

Novas atividades biológicas em antigos metabólitos: ácido oleanólico e eugenol de *Eugenia caryophyllata*

A. Kelecom*; M. A. Rocha; E. C. Majdalani; M. S. Gonzalez; C. B. Mello

Universidade Federal Fluminense, Departamento de Biologia Geral, CP 100.436, 24001-970, Niterói, RJ, Brasil
egbakel@vm.uff.br

Resumo

Ácido oleanólico apresenta no barbeiro *Rhodnius prolixus*, vetor da doença de Chagas, toxicidade dose-dependente e drástica inibição da muda nas doses de 1, 10 e 100 mg/ml. Eugenol induz uma letargia que persiste por vários dias, apresenta forte fagorrepelência, toxicidade média e inibição total da muda nas doses de 10 e 100 mg/ml.

Ácido oleanólico e eugenol são os dois principais metabólitos secundários de *Eugenia caryophyllata*, o popular cravo da Índia. Estas substâncias foram também encontradas em diversas outras fontes vegetais, justificando o interesse limitado que despertam em geral para os fitoquímicos. Possuem, no entanto, importantes atividades biológicas.

Ácido oleanólico inibe as lipases, glicerol fosfato-desidrogenases, DNA-ligases e kinases AMP-c dependentes; tem atividade anticolesterolêmica, anti-hepatotóxica, antioxidante, antiinflamatória, antifúngica, antibiótica e inibe o crescimento de tumores e de patógenos orais. Ácido oleanólico antagoniza ainda a ação da interleucina 8/CINC, age contra a psoríase, protege a pele da ação da luz, reverte a resistência da leucemia P388 à vinblastina, tem efeito antagonista em choques anafiláticos e finalmente inibe a dimerização da protease do HIV-1¹. Eugenol, por sua vez, é amplamente utilizado em perfumaria, como aromatizante de alimentos e cigarros e como anestésico em tratamentos odontológicos^{2,3}. Possui também atividades antioxidante⁴, hepatoprotetora⁴ e antinefrotóxica⁵, além de inibir a glutatona S-transferase⁶.

Existe, no entanto, pouca informação quanto a eventuais atividades biológicas destes metabólitos em insetos. Sabe-se apenas que eugenol é tóxico para insetos fitófagos⁷, além de ser capaz de atrair adultos do coleóptero, *Phyllophaga anxia*⁸.

Dentro do quadro do nosso programa de busca de novas atividades biológicas em metabólitos secundários bem conhecidos^{9,10} relatamos em trabalho anterior a atividade inibidora da transcriptase reversa do vírus HIV-1, para ácido oleanólico na concentração de 100 mg¹¹. Neste estudo preliminar, ensaiamos ácido oleanólico e eugenol, ambos isolados do cravo da Índia, *E. caryophyllata*, no inseto hematófago *Rhodnius prolixus*, um dos vetores da doença de Chagas, com o intuito

de detectar atividades fagorrepelente ou fagoinibidora, de avaliar a toxicidade aguda dos metabólitos ensaiados e, principalmente, de observar atividade antiecdise, visando o controle do barbeiro *R. prolixus* sem causar maior impacto ambiental.

Observou-se que ácido oleanólico apresenta em *R. prolixus* toxicidade dose-dependente nas doses de 1, 10 e 100 mg/ml (Figura 1) e drástica inibição da muda, nas mesmas concentrações (Figura 2). A mortalidade atinge 90% após 4 semanas, na dose mais alta. Já nas concentrações de 1 e 10 mg/ml, a toxicidade cai para aproximadamente 40%. A atividade antiecdise é de 100% nas doses de 10 e 100 mg/ml e continua muito alta na menor concentração.

Eugenol, nas concentrações de 10 e 100 mg/ml, induz no barbeiro uma letargia que persiste por vários dias, apresenta forte fagorrepelência (~90% em 10 e 100 mg/ml) (Figura 3), toxicidade média (~30% de mortes) (Figura 4) e inibição total da muda, talvez em função do repasto incompleto (Figura 5). Nenhuma atividade foi observada na concentração de 1 mg/ml. Tais atividades são surpreendentemente altas e estão sendo objeto de estudos mais aprofundados visando determinar se estas substâncias podem, ou não, se mostrar úteis no controle do barbeiro.

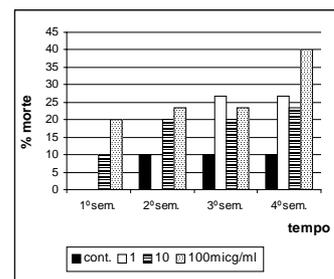


Figura 1. Toxicidade do ácido oleanólico em *R. prolixus*.

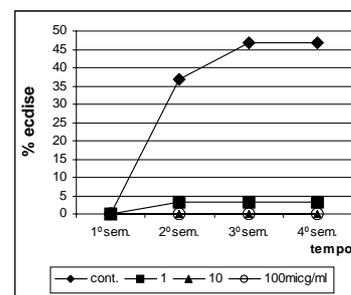


Figura 2. Antiecdise do ácido oleanólico em *R. prolixus*.

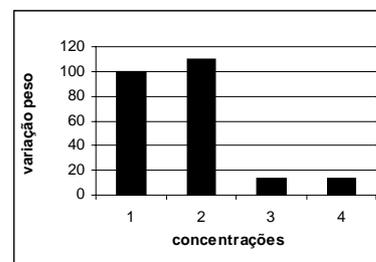


Figura 3. Fagorrepelência do eugenol em *R. prolixus*. 1: controle, 2: 1 mg/ml, 3: 10 mg/ml e 4: 100 mg/ml.

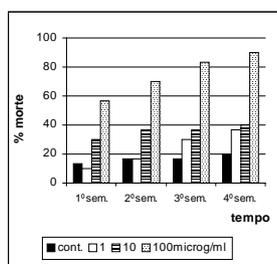


Figura 4. Toxicidade do eugenol em *R. prolixus*.

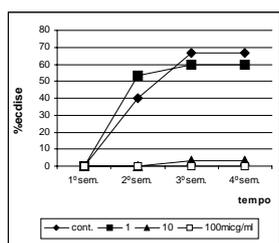


Figura 5. Antiecdise do eugenol em *R. prolixus*.

Material e Métodos

Extração do cravo da Índia: Cinquenta gramas de cravo da Índia (*Eugenia caryophyllata*), foram extraídos com CHCl_3 -MeOH (1:1), a temperatura ambiente durante uma noite. Filtração e evaporação sob vácuo parcial forneceram um extrato bruto que apresentou em cromatografia em camada delgada (CCD) dois metabólitos principais: ácido oleanólico e eugenol. Partição do extrato bruto entre hexano e metanol aquoso 10% forneceu uma fase polar contendo essencialmente ácido oleanólico contaminado por traços de outros terpenos. Duas cristalizações sucessivas a partir de metanol-diclorometano produziram ácido oleanólico puro (CCD, IV, RMN- ^1H e RMN- ^{13}C). A fase hexânica, quanto a ela, contém eugenol impuros. Extração seletiva com metanol alcalino (2% Na_2CO_3) forneceu eugenol em alto grau de pureza (CCD, IV, UV e RMN- ^1H).

Ensaio biológicos em *Rhodnius prolixus*: Larvas de quarto estágio de *Rhodnius prolixus*, em lotes de 25-30 animais, foram mantidas em jejum por um período de 25-30 dias. Foram então alimentadas com sangue humano, usando um equipamento com membrana de látex¹². Uma única alimentação das larvas leva à ecdise que inicia, nos animais controle, 12 dias após a pastagem e é completa após 16 dias. As substâncias estudadas, dissolvidas em EtOH-salina (1:4), foram adicionadas ao sangue de maneira a obter concentrações finais de 1, 10 ou 100 mg/ml. Os insetos foram pesados imediatamente antes e depois da pastagem, para determinar a quantidade de sangue ingerida e detectar uma eventual fago-inibição. Usaram-se apenas os animais devidamente alimentados. Os lotes de animais controle receberam sangue adicionado apenas de EtOH-salina. Os insetos, mantidos a 28 °C durante todo o experimento, foram observados a cada dois dias durante um mês. Anota-se o número de mortes (toxicidade) e o percentual de muda (antiecdise).

Agradecimentos

A. Kelecom, C. B. Mello e M. S. Gonzalez agradecem o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelas bolsas de produtividade em pesquisa. Esta pesquisa teve apoio do CNPq, PADCT, FAPERJ e do programa Bolsa de Trabalho da UFF.

Referências

- Liu J. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. *Journal of Ethnopharmacology*. 1995; 49: 57-68
- Ohkubo T, Shibata M. The selective capsaicin antagonist capsazepine abolishes the antinociceptive action of eugenol and guaiacol. *Journal of Dental Research* 1997; 76: 848-851
- Krishnaswamy K, Raghuramulu N. Bioactive phytochemicals with emphasis on dietary practices. *Indian Journal of Medical Research*. 1998; 108: 167-181
- Hong SK, Anestis DK, Brown PI, Rankin GO. Effect of glucuronidation substrates/inhibitors on N-(3,5-dichlorophenyl) succinimide nephrotoxicity in Fisher 344 rats. *Toxicology*. 1999; 132: 43-55
- Ahmed M, Amin S, Islam M, Takahashi M, Okuyama E, Hossain CF. Analgesic principle from *Abutilon indicum*. *Pharmazie* 2000; 55: 314-316
- Van Bladeren PJ. Influence of non-nutrient plant components on biotransformation enzymes. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 1997; 51: 324-327
- Park IK, Lee HS, Lee SG, Park JD, Ahn YJ. Insecticidal activities of *Cinnamomum cassia* bark-derived materials against *Mechoris ursulus* (Coleoptera: Attelabidae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2000; 48: 2528-2531
- Poprawski TJ, Yule WN. Field assays to determine attractancy of natural and synthetic lures to *Phyllophaga anxia* (Leconte)(Col. Scarabaeidae). *Journal of Applied Entomology*. 1992; 114: 305-314
- Cabral MMO, Kelecom A, Garcia ES. Effects of the lignan, pinosresinol on the moulting cycle of the blood-sucking bug, *Rhodnius prolixus*, and of the milkweed bug, *Oncopeltus fasciatus*. *Fitoterapia* 1999; 70: 561-567 e referências citadas neste trabalho
- Majdalani EC, Gonzalez MS, Mello CB, Kelecom A. Atividades biológicas de metabólitos secundários no barbeiro *Rhodnius prolixus*, vetor da doença de Chagas. XXI Reunião Anual sobre Evolução, Sistemática e Ecologia Micromoleculares. São Carlos, SP. 1999; 111
- Pereira HS, Kelecom A, Oliveira AF, Maciel A, Ferraz NV, Moussatché N & Frugulhetti ICPP. Evaluation of the effect of benzophenones on HIV-1 reverse transcriptase. *Virus: Reviews & Research*. 1998 (Supplement 1); 3: 84
- Garcia ES, Rembold H. Effects of azadirachtin on ecdysis of *Rhodnius prolixus*. *Insect Physiology* 1984; 30: 939-941