

ESTUDO DA RELAÇÃO DA ESTRUTURA QUÍMICA DE FENILPROPANÓIDES LIMONÓIDES E FLAVONÓIDES E A ATIVIDADE LARVICIDA CONTRA VETORES DE DOENÇAS TROPICAIS

Autores: Dulcimar Silva QUADROS⁽¹⁾; Wanderli Pedro TADEI⁽²⁾; Sergio Massayoshi NONUMURA⁽³⁾.
1 (Bolsista PIBIC/CNPq); 2 (Orientador INPA); 3 (Co-Orientador INPA/CPCR).

1. Introdução

As doenças tropicais como a malária, a encefalite, a febre amarela e o dengue são considerados como um dos principais problemas de saúde das regiões tropicais do planeta (EL HAG *et al.* 2001). São infecções transmitidas por insetos vetores da família Culicidae, como por exemplo, o *Aedes aegypti* (LINNAEUS, 1762), que encontrou no mundo moderno condições favoráveis à sua rápida propagação (GUZMAN *et al.*, 1996; TAUIL, 2000). O controle de dessas doenças é feito através da eliminação dos criadouros potenciais dos mosquitos vetores aplicação de larvicidas em depósitos de água e uso de inseticidas para as formas adultas durante os períodos de transmissão (TAUIL 2001). OS inseticidas comumente usados são os organofosforados e piretróides, porém o uso contínuo destes inseticidas vem causando o aparecimento de populações resistentes a esses produtos e provocando danos ambientais por seu uso intensivo (POLANCZYK *et al.*, 2003; LUNA *et al.* , 2004). Neste contexto os inseticidas de origem vegetal apresentam-se como uma opção econômica e ecologicamente viável. Do metabolismo secundário das plantas resultam substâncias de baixo peso molecular, às vezes produzidas em pequenas quantidades, como alcalóides, terpenóides e derivados de fenilpropanóides. Tais estruturas funcionariam como agentes defensivos na luta contra predadores, a exemplo de microorganismos patogênicos. Os fenilpropanóides e, especialmente, os terpenóides são os principais constituintes que estão envolvidos nas interações planta-inseto (ALVES, 2001). Neste trabalho, descrevemos o processo de purificação de padrões obtidos comercial e substâncias isoladas pelo grupo de pesquisa, por métodos cromatográficos. Descrevemos também o potencial dessas substâncias em ensaios de atividade biológica larvicida (larvas de *Ae. Aegypti*), protocolado pela Organização Mundial de Saúde para determinar a atividade contra o mosquito transmissor da dengue, em seu estágio larval e *Culex quinquefasciatus*, vetor da filariose. Os ensaios de atividade larvicida foram realizados com larvas em seu 3º estágio, em triplicata, com grupos de 10 larvas. A atividade foi determinada pela percentagem de mortalidade observada após 24 horas de incubação. Foi utilizado como controle positivo o Temefós e negativo o DMSO, onde as amostras foram preparadas. A Cl_{50} foi estabelecida para cada padrão analisados sendo realizados os ensaios em diferentes concentrações, com o objetivo de identificar a existência de uma relação entre estrutura química dos compostos testados e a atividade biológica (larvicida). Esse projeto avaliou a atividade larvicida de limonóides flavonóides e fenilpropanóides de estruturas químicas semelhantes com a presença de um anel benzênico com diferentes graus de oxigenação. Das substâncias testadas até o momento, a substância com maior padrão de oxigenação no anel aromático, foi aquela que apresentou a maior atividade larvicida. O dilapiol é um dos poucos fenilpropanóides naturais que apresentam esse padrão de oxigenação na natureza. Portanto, essa substância, que pode ser facilmente isolada de uma espécie que ocorre no Amazonas, a *Piper aduncum*, é um importante reagente na produção de novos inseticidas sintéticos.

2. Material e Métodos

Os padrões obtidos comercialmente de fenilpropanóides e as substâncias isoladas de produtos naturais (Dilapiol, Elimicina e Miristicina), foram analisados em CCD e por cromatografia em fase gasosa. A análise de cromatografia gasosa foi realizada em aparelho Hewlett-Packard, modelo HP 6890, equipado com sistema "dual-column", com duas colunas, uma apolar (HP-5 de 30 m de comprimento, 0,320 mm de diâmetro interno e filme de 0,25 μ m) e outra polar (Innowax de 30 m de comprimento, 0,320 de diâmetro interno e filme de 0,25 μ m) e dois detectores do tipo FID. Injetor programado a 250° C e detectores a 260° C, com gás de arraste Hidrogênio. O forno programado para operar em temperatura inicial de 60°C com rampa linear de 3°C/min até atingir a

temperatura de 240°C. As amostras foram preparadas em hexano com grau para HPLC, na concentração de 1mg/mL, o tempo de análise de 60/min com volume de injeção de 1 µL.

O dilapiol, a elemicina e a miristicina foram isolados utilizando um processo de hidrodestilação em aparelhagem de Clevenger, com um tempo de extração de 4 horas, respectivamente a partir da folhas de *Piper aduncum* coletas na região de Manaus e da semente da noz moscada (*Myristica fragrans*) obtidas no comércio local. O processo de purificação das amostras foi realizado por meio de fracionamento cromatográfico, em sílica gel flash (40-200µm), utilizando como fase móvel hexano/AcoEt (9:1). Exceto o safrol e o metilchavicol, que sofreram modificações na concentração de seus gradientes durante o fracionamento, sendo necessárias proporções crescentes de polaridades da fase móvel utilizada.

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

3. Resultados e discussão

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

Tabela 1. Massa das frações obtidas na coluna cromatográfica.

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

A identificação de cada um dos padrões purificados foi realizada com base na análise dos índices de retenção (KI - *Kovat index*) das amostras e comparada com a literatura.

Os índices de Kovat são obtidos, a partir da conversão dos tempos de retenção das amostras analisadas, em índices de retenção, relativos a uma série homóloga de alcanos analisados nas mesmas condições de análise. Os dados são apresentados na tabela 2.

Tabela 2: Índice de Retenção dos Padrões (Fenilpropanóides)

Substancias	KI (literatura Adamas.1995)	KIc (calculado da analise em CG, laboratório).
Dilapiol	1622	1623
Elemicina	1554	1505
Eugenol	1356	1357
Metileugenol	1401	1405
Metil isoeugenol	1495	1497
Metilchavicol	1195	1197
Myristicina	1520	1519
Safrol	1285	1283

Os ensaios de atividade larvicida foram realizados com larvas de *Ae. aegypti* em seu 3º estágio, em triplicata, com grupos de 10 larvas. A atividade foi determinada pela percentagem de mortalidade observada após 24 horas de incubação. Foi utilizado como controle positivo o temefós e negativo o DMSO, onde as amostras foram preparadas. A CI_{50} foi estabelecida pelo método descrito por para cada padrão analisado conforme os valores (Figura 1).

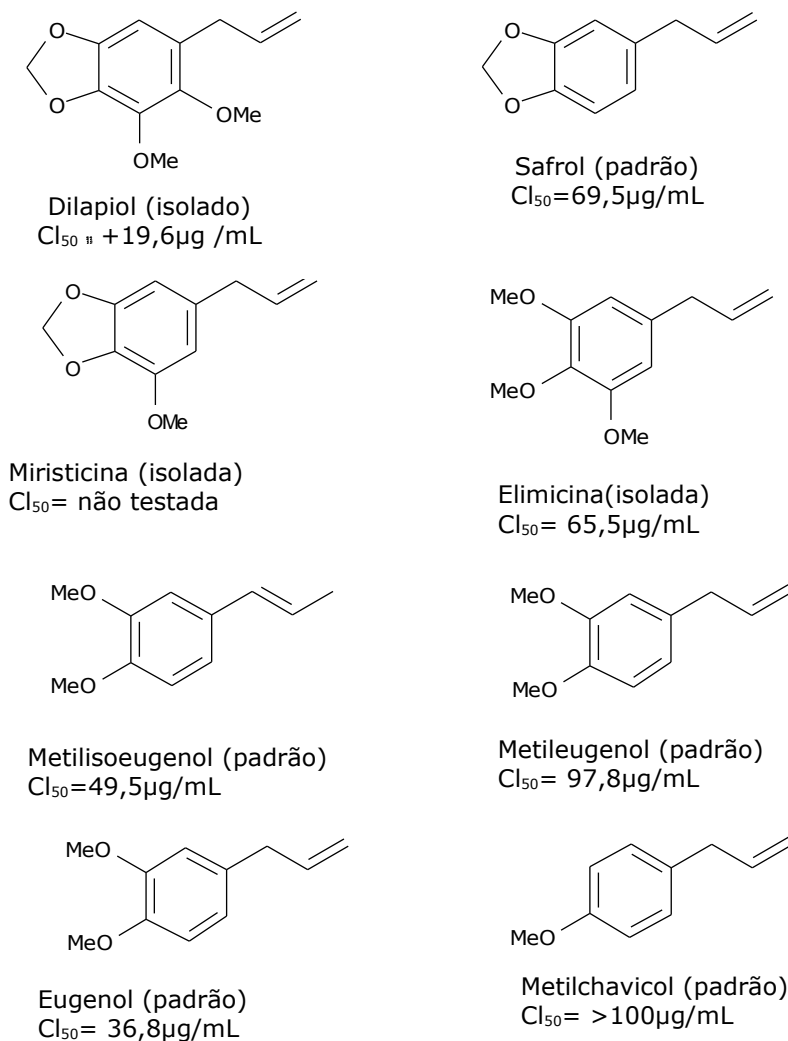


Figura 1. Estrutura de Fenilpropanóides testados em larvas de *Ae. aegypti* e *Culex quinquefasciatus*

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

3. Conclusão

Esse projeto avaliou a atividade larvicida de fenilpropanóides de estruturas químicas semelhantes com a presença de um anel benzênico com diferentes graus de oxigenação. Das substâncias testadas até o momento, a substância com maior padrão de oxigenação no anel aromático, foi aquela que apresentou a maior atividade larvicida. O dilapiol é um dos poucos fenilpropanóides naturais que apresentam esse padrão de oxigenação na natureza. Portanto, essa substância, que pode ser facilmente isolada de uma espécie que ocorre no Amazonas, a *Piper aduncum*, é um importante reagente na produção de novos inseticidas sintéticos. Bem como atividade de flavonoide e limonoides que não atividade com exceção dos apresentados pela fração 1-PPTO-15, que apresentou uma mortalidade de 100% na concentração teste de 100 μg/mL, sendo submetida a ensaios em concentrações diferente obtendo uma Cl₅₀ de 22,5 μg/mL. A atividade larvicida da amostra possivelmente esteja relacionada à presença de limonóides em sua composição, pois a amostra é uma mistura que devera passar por processos de purificação, e submetida ao Centro de Biotecnologia da Amazônia (CBA), para análise por métodos espectroscópicos como RMN (Ressonância Magnética Nuclear), espectrometria de massas e espectroscopia de infravermelho, onde terá sua estrutura confirmada.

4. Referências

ADMAS, R.P., Indentification of essencial oil compnents by gás chomatography: Mass Spectroscopy. Lllinois: Allured Publisching Corpoation, 1995.

ALVES, H. de M. Adiversidade química das plantas como fonte de fitofármacos. Química Nova na Escola, n. 3, maio, 2001.

GUZMAN, MG., Kouri G.1996. Advances in dengue diagnosis. Clin Diagn Lab. Immunol 3: pp. 621-627.

LUNA, J., Martins MF., Anjos, AF., Kuwabara EF., Navarro-Silva MA. Susceptibilidade de *Aedes aegypti* aos inseticidas temephos e cipermetrina, Brasil. *Rev Saúde Pública* 38: pp. 842-843.

POLANCZYK, RA., Garcia, MO., Alves SB. 2003. *Potencial de Bacillus thuringiensis Berliner no controle de Aedes aegypti*. *Rev. Saúde Publica*, v. 37. pp. 813-816.

STASTI, L.C.D.1996. *Plantas medicinais: Arte e Ciência*. Universidade do Estado de São Paulo, São Paulo, p.147-154.

TAUIL PL. 2001. Urbanização e ecologia do dengue. *Cad Saúde Pública* 17: 99-102.