas secas de *Myroxylon balsamum* foram fornecidas pela empresa fitofarmacêutica Laboratório Simões (Rio

*e-mail: kuster@nppn.ufrj.br

de Janeiro). A autenticidade do material foi verificada por cromatografia líquida de alta eficiência, através da presença do isoflavonóide cabrevina, conhecido marcador químico da espécie¹⁰. O material vegetal foi extraído por maceração em etanol por duas semanas. Após este período, o extrato foi filtrado e seco em evaporador rotativo (12,5 g). O extrato etanólico seco foi ressuspensão em metanol/água (9:1) e submetido à partição líquido-líquido em hexano. A fase inferior hidroalcoólica foi novamente seca em evaporador rotativo, ressuspensão em água e extraída com clorofórmio e acetato de etila, respectivamente. Após a obtenção de cada uma das três partições orgânicas secas (2,5 g, 2,4 g e 4,8 g), as mesmas foram ensaiadas sobre larvas de terceiro estágio de *A. aegypti*. Toxicidade foi encontrada para a fração hexânica, a qual foi então submetida ao fracionamento cromatográfico guiado pelo ensaio larvicida, para a identificação das substâncias ativas. O extrato hexânico foi fracionado em cromatografia em camada fina preparativa de gel de sílica, utilizando como eluente o sistema de solventes hexano/acetato de etila (1:1). Após a eluição da placa preparativa, três regiões foram destacadas (MB-1, 2, 3) através de observação do cromatograma com lâmpada de luz ultra violeta 254 e 366 nm (Esquema 1). A fração mais apolar (MB-1) foi então novamente cromatografada em camada fina preparativa de gel de sílica, eluída com hexano/acetato de etila (4:1). O cromatograma foi dividido com o auxílio de lâmpada ultravioleta em cinco frações (MB-4, 5, 6, 7 e 8 – Esquema 1). As frações MB-4 a MB-8 foram ensaiadas em *A. aegypti* e a fração apolar MB-4 foi recromatografada em camada fina preparativa de gel de sílica com hexano/acetato de etila (9:1) como sistema de solventes. O cromatograma originou três frações (MB-9, 10 e 11 – Esquema 1) observadas sob lâmpada de ultravioleta. A fração MB-10 foi refractionada em cromatografia em camada fina preparativa de gel de sílica (hexano/acetato de etila - 5%) para originar seis novas frações (MB-12, 13, 14, 15 e 16 – Esquema 1), todas ensaiadas em larvas de *A. aegypti*.



Esquema 1. Fracionamento guiado por bioensaio da partição hexânica de *Myroxylon balsamum* – Cromatografia em camada fina preparativa de gel de sílica

Mosquitos

As larvas de terceiro estágio de *Aedes aegypti* foram obtidas de uma colônia estabelecida no Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais, a partir de larvas coletadas em bairros do Rio de Janeiro e

mantida, há pelo menos dez anos, sob condições controladas de temperatura ($T = 27 \pm 2$ °C), umidade relativa ($UR = 70 \pm 5\%$) e tempo de exposição à luz de 12 h.

Ensaio larvicida

Os ensaios biológicos foram realizados segundo metodologia preconizada pela OMS¹¹ adaptada: em recipientes (becker) contendo 15 mL de água filtrada, 100 µL da amostra na concentração desejada (4-170 ppm). Após 30 min de homogeneização da amostra-teste adicionaram-se 4,9 mL de água filtrada e cinco larvas de terceiro estágio de *A. aegypti*. A solubilização das amostras foi realizada utilizando-se os solventes etanol, acetona ou dimetilsulfóxido. Em todos os ensaios foram mantidos controles dos solventes e da água utilizada. As concentrações de cada amostra ensaiada foram repetidas no mínimo 4 vezes, com duas a três réplicas em cada ensaio. A leitura foi realizada após 24 h, verificando-se o número de larvas mortas. Os dados obtidos foram lançados em gráfico de probitos da mortalidade x concentrações (ppm) através de programa estatístico SPSS (“Statistical Product and Service Solutions”) para Windows para determinação das concentrações letais 50% (CL_{50}) e 99% (CL_{99}).

Substâncias químicas

A lista abaixo foi obtida da empresa Sigma-Aldrich.

Monoterpenos: (+)-citronelal, (±)-linalool, (-)-mentol, geraniol, (+)- α -pineno, (+)- β -pineno e (-)-carvona; sesquiterpenos: *E,E*-farnesol; fenilpropanóides: safrol, eugenol e *E*-cinnamaldeído.

RMN de ¹H

A ressonância magnética nuclear de ¹H foi feita em um espectrômetro Varian, modelo Gemini 200, na frequência de 200 MHz, tendo como solvente $CDCl_3$ e TMS como referência interna.

CLAE/UV

Análise de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de feixe de fotodiodos foi realizada em aparelho Shimadzu SPD-M10A, equipado com bomba LC-10AD e detector CBM-10A. As condições de análise foram: fase estacionária: coluna 25 cm Lichrosorb-RP18; fase móvel: água (solvente A) e metanol (solvente B) – gradiente de 5% de B a 100% de B em 60 min. Fluxo de 1 mL/min e temperatura ambiente de 25 °C.

CG/EM

Análise de cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas foi realizada em aparelho Shimadzu GC-17A com interface GCMS-QP5000. As condições de análise foram: coluna DB-1 de 30 m de comprimento por 0,25 mm de diâmetro e 0,8 µm de filme; hélio foi utilizado como gás de arraste com fluxo de 1,0 mL/min; programação: de 50 °C a 270 °C a 5 °C/min; injetor e interface a 280 °C. O espectrômetro de massas operou com ionização por impacto eletrônico de 70 eV e varredura de 50 a 700 u. A base de dados usada para comparação de espectros de massas foi a Nist (“National Institute of Standards and Technology”) de 1990, com 60.000 espectros.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das três partições (hexânica, clorofórmica e em acetato de etila) obtidas a partir do extrato etanólico de *Myroxylon balsamum*, somente a fração hexânica com uma concentração letal média CL_{50} de

13 ppm foi considerada ativa contra larvas de *Aedes aegypti*. O fracionamento, guiado por bioensaio desta fração utilizando sucessivas cromatografias preparativas em camada fina de gel de sílica (Esquema 1), produziu 16 frações, sendo MB-1, MB-4 e MB-10 tóxicas para as larvas, as quais apresentaram respectivamente CL_{50} de 10,0, 4,0 e 6,0 ppm (Tabela 1). A fração MB-8, embora não tóxica, mas cromatograficamente pura, foi identificada por RMN¹H como o isoflavonóide cabreuva (marcador químico da espécie), como demonstram os deslocamentos químicos abaixo, os quais são compatíveis com a literatura¹⁰: H-2 = 7,95 ppm (s), H-5 = 8,22 ppm (d, J = 9 Hz), H-8 = 6,70 ppm (d, J = 2,3 Hz), H-6 = 6,98 ppm (dd, J = 8,2 e 2,3 Hz), H-6' = 7,04 ppm (dd, J = 8,3 Hz e 2,0 Hz), H-5' = 6,92 ppm (d, J = 8,3 Hz), 3 OCH₃ = 3,90, 3,92 e 3,93 ppm (s). Seu tempo de retenção em análise CLAE foi de 20,40 min.

Tabela 1. Susceptibilidade de larvas de terceiro estágio de *Aedes aegypti* a frações ativas de *Myroxylon balsamum*

Frações	CL_{50} (95%lc) ¹ (ppm)	CL_{99} (95%lc) ¹ (ppm)
Partição Hexânica	13,0 (12,0 – 14,0)	34,0 (29,0 – 42,0)
MB-1	10,0 (8,0 – 14,3)	125,7 (50,2 – 1706,4)
MB-4	4,0 (3,1 – 5,0)	51,9 (26,3 – 223,5)
MB-10	6,0 (5,1 – 6,7)	25,0 (17,3 – 51,0)
<i>E</i> -nerolidol	17,0 (15,2 – 19,0)	49,7 (37,3 – 84,8)

¹lc - limite de confiança

Da fração MB-10 foi obtida a substância ativa (MB-14, Esquema 1), o sesquiterpeno *E*-nerolidol. Esta substância foi identificada por CG/EM (o espectro de massas foi comparado com os da biblioteca Nist) e por eluição simultânea com amostra autêntica (Tr = 19 min). No ensaio em larvas de *A. aegypti*, ela mostrou uma CL_{50} de 17 ppm. Em trabalho anterior, Chantraine *et al.*¹² relataram atividade larvicida para o *E*-nerolidol em *A. aegypti*, embora o valor da sua CL_{50} (9,0 ppm), quando comparado aos nossos resultados (CL_{50} = 17,0 ppm), sugira uma colônia de mosquitos mais susceptível. Pela análise da Tabela 1 verifica-se que as frações originadoras de nerolidol (MB-1, MB-4 e MB-10) mostraram-se mais ativas que a substância pura isolada. Isto pode ocorrer, pois terpenos são substâncias que aumentam a absorção transmembrana tanto de drogas lipofílicas quanto de drogas hidrofílicas¹³. Sendo assim, é possível que outros constituintes das frações estejam atuando como sinergistas, potencializando a atividade do nerolidol. A fração MB-10, por exemplo, com uma CL_{50} de 6,0 ppm, portanto mais ativa, contém outras substâncias (MB-12 a MB-16) que poderiam estar aumentando a absorção do nerolidol.

Com o objetivo de comparar a atividade larvicida do sesquiterpeno *E*-nerolidol com outros constituintes originados de óleos essenciais, ensaiamos alguns terpenos e fenilpropanóides obtidos comercialmente (Figura 1). A Tabela 2 mostra os resultados obtidos. O sesquiterpeno farnesol, uma forma isomérica do nerolidol, mostrou atividade larvicida com uma CL_{50} de 13 ppm. Entretanto, o monoterpeno geraniol, precursor biossintético do farnesol, mostrou-se menos ativo (CL_{50} = 81,6 ppm). Estes resultados sugerem que a maior lipofilicidade dos sesquiterpenos testados, quando comparados aos monoterpenos, é uma propriedade importante para a atividade larvicida. Os fenilpropanóides safrol, eugenol e aldeído cinâmico foram ativos com CL_{50} de 49,0; 44,5 e 24,4 ppm, respectivamente.

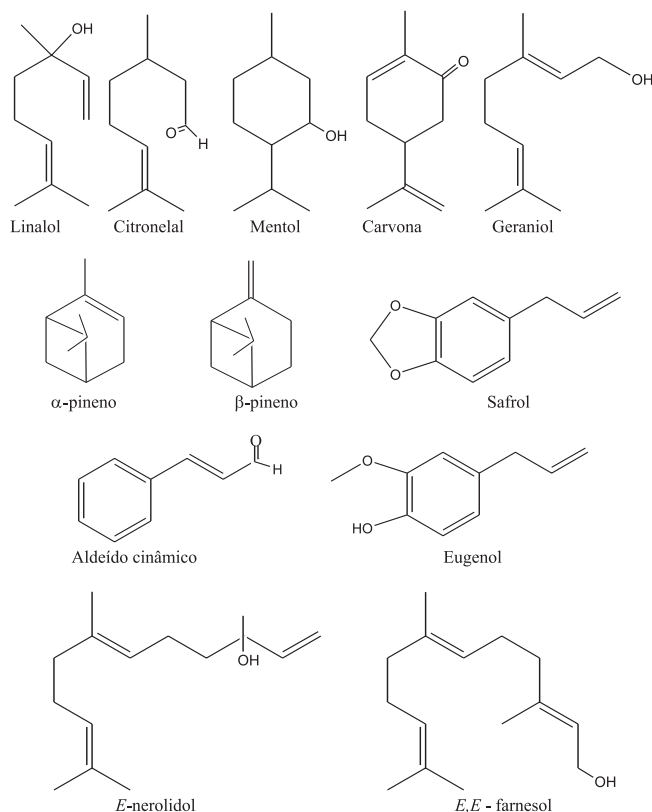


Figura 1. Monoterpenos, fenilpropanóides e sesquiterpenos ensaiados sobre larvas de terceiro estágio de *A. aegypti*

Tabela 2. Susceptibilidade de larvas de terceiro estágio de *A. aegypti* a monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanóides

Substâncias	Classe Química	CL_{50} (95% lc) ¹ (ppm)	CL_{99} (95% lc) ¹ (ppm)
Farnesol	Sesquiterpeno	13,0 (12,0 – 14,1)	32,5 (25,5 – 52,5)
Nerolidol	Sesquiterpeno	17,0 (15,2 – 19,0)	50,0 (37,3 – 84,8)
Aldeído cinâmico	Fenilpropanóide	24,4 (22,4 – 26,5)	54,7 (45,1 – 76,8)
β -pineno	Monoterpeno	42,5 (36,1 – 48,2)	145,4 (100,6 – 367,0)
Carvona	Monoterpeno	43,8 (39,0 – 48,3)	131,5 (101,5 – 214,0)
Eugenol	Fenilpropanóide	44,5 (40,8 – 48,0)	100,0 (83,0 – 139,0)
Safrol	Fenilpropanóide	49,0 (47,5 – 50,2)	63,8 (59,7 – 73,2)
α -pineno	Monoterpeno	74,3 (68,7 – 81,7)	168,1 (133,0 – 268,0)
Geraniol	Monoterpeno	81,6 (77,5 – 86,7)	122,0 (111,6 – 139,0)
Mentol	Monoterpeno	>100,0	(—) ²
Citronelal	Monoterpeno	>100,0	(—) ²
Linalool	Monoterpeno	>100,0	(—) ²

¹lc - limite de confiança; ² não determinado

Existem relatos na literatura sobre atividade inseticida de fenilpropanóides. O aldeído cinâmico e o eugenol isolados de folhas de *Cinnamomum osmophloeum* mostraram, por exemplo, uma forte atividade contra cupins (*Coptotermes formosanus*)¹⁴. Investigações recentes em vários países confirmam que alguns óleos essenciais vegetais não somente repelem insetos, mas também apresentam ação inseticida contra insetos pestes específicos¹⁵. Sabe-se que substâncias voláteis vegetais atuam como atrativos de insetos¹⁶, podendo agir como inseticidas. Deste modo, muitos terpenos têm recebido atenção especial por parte de pesquisadores¹⁷. Outros terpenos e fenilpropanóides, como eugenol, cineol e citronelal repelem o mosquito *A. aegypti*¹⁸.

Nossos resultados indicam claramente que algumas características estruturais foram importantes para a atividade biológica. A ligação dupla exocíclica no β -pineno ($CL_{50} = 42,5$ ppm) parece ser mais importante que a ligação dupla endocíclica do α -pineno ($CL_{50} = 74,3$ ppm); a presença de uma carbonila com insaturação nos carbonos α e β em um esqueleto cicloexânico parece ser importante para a atividade biológica, visto que a carvona contendo tal estrutura foi ativa ($CL_{50} = 43,8$ ppm), enquanto o mentol ($CL_{50} > 100$ ppm) foi inativo; a presença de um anel benzênico conjugado a uma carbonila com insaturação nos carbonos α e β no aldeído cinâmico ($CL_{50} = 24,4$ ppm), torna-o mais ativo que aquele não conjugado do safrol ($CL_{50} = 49$ ppm) e do eugenol ($CL_{50} = 44,5$ ppm). O grupo aldeído isolado não é importante para a atividade, visto que o citronelal mostrou-se inativo. É provável que o sistema aromático menos nucleofílico do aldeído cinâmico contribua mais para a atividade larvicida, que aquele mais nucleofílico, devido aos grupos doadores de elétrons benzodioxola, hidroxila e metoxila do safrol e eugenol, respectivamente.

CONCLUSÕES

O sesquiterpeno *E*-nerolidol é a substância larvicida de *Myroxylon balsamum*, como pode ser demonstrado no processo de biofracionamento utilizado. Entretanto, esta substância foi menos ativa ($CL_{99} = 49,7$ ppm) que a fração hexânica geradora ($CL_{99} = 34,0$ ppm). Do ponto de vista comercial esta informação é importante, pois a viabilidade econômica para a obtenção de um extrato é muito maior quando comparada a uma substância pura.

Embora existam muitos relatos na literatura mostrando a atividade inseticida de óleos essenciais, poucos discutem a relação estrutura x atividade biológica de seus constituintes. Neste trabalho ficou evidente a importância da lipofilicidade de terpenos para a atividade larvicida em *Aedes aegypti*, quando se compararam monoterpenos e sesquiterpenos de estruturas correlatas. Também foi observada a menor atividade de fenilpropanóides contendo núcleos benzênicos

que possuem substituintes nucleofílicos, como hidroxila, metoxila e benzodioxola. Plantas brasileiras ricas em óleos essenciais contendo sesquiterpenos abundantes como nerolidol e farnesol, monoterpenos como α e β -pineno, carvona e geraniol e fenilpropanóides como safrol, eugenol e aldeído cinâmico são alternativas interessantes para o controle de larvas de *A. aegypti*.

O estudo realizado mostra a viabilidade do uso da cromatografia preparativa em camada fina de gel de sílica em fracionamentos guiados por bioensaios, pois permite a seleção rápida de frações ativas e um maior direcionamento na purificação das mesmas.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), à Organização Mundial de Saúde (OMS) e à Fundação Universitária José Bonifácio (FUJB) pelas bolsas de estudo e pelos auxílios financeiros.

REFERÊNCIAS

1. Halstead, S.B. Em *Dengue and dengue hemorrhagic fever*; Gubler, D. J.; Kuno, G., eds.; CAB International: New York, 1997, p. 23-44.
2. Hemingway, J.; Ranson, H.; *Annu. Rev. Entomol.* **2000**, *45*, 371.
3. Grayer, R. J.; Kokubun, T.; *Phytochemistry* **2001**, *56*, 253.
4. Pichersky, E.; Gershenzon, J.; *Curr. Opin. Plant Biol.* **2002**, *5*, 237.
5. Baldwin, I. T.; Halitschke, R.; Kessler, A.; Schittko, U.; *Curr. Opin. Plant Biol.* **2001**, *4*, 351.
6. Kainulainen, P.; Tarhanen, J.; Tiilikkala, K.; Holopainen, J. K.; *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 3780.
7. Kelsey, R. G.; Reynolds, G. W.; Rodríguez, E. Em *Biology and Chemistry of plant trichomes*; Rodríguez, E.; Healey, P. L.; Mehta, I., eds.; Plenum Press: New York, 1984.
8. Franzios, G.; Mirotsoy, M.; Hatzia Apostolou, E.; Kral, J.; Scouras, Z. G.; Mavragani-Tsipidou, P.; *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 2690.
9. De Abreu Matos, F. J.; *Farmácias vivas*, 2ª ed., UFC: Fortaleza, 1994.
10. De Oliveira A. B.; Iracema, M.; Madruga, L. M.; Gottlieb, O. R.; *Phytochemistry* **1978**, *17*, 593.
11. World Health Organization; *World Health Organization Technical Reports Series* n°443, 1970.
12. Chantraine, J. M.; Laurent, D.; Ballibian, C.; Saavedra, G.; Ibañez, R.; Vilaseca, L. A.; *Phytother. Res.* **1998**, *12*, 350.
13. El-Kattan, A. F.; Asbill, C. S.; Kim, N.; Michniak, B. B.; *Int. J. Pharm.* **2001**, *215*, 229.
14. Chang, S. T.; Cheng, S. S.; *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 1389.
15. Isman, M. B.; *Crop Prot.* **2000**, *19*, 603.
16. Metcalf, R. L.; *Crit. Rev. Plant. Sci.* **1987**, *5*, 251.
17. Alcaraz, M. J.; Rios, J. L. Em *Ecological Chemistry and Biochemistry of Plants*; Harborne, J.; Tomas-Barberan, F. A., ed.; Clarendon Press: Oxford, U.K., 1991, p. 230-263.
18. Coats, J. R.; Karr, L. L.; Drewes, C. D. Em *Naturally Occurring Pest Bioregulators*; Hedin, P. A., ed.; ACS Symposium Series 449; American Chemical Society: Washington, DC, 1991, p. 306-316.