



## Estudo químico-biológico dos óleos essenciais de *Hyptis martiusii*, *Lippia sidoides* e *Syzigium aromaticum* frente às larvas do *Aedes aegypti*

J.G.M. Costa<sup>1\*</sup>, F.F.G. Rodrigues<sup>1</sup>, E.C. Angélico<sup>1</sup>, M.R. Silva<sup>1</sup>, M.L. Mota<sup>1</sup>, N.K.A. Santos<sup>1</sup>,  
A.L.H. Cardoso<sup>1</sup>, T.L.G. Lemos<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratório Química-Biológica, Universidade Regional do Cariri, Rua Cel. Antônio Luís, 1161, Pimenta,  
63100-000, Crato, CE, Brasil,

<sup>2</sup>Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, Campus Universitário do Pici,  
60000-000, Fortaleza, Ceará, Brasil

**RESUMO:** O interesse pelos bioensaios frente à larvas de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* deve-se ao fato de que estas espécies estão distribuídas por todo o território nacional, sendo portanto uma atividade realizada por inúmeros pesquisadores do Brasil. Os óleos essenciais de *Syzigium aromaticum* (L.) Merr. & Perry, *Lippia sidoides* Cham., e *Hyptis martiusii* Benth., foram testados no combate ao transmissor da dengue e da filariose. As larvas de terceiro estágio foram expostas em triplicatas a diferentes concentrações (1000, 500, 250, 100, 50, 25 e 10 ppm). As análises foram observadas após dez minutos do início do tratamento, e mostraram resultados bastante significativos, com potencialidade de mortalidade de até 100% das larvas testadas, indicando acentuados efeitos tóxicos de alguns constituintes voláteis presentes nos óleos. Para os óleos de *S. aromaticum*, *L. sidoides* e *H. martiusii* foram constatadas, frente à *Aedes aegypti*, valores respectivos de CL<sub>50</sub> de 21,4; 19,5 e 18,5 ppm e frente ao *Culex quinquefasciatus*, 14,5; 16,6 e 27,5 ppm, respectivamente.

**Unitermos:** *Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus*, *Hyptis martiusii*, *Lippia sidoides*, *Syzigium aromaticum*, óleos essenciais, atividade larvicida.

**ABSTRACT:** "Chemical-biological study of the essential oils of *Hyptis martiusii*, *Lippia sidoides* and *Syzigium aromaticum* against larvae of *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*." The interest for a biological assay against larvae of *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* is due to the fact that these species are distributed by the whole national territory, being therefore an activity carried out by countless researchers of Brazil. The essential oils of *Syzigium aromaticum*, *Hyptis martiusii* and *Lippia sidoides* were tested in the combat of the transmitter of the dengue and of the filariasis, using larvae of third stadium were exposed in triplicate to different concentrations (1000, 500, 250, 100, 50, 25 and 10 ppm). The larvicidal activity was observed after ten minutes of the beginning of the treatment, in the end showed very significant results, with mortality potentials of up to 100% of the tested larvae, indicating accentuated toxic effects in some representatives of the volatile compounds present in the oils. For the oils of *S. aromaticum*, *L. sidoides* and *H. martiusii* DL<sub>50</sub> of 1,0; 1,0 and 8,0 ppm, respectively, were observed.

**Keywords:** *Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus*, *Hyptis martiusii*, *Lippia sidoides*, *Syzigium aromaticum*, essential oil, larvicidal activity.

### INTRODUÇÃO

O dengue é uma doença infecciosa aguda de curta duração podendo assumir formas graves e letais que vem preocupando as autoridades médico sanitárias de todo o mundo. É transmitida pelos culicídeos do gênero *Aedes*, especificamente pela picada do mosquito fêmea infectado. *Aedes aegypti* é o principal vetor de dengue no mundo, sendo que essa espécie está amplamente

distribuída nas regiões tropicais e subtropicais. No Brasil sua existência é conhecida desde o século XVII (Halsted et al., 1997).

Nos últimos anos o número de casos registrados e de mortes vítimas da dengue aumentou, visto que o mosquito se tornou resistente aos inseticidas convencionais (Hemingway et al., 2000). Sabe-se que a maneira mais eficaz e ideal para o controle do dengue

seria a eliminação dos locais favoráveis a criação do mosquito. A maneira mais usual ao controle da doença é a aplicação de produtos, o que podem resultar na resistência do mosquito, implicando no aumento da dosagem desses produtos, causando maiores danos ao meio ambiente, gerando outras doenças e prejuízos econômicos.

Conhecido no Nordeste por muriçoca, *Culex quinquefasciatus* é um inseto que tem como *habitat* locais com acúmulo de água e detritos orgânicos, com baixos níveis de saneamento e higiene. O mosquito *Culex* é transmissor da filariose linfática ou elefantíase que é uma doença endêmica, causada por um parasita que provoca obstruções nos vasos sanguíneos provocando inchaço, sobretudo dos membros inferiores. Pode ocorrer também linforrêia (derramamento de linfa), varizes linfáticas, náuseas, febre e dor no corpo do indivíduo infectado (Pizarro et al., 1999).

É evidente a procura crescente de produtos naturais que sejam eficazes ao controle de mosquitos adultos e à exterminação das larvas do *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*, ao mesmo tempo que não causam nenhum dano ao meio ambiente. As plantas produzem substâncias para sua própria defesa em resposta a um

ataque patogênico, muitas sintetizam e emitem inúmeros compostos voláteis com a finalidade de defesa e atrair seus polinizadores. Alguns óleos essenciais obtidos de plantas são considerados fontes em potencial de substâncias biologicamente ativas (Kelsey et al., 1984).

Este trabalho relata ensaios biológicos dos óleos essenciais de *Syzigium aromaticum*, *Hyptis martiusii* e *Lippia sidoides* como agentes larvicidas frente à larvas de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*. A espécie *L. sidoides*, popularmente conhecida como alecrim-pimenta, é arbusto próprio da vegetação do Nordeste do Brasil, possui caule quebradiço e folhas aromáticas de onde se extrai um óleo essencial que apresenta forte ação antimicrobiana contra fungos e bactérias, auxilia no tratamento de acnes, odores desagradáveis (Lemos et al., 1990; Sousa et al., 1991; Simões et al., 2002; Bara; Vaneti, 1997/1998). *Syzigium aromaticum* é uma árvore originária da Índia, tendo cultivo no Brasil principalmente nos estados de São Paulo e Bahia. Seus botões florais são bastante consumidos como aromatizante e para fins culinários, e na forma de chá são utilizados por apresentarem propriedades carminativa e estimulante das funções digestivas. *H. martiusii* é um pequeno arbusto

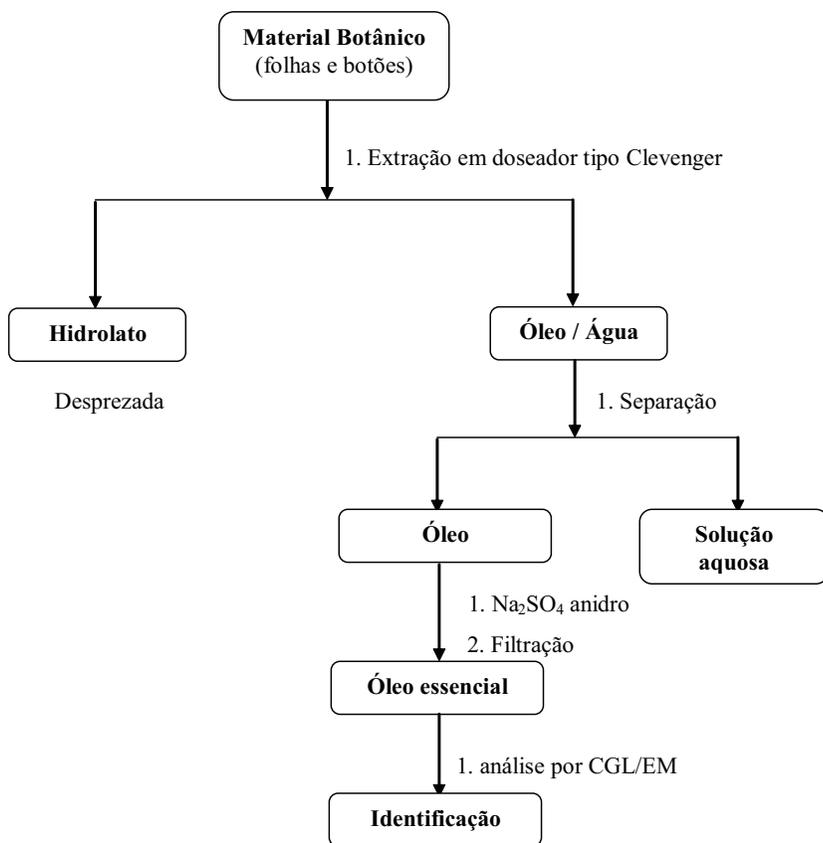


Figura 1. Método de extração do óleo essencial do material vegetal.

comum no Nordeste brasileiro, popularmente conhecida como cidreira-do-mato. Estudos anteriores relatam a composição química do óleo essencial e determinação da atividade inseticida contra o mosquito da dengue (Araújo et al., 2003). Este trabalho complementa os estudos anteriores confirmando esta atividade e relata pela primeira vez a atividade contra as larvas *Culex quinquefasciatus* agente transmissor da filariose.

## MATERIAL E MÉTODOS

O material vegetal foi obtido no município do

Crato - Ceará. As folhas de *H. martiusii* foram coletadas na Floresta Nacional do Araripe, seu registro está depositado no Herbário Caririense Dárdaro de Andrade Lima da Universidade Regional do Cariri, com número 464. As folhas de *L. sidoides* foram coletadas no Horto Florestal Municipal, estando o material botânico depositado no Herbário Prisco Bezerra do Departamento de Botânica da Universidade Federal do Ceará e está registrado sob o número 25149. Os botões floríferos de *S. aromaticum* foram adquiridos no mercado central local.

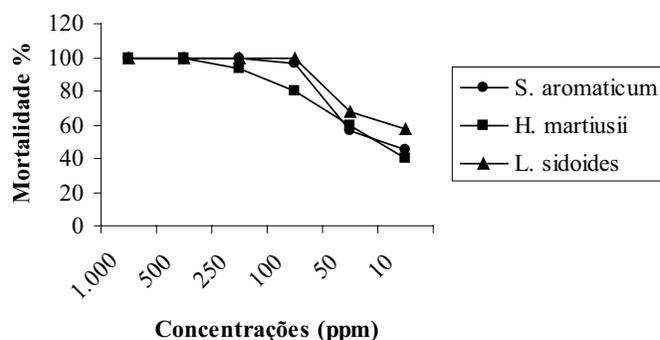
Os óleos essenciais foram extraídos utilizando-se sistema de hidrodestilação, onde 250 g das folhas frescas

**Tabela 1.** Componentes dos óleos essenciais de *Lippia sidoides*, *Hyptis martiusii* e *Syzygium aromaticum* com as referidas porcentagens.

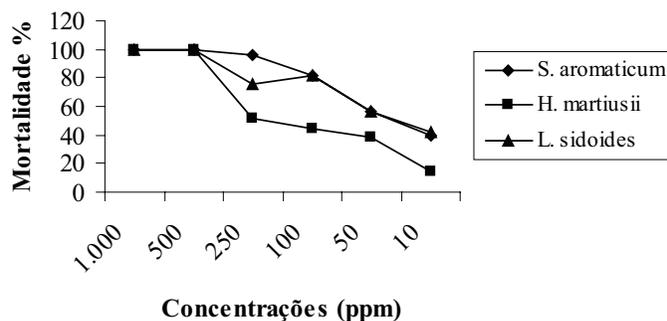
Componente	<i>L. sidoides</i>	<i>H. martiusii</i>	<i>S. aromaticum</i>
	%	%	%
δ-3-Careno	-	22,5	-
1,8-Cineol	-	24,3	-
β-Cariofileno	9,7	6,2	5,4
Biciclogermacreno	-	6,3	-
Timol	43,5	-	-
α-Felandreno	22,4	1,1	-
p-Cimeno	8,6	2,4	-
Mirceno	6,5	-	-
Cavacrol	4,3	-	-
Eugenol	-	-	80,8
Acetil-eugenol	-	-	3,7
Metil-eugenol	-	-	1,8
Óxido de cariofileno	-	3,7	0,6
Chavicol	-	-	0,5
α-Pineno	-	3,9	-
Cânfora	-	2,2	-
Aromadendreno	-	2,8	-
β-Pineno	-	1,9	-
δ-Cadineno	-	1,9	-
γ-Muuroleno	-	1,5	-
Terpinoleno	-	1,4	-
β-Mirceno	-	1,4	-
γ-Terpineno	-	1,4	-
α-Humuleno	-	1,7	-
Espatuleno	-	0,7	-
Globulol	-	0,8	-
α-Copaeno	-	0,9	-
γ-Cadineno	-	0,8	-
α-Cubebeno	-	0,5	-
o-Cimeno	-	0,6	-
Total	95,0	90,9	92,8

**Tabela 2.** Atividade larvicida dos óleos essenciais de *Hyptis martiusii*, *Syzigium aromaticum* e *Lippia sidoides* sobre larvas de terceiro estágio de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*.

Espécies vegetais	CL <sub>50</sub> (ppm) <i>A. aegypti</i>	CL <sub>50</sub> (ppm) <i>C. quinquefasciatus</i>
<i>Hyptis martiusii</i>	18,2	27,5
<i>Syzigium aromaticum</i>	21,4	14,5
<i>Lippia sidoides</i>	19,5	16,6



**Figura 2.** Índices de mortalidade de larvas de terceiro estágio de *Aedes aegypti* submetidas a diferentes concentrações dos óleos essenciais de *S. aromaticum*, *L. sidoides* e *H. martiusii*.



**Figura 3.** Índices de mortalidade de larvas de terceiro estágio de *Culex quinquefasciatus* submetidas a diferentes concentrações dos óleos essenciais de *S. aromaticum*, *L. sidoides* e *H. martiusii*.

foram colocadas em um balão de vidro de 5 L, juntamente com 1,5 L de água e mantidas em ebulição durante duas horas. No caso dos botões florais de *S. aromaticum* foram utilizados 100 g, usando o mesmo procedimento. A mistura água/óleo foi coletada em aparelho tipo Clevenger modificado (Gottlieb; Magalhães, 1960), sendo em seguida separada, seca com sulfato de sódio anidro (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e filtrada, conforme mostrado na Figura 1. Os óleos essenciais obtidos foram analisados por meio de cromatografia gás-líquido acoplado a espectrometria de massa (Colins et al., 1997; Cienfuegos; Vaitsman, 2000; Alencar et al., 1990) e a identificação das substâncias foi

realizada pela interpretação dos respectivos espectros de massa e por comparação com espectros de massa de banco de dados e com dados da literatura (Adams, 1989).

Os bioensaios foram desenvolvidos usando metodologia descrita (Oliveira et al., 2002) feitos em triplicatas e em diferentes concentrações (1000, 500, 250, 100, 50 e 10 ppm) utilizando larvas dos mosquitos *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* no terceiro estágio de vida (Hamburger; Hostettmann, 1991; McLaughlin; Anderson, 1988; Cepleanu, 1993). Os óleos essenciais foram dissolvidos em 0,4 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), este volume foi posteriormente completado

com água para 20 mL. Na mistura foram adicionadas 10 larvas, sendo contadas as larvas vivas após 24 h. Paralelamente foram feitos controles positivos utilizando o larvicida Temefôs, e em branco utilizando-se água + DMSO 2%.

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

Análises dos cromatogramas dos óleos essenciais revelaram suas composições químicas constituídas de mono e sesquiterpenóides, apresentando como principais constituintes o eugenol, o 1,8-cineol e o timol, como componentes majoritários identificados, respectivamente, nos óleos de *S. aromaticum*, *H. martiusii* e *L. sidoides* (Leal et al., 2003), conforme mostrado na Tabela 1. Muito provavelmente sejam os responsáveis pelas atividades apresentadas por esses produtos naturais, sejam sob formas isoladas ou em ação sinérgica com outros constituintes.

As amostras dos óleos essenciais de *S. aromaticum* apresentaram nas concentrações de 1.000, 500 e 250 ppm atividade larvicida após 10 minutos do tratamento e em 100 ppm após 30 minutos, ocorrendo o mesmo com as amostras do óleo de *L. sidoides*. Enquanto que para as amostras de *H. martiusii*, nas concentrações de 1.000, 500 e 250 ppm verificou-se a ação larvicida após 1 hora e em 100 ppm antes de 24 horas. Nas concentrações de 50, 25 e 10 ppm o potencial larvicida foi verificado após 24 horas após o teste. Os resultados indicaram que os óleos essenciais das três espécies possuem atividade larvicida nessas concentrações, sendo que *S. aromaticum* e *L. sidoides* mostraram-se potencialmente mais ativos, registrando mortalidade de 100% das larvas num período de 10 minutos de tratamento. As Figuras 2 e 3 mostram a relação entre os dados obtidos e na Tabela 2 constam resultados dos cálculos das concentrações letais,  $CL_{50}$ , obtidas para *S. aromaticum*, *L. sidoides* e *H. martiusii*, frente à *Aedes aegypti* com valores respectivos de 21,4; 19,5 e 18,2 ppm e para *Culex quinquefasciatus* com valores de 14,4; 16,6 e 27,5 ppm respectivamente.

## CONCLUSÃO

Neste trabalho foi relatado um estudo de atividade larvicida dos óleos essenciais de *Syzygium aromaticum*, *Hyptis martiusii* e *Lippia sidoides* sobre larvas de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*. Foram identificados cerca de 90% dos principais constituintes químicos dos três óleos extraídos, e caracterizados para cada óleo essencial seus constituintes majoritários: eugenol, 1,8-cineol, e timol, respectivamente. Os bioensaios realizados ofereceram excelentes resultados quanto ao potencial ativo das amostras, principalmente os óleos de *Syzygium aromaticum* e *Lippia sidoides* que em concentrações de até 100 ppm tiveram um percentual de morte total (100%) das larvas, produzindo uma  $CL_{50}$  de 21,4 e 19,5 ppm para larvas de *Aedes aegypti* e 14,4 e 16,6 ppm para *Culex quinquefasciatus*. Diante dos resultados, estão

sendo realizados processos cromatográficos na tentativa de isolamento para testes que irão verificar atividade dos constituintes isolados. As perspectivas apontam para a elaboração de novos ensaios usando amostras de menores concentrações, para verificação do grau de toxidez em outras espécies animais, incluindo o homem, e elaboração de formulações que possam funcionar como uma alternativa natural ao combate de larvas de mosquitos.

## AGRADECIMENTOS

À Fundação Nacional de Saúde – FUNASA e ao Setor de Doenças Endêmicas da Secretária de Saúde do Município do Crato - Ceará pela concessão das larvas. Ao Laboratorista Josniel Pires da Silva pelo auxílio nas coletas e apoio constante. Ao CENAUREMN e PADETEC da UFC pelas realizações das análises físicas das amostras.

## REFERÊNCIAS

- Adams RP 1989. *Identification of essential oils ion trap mass spectroscopy*. San Diego: Academic Press Inc.
- Alencar JW, Craveiro AA, Matos FJ, Machado MIL 1990. Kovats índices simulation essential oils analysis. *Quím Nova* 13: 282-284.
- Araújo ECC, Silveira ER, Lima MAS, Neto MA, Andrade IL, Lima MAA, Santiago GPS, Mesquita ALM 2003. Insecticidal activity and chemical composition of volatile oils from *Hyptis martiusii* Benth. *J Agric Food Chem* 51: 3760-3762.
- Bara MTF, Vanetti MCD 1997/1998. Estudo da atividade antibacteriana de plantas medicinais, aromáticas e corantes naturais. *Rev Bras Farmacogn* 7/8: 21-34.
- Cepleanu F 1993. *Validation and application of three bench-top bioassays for screening of crude plant extracts and subsequent activity-guided isolation*. Suíça, 259p. These de Doctorat, Faculté des Sciences de l'Université de Lausanne, Lausanne.
- Cienfuegos F, Vaitsman D 2000. *Análise instrumental*, Rio de Janeiro: Interciência.
- Colins CH, Braga GL, Bonato PS 1997. *Introdução à métodos cromatográficos*, 7ª Ed. Campinas.
- Gottlieb OR, Magalhães MT 1960. Modified distillation trap. *Chemist Analyst* 49-114.
- Halsted SB, Gluber DJ, Kuno G 1997. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *CAB international*. New York, p.23-44.
- Hamburger M, Hostettmann K 1991. Bioactivity in plants: the links between phytochemistry and medicine. *Phytochemistry* 12: 3864-3874.
- Hemingway J, Ranson H 2000. Insecticide resistance in insect vectors of human disease *Annu Rev Entomol* 45: 371-391.
- Kelsey RG, Reynolds GW, Rodriguez E 1984. *Biology and chemistry of plant trichomes*, Rodriguez E, Healey PL, Mentha I.; ed.; Plenum Press, New York.
- Leal LKAM, Oliveira VM, Araruna SM, Miranda MCC, Oliveira FMA 2003. Análise de timol por CLAE na tintura de *Lippia sidoides* Cham. (alecrim-

- pimenta) produzida em diferentes estágios de desenvolvimento da planta. *Rev Bras Farmacogn* 13(Supl 1): 9-10.
- Lemos TLG, Matos FJA, Alencar JW, Craveiro AA, Clark AM, MacChesney JD 1990. Antimicrobial activity of essential oils of Brazilian plants. *Phytother Res* 4: 83-84.
- Matos FJA 1988. *Introdução à fitoquímica experimental*. Fortaleza: ED-UFC.
- Mclaughlin JL, Anderson JE 1988. Brine shrimp lethality: A rapid general bioassay for bioactive compounds, *Workshop on simple bioassay*. Washington.
- Oliveira MF, Lemos TLG, Mattos MC, Segundo TA, Santiago GMP, Braz-Filho R 2002. New enamine derivatives of lapachol and biological activity. *An Acad Bras Ci* 74: 211-221.
- Pizarro APB, Filho AMO, Parente JP, Melo MTV, Santos CE e Lima PR 1999. O aproveitamento do resíduo da indústria do sisal no controle de larvas de mosquitos. *Rev Soc Bras Med Trop* 32: 23-29.
- Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR 2002. *Farmacognosia – da planta ao medicamento*. Ed. UFSC.
- Sousa MP, Matos MEO, Matos FJA, Machado MIL, Craveiro AA 1991. *Constituintes químicos ativos de plantas medicinais brasileiras*. Fortaleza: Ed-UFC .