

Atividade antimicrobiana no combate as larvas do mosquito *Aedes aegypti*: Homogeneização dos óleos essenciais do linalol e eugenol

Álvaro Itaúna Schalcher Pereira,¹ Aldemir da Guia Schalcher Pereira,¹ Oswaldo Palma Lopes Sobrinho,¹ Erika de Kássia Pereira Cantanhede,¹ Laurinda Fernanda Saldanha Siqueira²

ABSTRACT (Antimicrobial activity in fighting mosquito larvae *Aedes aegypti*: Homogenization of essential oils of linalool and eugenol)

In the search for alternative chemical control against *Aedes aegypti* L., various studies are developed and encouraged in order to find new substances insecticidal plant and in this context essential oils have been shown to be very promising. Extracted from the essential oils of Lindl *Pimenta dioica* species (leaves) and *Aniba duckei* Kostermans (stems) by means of hydrodistillation using a Clevenger system and promoted its mixture of equal parts. In this study, the larvicidal effect of the mixture of essential oils extracted from leaves of *Pimenta dioica* species Lindl and branches of *Aniba duckei* Kostermans were evaluated against the mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1792). The larvicidal activity was observed based on the percentage of dead larvae, the action was assessed 24 h after treatment. The blend of essential oils had larvicidal activity with LC₅₀ of 113,95 (± 2.11) µg mL⁻¹ and the patterns of eugenol 90,86 ($\pm 0,03$) µg mL⁻¹ and linalool 305,42 ($\pm 0,03$) µg mL⁻¹. The results indicate that the mixture of essential oils evaluated, is composed of substances that together with the major components eugenol and linalool provided greater larvicidal effect against the mosquito *Aedes aegypti* L.

KEYWORDS: *Aedes aegypti*, *Aniba duckei* Kostermans, *pimenta dioica*, eugenol, linalol, larvicia lacticity

Resumen

Na busca por controle químico alternativo contra *Aedes aegypti* L., vários estudos são desenvolvidos e incentivados a fim de encontrar novas substâncias inseticidas de origem vegetal e, neste contexto os óleos essenciais têm se mostrado muito promissor. Extraiu-se a partir de óleos essenciais de espécies *Pimenta dioica* Lindl (folhas) e *Aniba duckei* Kostermans (galhos) por meio de hidrodestilação, utilizando um sistema de Clevenger e promovida a sua mistura em partes iguais. Neste estudo, o efeito larvicida da mistura de óleos essenciais, extraído, de folhas da espécie *Pimenta dioica* Lindl (folhas) e dos galhos de *Aniba duckei* Kostermans foram avaliados contra o mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1792). A atividade larvicida foi observada com base na percentagem de larvas mortas, a ação foi avaliada 24h após o tratamento. A mistura de óleos essenciais apresentaram atividade larvicida com CL50 de 113,95 (± 2.11) mg mL⁻¹ e os padrões de eugenol 90,86 ($\pm 0,03$) mg mL⁻¹ e linalol (305,42 ± 0,03) µg mL⁻¹. Os resultados indicam que a mistura de óleos essenciais avaliados, é composto de substâncias que, em conjunto com o eugenol, um dos principais componentes e linalol fornecem maior efeito larvicida contra *Aedes aegypti* L.

Palabras clave: *Aedes aegypti*, *Aniba duckei* Kostermans, *Pimenta dioica*, eugenol, linalol, atividade larvicia

Introdução

A International Organization for Standardization – ISO, define óleos essenciais como os produtos obtidos de partes de

plantas através de destilação por arraste de vapor d'água, bem como os produtos obtidos por expressão dos pericarpos de frutos cítricos (Rutaceae). De forma geral, são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas. Também podem ser chamados de óleos voláteis óleos etéreos ou essências. Tais denominações derivam de algumas de suas características físico-químicas, como, por exemplo, a de possuírem aparência oleosa e aroma agradável, serem líquidos voláteis e solúveis em solventes apolares (como o metilclorobenzeno). Em água, eles

¹ Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Maranhão (IFMA), Codó, Brasil.

² Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Maranhão (IFMA), Barreirinhas, Brasil.

Fecha de recepción: octubre 28, 2013. Fecha de aceptación: junio 30, 2014.

apresentam solubilidade limitada, mas o suficiente para aromatizar suas soluções aquosas, que, nesse caso, são denominadas hidrolatos (Teles, 2003).

O *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) é atualmente o mosquito que apresenta maior dispersão em áreas urbanas do planeta. Ele é um dos agentes (juntamente com *Aedes albopictus*) transmissores do dengue, doença considerada pela Organização Mundial de Saúde como um dos principais problemas de saúde pública no mundo (com grande incidência nas regiões tropicais do globo) (WHO, 2009).

Atualmente o controle é feito por meio de aplicações de inseticidas organofosforados (Gualtieri et al., 1997). Porém, o uso frequente e em doses cada vez maiores desses produtos, têm selecionado populações resistentes do mosquito (Carvalho e Silva, 2000).

Com o surgimento de formas resistentes do mosquito aos inseticidas convencionais utilizados, tem crescido a busca por extratos vegetais e substâncias naturais que sejam efetivas no combate ao mosquito adulto e/ou à larva de *Aedes aegypti* L. que sejam isentas de toxicidade para o ambiente. Tendo em vista os prejuízos causados pelo dengue no País, torna-se de suma importância a descoberta de novos métodos de combate ao seu vetor.

O mosquito *Aedes aegypti* L., encontrou no mundo moderno condições muito favoráveis para uma rápida expansão, pela urbanização acelerada que criou cidades com deficiências de abastecimento de água e de limpeza urbana; pela intensa utilização de materiais não-biodegradáveis, como recipientes descartáveis de plástico e vidro; e pelas mudanças climáticas. Com essas condições, espalhou-se por uma área onde vivem cerca de 3,5 bilhões de pessoas em todo o mundo (FUNASA, 2002).

Dessa forma, pelo fato de muitas plantas, por natureza, serem tóxicas para mosquitos, a mistura de óleos essenciais pode representar uma saída eficiente para esse problema, frente ao mosquito *Aedes aegypti*.

A escolha da espécie *Pimenta dioica* Lindl deveu-se pelo fato de que não foi encontrada na literatura científica referência sobre a atividade larvicida do óleo extraído das folhas desta espécie (e nem dos frutos), motivo pelo qual resolvemos testá-lo. De acordo com Guenther (1950) existem dois tipos de óleo de *Pimenta dioica* Lindl no mercado: o óleo destilado dos frutos, com fino odor e sabor, característico de pimenta e o óleo obtido das folhas. O referido autor relata que o fruto seco contém 2 a 5% de óleo essencial e a quantidade do óleo no fruto depende do período de colheita. O pó contém

eugenol (65 a 85%, componente majoritário – Figura 1), éter metil eugenol, cariofileno, felandreno, cineol, ácido palmítico, óleos fixos, resinas, açúcares, amido, ácido málico, oxalato de cálcio e taninos.

Os compostos terpênicos mais frequentes nos óleos essenciais são os monoterpenos (aproximadamente 90% dos óleos essenciais) ele se divide em três sob grupos monocíclicos, bicíclicos e acíclicos. De grande valor no mercado internacional (devido seu uso como fixador em perfumes como, por exemplo, o famoso Chanel número 5), é em grande parte o linalol ($C_{10}H_{18}O$, massa molecular 154 g/mol), composto normalmente encontrado sob a forma de uma mistura de isômeros de posição da primeira dupla ligação e opticamente ativo (Kalil Filho, 2000).

No que diz respeito a testes de atividade antibacteriana, Hammer et al., (1999) analisaram 52 óleos essenciais, dentre os quais o pau rosa, frente a dez diferentes bactérias, incluindo *Enterococcus Faecalis* e *Klebsiella Pneumoniae*. Os autores apontaram que o poder de inibição do óleo desta planta conforme todos os microrganismos testados foram eficientes, sobretudo, para esses dois gêneros.

A partir do exposto, verifica-se que a procura por larvicidas naturais para o *Aedes aegypti*, tem motivado pesquisadores do mundo inteiro a realizar diversos trabalhos e, portanto, este trabalho é uma contribuição nesse sentido (os produtos naturais com esta finalidade diminuem o impacto que atualmente os inseticidas sintéticos causam à saúde da população e ao ambiente).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o uso da mistura dos óleos essenciais das folhas da espécie *Pimenta dioica* Lindl (folhas) e *Aniba duckei* Kostermans (galhos) como agente larvícida frente ao mosquito *Aedes aegypti*.

Metodologia

O presente trabalho foi desenvolvido com a utilização de vários equipamentos e contou com a parceria dos seguintes laboratórios e instituições: Laboratório de Pesquisa em Química Analítica (LPQA), Central Analítica, Laboratório de Físico-Química e Microbiologia do Pavilhão Tecnológico da Universidade Federal do Maranhão-UFMA e da Central Analítica da Unicamp-SP.

As amostras coletadas das folhas (*Pimenta dioica* Lindl) e dos galhos (*Aniba duckei* Kostermans) foram colocadas em uma estufa de circulação de ar com a temperatura variando entre 35°C a 40°C, por um período de 7 dias. Após o período de secagem utilizou de um moinho elétrico Tenal, modelo TE-340 do pavilhão tecnológico para Trituração das folhas e dos galhos isoladamente. Após a moagem o material em pó foi armazenado em frascos de polietileno para posterior extração dos respectivos óleos essenciais.

Para extração do óleo essencial da *Pimenta dioica* Lindl e da *Aniba duckei* Kostermans, utilizou-se o Sistema Extrator de Clevenger acoplado a um balão de fundo redondo de 1000 mL e uma manta elétrica como fonte geradora de calor. A cada extração do óleo essencial, eram pesadas 30 gramas da biomassa da *Pimenta dioica* Lindl e adicionou-se 300 mL

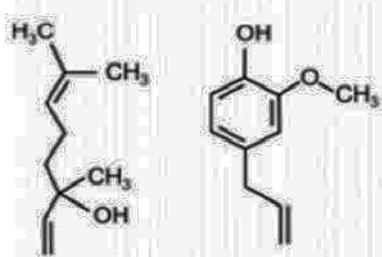


Figura 1. Fórmula estrutural do linalol e eugenol.

de água destilada, e também eram pesadas 30 gramas de galhos moídos da *Aniba duckei* Kostermans e adicionaram-se 300 mL de água destilada, ambos em balões de fundo redondo acoplado ao Sistema de Clevenger. Em seguida, ligava-se a manta elétrica e mantinha-se a temperatura de 100°C e após 3 horas e meia encerrava-se a destilação recolhendo-se os óleos essenciais. Os óleos eram secos por meio de percolação em Na₂SO₄ anidro. Essas etapas foram realizadas em triplicatas e as amostras eram armazenadas em recipientes de vidro sobre refrigeração para evitar possíveis perdas de constituintes voláteis.

Utilizou-se um espectrofotômetro UV-Vis modelo Cary50 da Hewlett-Packard. As amostras foram adicionadas em uma solução a 70% v/v de etanol/água para viabilizar a completa diluição do óleo, já que esta relação foi a que apresentou a menor proporção de etanol sem que a solução turvasse. Analisou-se o óleo essencial CG-EM no cromatógrafo à gás HP 5890, coluna HP-1 de metil silicone entre cruzada (25 m × 0,22 mm i.d.; 0,3 mm de espessura de filme), acoplado a um detector seletivo de massas HP 5970 de impacto eletrônico, com uma energia de 70 eV, temperatura de transferência de 300°C e banco de dados NBS Reve (40.000 registros). Para as análises foram injetados 1 mL da amostra diluída em clorofórmio e efetuaram-se as medidas fixando-se às seguintes condições: temperatura inicial: 60°C, final: 300°C, tempo inicial: 2 min, final: 15 min, rampa: 2°C min⁻¹, gás de arraste: He, solvente: clorofórmio.

Como os ovos do *Aedes aegypti* não são postos diretamente na água, mas sim milímetros acima de sua superfície, principalmente em recipientes artificiais, foi preparada uma armadilha simples para coleta desses ovos. Para tanto, foram utilizados jarros de plástico para planta, de aproximadamente 500 mL, semi-preenchidos com água e um pedaço de madeira de dimensões aproximadamente 20 cm × 5 cm com uma parte imersa e outra não. A fêmea do *Aedes aegypti*, deposita seus ovos na parte imediatamente superior à lâmina d'água, na parte do madeirite ainda úmida, mas fora da água do jarro.

Os ovos do *Aedes aegypti* foram imersos numa bacia plástica, de formato retangular, com cerca de 3 L de água mineral para a eclosão. Após a imersão dos ovos, 0,5 g de ração de rato foi adicionado à água para auxiliar no crescimento das larvas. Todo o material foi mantido no interior de uma gaiola de madeira e coberta com uma tela de tecido, apropriada para insetos, a fim de evitar a contaminação por ovos de outras espécies de mosquito. Após a eclosão, as larvas foram acompanhadas até que atingissem o 3º ou 4º estágio do desenvolvimento, quando então foram utilizadas nos ensaios de atividade larvicida. São necessários de quatro a cinco dias para que as larvas atinjam o tamanho ideal para os ensaios.

A análise estatística dos dados foi realizada de acordo com o método Reed-Muench, o qual parte do princípio de que, um animal que sobreviva a certa dose, também irá sobreviver em qualquer outra dose menor que aquela consequentemente o animal que morrer com certa dose, também irá morrer em doses maiores que aquela. Desse modo, os

dados de mortalidade para cada concentração testada, são construídos no gráfico onde se observa uma curva para o acúmulo de animais mortos em cada concentração e outra curva para o acúmulo de sobreviventes. O ponto de intercessão entre as curvas é a Concentração Letal 50% (CL₅₀), pois nesse ponto o número de animais sobreviventes é igual ao número de animais mortos (Colegate e Molyneux, 1993).

Resultados e discussão

Os parâmetros físico-químicos dos óleos essências das folhas de *Pimenta dioica* Lindl e dos galhos da *Aniba duckei* Kostermans e da mistura de óleos (Tabela 1), apresentaram similaridade com os padrões. Este fato era esperado uma vez que a mistura foi preparada na proporção de 1:1.

Os espectros de absorção na região da ultravioleta, para a mistura de óleos essenciais (A), para a solução etanol/água a 60% em volume (B), padrão de linalol (D) e padrão de eugenol (C) são apresentados na Figura 02.

Nessa análise espectrofotométrica, a solução de etanol/água a 60% em volume foi escolhida após um estudo sobre a solubilidade dos óleos essenciais em várias concentrações dessa solução. Na Figura 02, essas bandas podem ser atribuídas à presença de compostos alifáticos insaturados (230 nm) e a compostos aromáticos com substituição auxocrônica (280 nm) como o grupo hidroxila, sendo que ambas com transições eletrônicas, embora unidades fenilpropílicas apresentem bandas com máximo de absorção no mesmo intervalo dos comprimentos de onda observados (Ugaz, 1994; Silverstein w., 2007). No entanto, ao se comparar o espectro da mistura de óleos essenciais com os espectros dos padrões de eugenol e linalol, nota-se que os mesmos praticamente se sobrepõem, indicando que o eugenol e o linalol encontram-se presente na mistura de óleos essenciais como componentes majoritários.

A atividade larvicida da mistura de óleos essenciais extraída das folhas da espécie *Pimenta dioica* Lindl e galhos *Aniba duckei* Kostermans foi testada em cinco concentrações diferentes: 50, 70, 100, 130 e 150 µg mL⁻¹, sendo n é o número de larvas do mosquito *Aedes aegypti* utilizadas no

Tabela 1. Parâmetros físico-químicos das espécies *Pimenta dioica* Lindl e *Aniba duckei* Kostermans comparadas com a mistura de óleos essenciais.

Parâmetros Físico-químicos	Pimenta dioica Lindl ^a	Aniba duckei Kostermans ^b	Mistura de óleos essenciais ^c
Densidade (g mL ⁻¹)	0,949	0,866	0,904
Solubilidade em etanol a (70%)	1:2	1:2	1:2
Índice de refração (N _D 25°)	1,332	1,466	1,379
Cor	Amarelo	Amarelo	Amarelo
Aparência	Límpido	Límpido	Límpido
Odor	Característico	Característico	Característico

^a Monteiro (2008); ^b Teles (2003); ^c Trabalho em estudo.

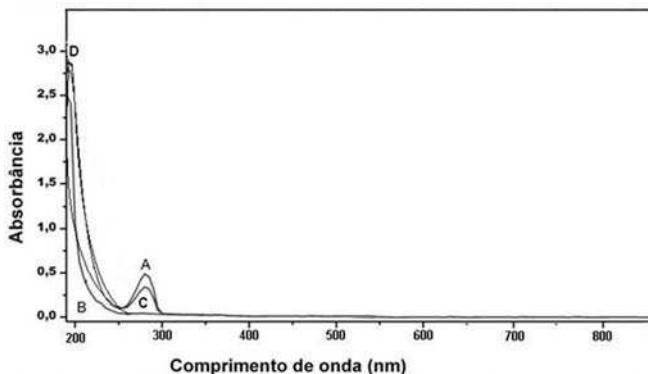


Figura 2. Espectros de absorção no UV-Vis. (A) padrão de eugenol; (B) padrão de linalol; (C) mistura de óleos essenciais; (D) solução etanol/água à 60%.

ensaio larvicida para cada concentração (totalizando 10 larvas por ensaio).

Para cada concentração os testes foram realizados em quintuplicata. Os dados sobre o número de larvas vivas e de larvas mortas foram encontrados através de uma média das cinco repetições para cada uma das cinco concentrações testadas (Tabela 2).

De acordo com a Tabela 2, a concentração de $70 \mu\text{g mL}^{-1}$ da mistura do óleo essencial da *Pimenta dioica* Lindl apresentou a menor atividade larvicida, matando, em média, 1,667 larvas, o que corresponde a 16,67% de mortalidade. Na concentração de $150 \mu\text{g mL}^{-1}$ da mistura dos óleos essenciais, a atividade larvicida atingiu a mortalidade de 100% dos indivíduos testados, ou seja, 10 larvas.

A taxa de percentagem da mortalidade das larvas frente ao óleo essencial da *Pimenta dioica* Lindl é mostrada na Figura 24, o qual se apresentou constante a partir do Log dose 2, 176 (concentração $150 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Conclusão

Dessa forma, o uso de solução da mistura dos óleos essenciais da *Pimenta dioica* Lindl e do *Aniba duckei* Kostermans além de não agredir o meio ambiente, proporciona ainda uma fonte de renda para famílias que vivem próximas as plantações dessas plantas, sem que haja destruição das árvores para obtenção do óleo essencial, como foi demonstrado neste trabalho com a extração do óleo essencial do *Aniba duckei* a partir dos galhos, diferentemente da indústria de cosméticos que as extraem do tronco dessa árvore.

Tabela 2. Mortalidade das larvas do *Aedes aegypti* após 24 horas de exposição em várias concentrações da mistura dos óleos essenciais extraída das folhas da espécie *Pimenta dioica* Lindl e galhos *Aniba duckei* Kostermans.

Dose, $\mu\text{g mL}^{-1}$	Log dose	Mortos	Vivos	Acumulados mortos	Acumulados vivos	Mortalidade, %
150	2,176	10	0	20,667	0	100
130	2,114	6,333	3,667	10,667	3,667	63,33
100	2,000	2,667	7,333	4,334	11	26,67
70	1,845	1,667	8,333	1,667	19,333	16,67
50	1,699	0	10	0	29,333	0

Número de larvas ($n = 10$).

Referências

- Carvalho, L. A. F.; Silva, I. G., Avaliação longitudinal da atividade do Temephós a 1% sobre o *Aedes aegypti* (Lin, 1762). *Entomología y vectores*, 7: 191-201, 2000.
- Colegate, S. M.; Molynieux, R. J., *Bioactive Natural Products: Detection, Isolation, and Structural Determination*. Boca Raton: CRC, 1993.
- FUNASA, Direção do Centro Nacional de Epidemiologia. Plano de intensificação das ações de prevenção e controle da Febre Amarela. Brasília, jul. 2002.
- Guenther, E., *The essential oils. Individual essential oils of the plant families Gramineae, Lauraceae, Burseraceae, Myrtaceae, Umbelliferae and Geraniaceae*. v. 4. New York: D. Van Nostrand, 1950.
- Hammer, K. A., et al., Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts, *Journal of Applied Microbiology*, 86, 985-999, 1999.
- Kalil Filho, A. N., *Conservação de gimnospermas de plantas aromáticas e medicinais da Amazônia brasileira para uso humano*. Manaus: EMBRAPA, Comunicado Técnico, n.50, 2000.
- Silverstein, R. M.; Webster, F. X.; Kiemle, D. J., Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. 7 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2007, 490 p.
- Simões, C. M. O.; Spitzer, V., Óleos voláteis. En: Simões, C. M.; et al., *Farmacognosia: da planta ao medicamento*, cap. 18, p. 467-495. 5ª ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2003.
- Simões, M.O. et al. (org.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/Ed. da UFSC, 1999.
- Teles, Rogério de Mesquita. *Estudo analítico do linalol contido no óleo essencial extraído de galho da espécie Aniba duckei kostermans e sua aplicação comoagente bactericida*. São Luís. 2003, 99f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Maranhão, São Luís/MA, 2003.
- Ugaz, O. L., *Investigación Fitoquímica: Métodos en el estudio de productos naturales* (pp. 23-42). Lima, Fondo Editorial de la Pontificia de la Universidad Católica del Perú, 1994.
- WHO, World Health Organization. *International Travel and Health*. 2009 edition. Diseases and distribution maps: Dengue. Disponível em: <http://www.who.int/ith/en>. Acessado em: 10 abr. 2009.