

ATIVIDADE LARVICIDA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Piper Dilatatum* e *Piper Hostmannianum* (PIPERACEAE) PARA O CONTROLE DE *Aedes Aegypti* (CULICIDAE) EM LABORATÓRIO

LARVICIDAL ACTIVITY OF THE ESSENTIAL OILS OF *Piper Dilatatum* and *Piper Hostmannianum* (PIPERACEAE) FOR THE CONTROL OF *Aedes Aegypti* (CULICIDAE) IN THE LABORATORY.

Joiziane Silva de Albuquerque¹, Edilma Gama¹, Leandro Pereira França², Rheryson Pantoja de Jesus^{3*}.

1 Farmácia. Centro Universitário do Norte. Manaus/AM. Brasil

2 Msc. em Biotecnologia. Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA). Manaus/AM. Brasil

3 Msc. em Ciência de Alimentos. Docente do Centro Universitário do Norte. Manaus/AM. Brasil.

* **Autor correspondente:** haryson_77@hotmail.com

RESUMO

Introdução: Na busca por substitutos alternativos para o controle do mosquito *Aedes aegypti*, muitas pesquisas são realizadas com o intuito de desenvolver novos produtos com óleos, extratos ou constituintes ativos provenientes da origem vegetal. Este mosquito é o principal vetor na transmissão da Dengue, Chikungunya, Zika e Febre Amarela no Brasil.

Objetivo: Avaliar atividade larvicida dos óleos essenciais de *Piper dilatatum* e *Piper hostmannianum*, para controle na fase larval deste vetor. **Métodos:** As larvas de *Aedes aegypti* utilizadas nos bioensaios foram obtidas de colônias mantidas no Laboratório de Malária e Dengue do INPA. Os óleos foram obtidos pelo método de hidrodestilação, utilizando o sistema Clevenger por 3 horas. Os bioensaios foram preparados com os óleos e água destilada nas seguintes concentrações: 500, 250, 100, 50, 25µg/mL e com o controle negativo (DMSO e H₂O), foram utilizadas 500 larvas de *Aedes aegypti* divididas em grupos de 20 para cada concentração testada. Os dados obtidos foram analisados no programa POLO PC®, para cálculos das respectivas CL50 e CL90. **Resultados:** Os óleos essenciais de *Piper dilatatum* e *Piper hostmannianum* apresentaram atividade larvicida sobre o *Aedes aegypti* com CL50 de 97,56µg/mL e 96,13µg/mL, e da CL90 de 161,98µg/mL e 155,68µg/mL respectivamente, em 24 horas de exposição, demonstrando ser uma alternativa viável no controle deste vetor. **Conclusão:** Os resultados demonstram que os óleos essenciais avaliados apresentaram atividade larvicida sobre *Aedes Aegypti*, sendo uma alternativa viável para controle da Dengue, Chikungunya, Zika e Febre amarela.

Palavras-chave: *Aedes aegypti*. Óleos essenciais. Controle biológico.

ABSTRACT

Introduction: In the search for alternative substitutes for the control of the *Aedes aegypti* mosquito, many studies are carried out in order to develop new products with oils, extracts or active constituents from plant origin. This mosquito is the main vector in the transmission of Dengue, Chikungunya, Zika and Yellow Fever in Brazil. **Objective:** To evaluate the larvicidal activity of the essential oils of *Piper dilatatum* and *Piper hostmannianum*, for control

in the larval phase of this vector. **Methods:** The larvae of *Aedes aegypti* used in bioassays were obtained from colonies maintained in the Malaria and Dengue Laboratory of INPA. The oils were obtained by hydrodistillation method, using the Clevenger system for 3 hours. The bioassays were prepared with oils and distilled water in the following concentrations: 500, 250, 100, 50, 25µg / mL and with the negative control (DMSO and H₂O), 500 *Aedes aegypti* larvae were divided into groups of 20 for each tested concentration. The data obtained were analyzed in the POLO PC program®, for calculations of the respective CL50 and CL90. **Results:** The essential oils of *Piper dilatatum* and *Piper hostmannianum* showed larvicidal activity on *Aedes aegypti* with CL50 of 97.56µg / mL and 96.13µg / mL and CL90 of 161.98µg / mL and 155.68µg / mL respectively in 24 hours of exposure, demonstrating to be a viable alternative in the control of this vector. **Conclusion:** The results demonstrate that the essential oils evaluated showed larvicidal activity on *Aedes Aegypti*, being a viable alternative to control Dengue, Chikungunya, Zika and Yellow fever.

Keywords: *Aedes aegypti*; Essential oils; Biological control.

INTRODUÇÃO

Os mosquitos são insetos conhecidos como pernilongos, muriçocas ou carapanãs, que são de grande importância para a saúde pública, por serem transmissores de patógenos causadores de doenças como malária, filariose, febre amarela, dengue, leishmanioses, febre chikungunya, vírus zika, entre outras arboviroses^{1, 2}.

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), anualmente milhões de pessoas adoecem de Dengue, Chikungunya, Zika no mundo e, diante deste fato, nota-se a importância dos estudos em mosquitos para o controle da transmissão destas enfermidades. Dentre os insetos vetores de patógenos de maior importância ao homem, o mosquito *Aedes aegypti* apresenta grande destaque. Este mosquito antropofílico foi reconhecido inicialmente pela transmissão da febre amarela, e hoje vem sendo reconhecido

pela transmissão da Dengue, Chikungunya e Zika^{3, 4}.

De acordo com dados da Organização das Nações Unidas (ONU), na América Latina, em torno de 100 milhões de pessoas não têm acesso ao saneamento básico, e 70 milhões vivem sem água encanada⁵. Tais fatores preocupam os especialistas, pois sem serviço de saneamento apropriado, as pessoas armazenam água de forma irregular e acabam favorecendo a propagação do *A. aegypti*. É verificado também que o processo de urbanização, onde o mosquito tem adquirido hábitos domésticos, auxilia a sua propagação. Uma das estratégias para controle é atacar o criadouro com ações políticas urbanas, que são elementos fundamentais para a saúde da população^{6, 7}.

Visando à redução ou substituição do uso de inseticidas químicos, pesquisadores têm buscado e obtido algumas formas alternativas de controle, as quais causam a

morte na fase larval em seus próprios criadouros, sendo importantes especialmente quando estes não podem ser eliminados⁸. A utilização de óleos essenciais vem sendo uma alternativa para o controle de vetores de patógenos, por estes organismos apresentarem compostos químicos contra espécies de mosquitos, gerando alternativas de baixo custo para o controle deste vetor⁹.

Diversas famílias botânicas como a *Piperaceae* são conhecidas por conter em sua composição substâncias com propriedades inseticidas como a piperina, amidas análogas à piperina, fenilpropanoides, safrol e dilapiol, dentre outras^{10, 11}. O gênero *Piper* se destaca dentro da família por conter espécies que apresentam metabólitos secundários, como terpenos, lignanas e amidas, usados na defesa contra a herbivoria¹².

Todavia, poucas espécies do gênero *Piper* foram estudadas do ponto de vista fitoquímico e, tendo em vista que há a necessidade de ampliar os conhecimentos e obtenção de novos compostos ativos desta família que permitam a síntese de novos produtos inseticidas com o uso direto no controle de insetos vetores de patógenos, objetivou-se com a presente pesquisa avaliar o potencial larvicida dos óleos essenciais de *Piper dilatatum* e *Piper hostmannianum* para o controle de *A.*

aegypti em condições controladas no laboratório.

MATERIAL E METÓDO

COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO VEGETAL

As folhas de *P. dilatatum* e *P. hostmannianum* foram coletadas na Embrapa, situada na Rodovia AM-010 (km 30), acondicionadas em sacos plásticos devidamente etiquetados e transportada ao Laboratório do Centro Universitário Uninorte. As exsiccatas foram depositadas e identificadas por meio de comparação com material existente na coleção do herbário do INPA. O restante do material vegetal foi seco em estufa à temperatura de 40°C e triturado separadamente em moinho tipo faca para obtenção da massa que será utilizada na extração dos óleos essenciais por um período de 72 horas.

EXTRAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

A extração dos óleos essenciais das folhas de *P. dilatatum* e *P. hostmannianum* foi feita pelo método hidrodestilação utilizando o sistema de Clevenger durante 3 horas a 100°C¹³. Os óleos foram tratados com sulfato de sódio (Na₂SO₄) anidro comercial para retirar água residual, e armazenado a -18 °C. O rendimento dos óleos foi obtido pela relação entre o volume de óleo extraído para a massa de material vegetal.

BIOENSAIOS LARVICIDAS

Os bioensaios foram conduzidos para testar a toxicidade dos óleos de *P. dilatatum* e *P. hostamannianum* sobre as larvas de *A. aegypti*.

A montagem foi feita de acordo com o protocolo da Organização Mundial da Saúde¹⁴ com modificações, em temperatura de $26^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de 80% e fotoperíodo de 12 horas.

Os bioensaios foram preparados com os óleos e água destilada nas seguintes concentrações: 500, 250, 100, 50, 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e o controle negativo (DMSO e H_2O), utilizando 500 larvas de *A. aegypti* divididas em grupos de 20 para cada concentração testada. A atividade larvicida foi estimada pela mortalidade larval às 24h de exposição. Os dados obtidos foram

analisados no programa POLO PC®¹⁵, para cálculos das respectivas CL₅₀ e CL₉₀ com limite intervalo de confiança de 95%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As plantas possuem mecanismos de defesa constitutiva e defesa induzida, que podem ter ação direta ou indireta contra insetos, sendo capazes de sintetizar por diferentes vias metabólicas, compostos de defesa como metabólitos secundários e proteínas que atuam como toxinas¹⁶.

Os óleos essenciais de *P. dilatatum* e *P. hostimannianum* foram extraídos em triplicata, mas os rendimentos foram, respectivamente, 1,2% e 0,9% apresentando aspectos claros e aromas agradáveis.

Tabela 1: Massas e rendimentos dos óleos essenciais de *P. dilatatum* e *P. hostimannianum*.

Espécies	Massa Triturada (g)	Massa de Óleo (g)	Rendimento (%) \pm DP
<i>P. dilatatum</i>	200	2,42	1,2 \pm 0,3
<i>P. hostimannianum</i>	200	1,72	0,9 \pm 0,5

DP: Desvio padrão de triplicata

Estes resultados corroboram com os obtidos por Silva e colaboradores¹⁷, que relataram que a família *Piperaceae* apresenta rendimentos superiores a 1%. Por outro lado, foram encontrados em espécies como *P. klotzschianum*, *P. marginatum* e *P. gaudichaudianum*, *P. hostmannianum* os rendimentos de 1,5%, coletadas na região amazônica¹⁸.

O óleo essencial das folhas de *P. dilatatum* apresentou os menores valores da CL₅₀ (101,96 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e da CL₉₀ (189,84 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para as larvas de *A. aegypti* após 24 horas de exposição, demonstrando melhor atividade larvicida comparadas ao óleo de *P. Hostmannianum*, que mostrou CL₅₀ (105,01 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e da CL₉₀ (262,69 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Tabela 2).

Tabela 2: Os valores da CL₅₀ e CL₉₀ dos óleos essenciais de *P. dilatatum* e *P. hostmannianum* contra larvas de *A. aegypti* após 24 horas de aplicação.

Espécies	CL ₅₀ ± DP	(IC 95%)	CL ₉₀ ± DP	(IC 95%)	X ²	GL
<i>P. dilatatum</i>	101,96± 0,7	62,47 – 129,78	189,84± 0,7	126,34 – 209,84	0,21	4
<i>P. hostmannianum</i>	105,01± 0,7	70,83 – 147,19	262,89± 0,7	179,60 – 286,53	0,13	4

DP: Desvio padrão de triplicata

X²: Qui quadrado

GL: Grau de liberdade

IC 95%: Intervalo de confiança de 95%

Garcez e colaboradores¹⁹ relataram que os óleos essenciais são considerados como bons agentes larvicidas ao apresentarem valores de CL₅₀ inferiores a 100µg/mL. Conforme França²⁰, as espécies do gênero *Piper* apresentam atividade larvicida com CL₅₀ de 95 µg/mL, resultado semelhante ao encontrado neste trabalho.

Os óleos essenciais, por serem biodegradáveis, geralmente possuem uma toxicidade baixa aos mamíferos, apresentam relativo baixo custo de produção, podendo atuar sobre vários sítios alvo ou podendo assim ser substâncias ideais para estudo de novos inseticidas, devido as suas propriedades químicas (inseticida e fungicida)²¹.

Desta forma, o presente trabalho demonstrou que os óleos essenciais de *P. dilatatum* e *P. hostmannianum* foram promissores, podendo ser utilizados como métodos alternativos no controle deste vetor no ambiente amazônico, devido a sua ação inseticida que pode agir por contato ou

ingestão, ocasionando paralisia e morte do inseto.

CONCLUSÃO

Tendo como base os resultados encontrados no presente estudo, pode-se verificar que estes óleos essenciais de *P. dilatatum* e *P. hostmannianum* apresentam potencial de ser considerados importantes agentes de controle natural, para o controle das larvas de *Aedes aegypti*, podendo vir a compor como produto comercial no combate do mosquito e conseqüentemente colaborar para a diminuição da ocorrência da morbimortalidade decorrente de enfermidades transmitidas por este vetor. No entanto, são necessários mais estudos para uma melhor avaliação destes óleos essenciais no desenvolvimento de produtos, bem como seu custo de produção, mecanismos de ação envolvidos e eficácia.

REFERÊNCIAS

1. CONSOLI, R. A. G. B.; OLIVEIRA, R. L. Principais mosquitos de importância

- sanitária no Brasil. FIOCRUZ. Rio de Janeiro, 228p; 1994.
2. BRASIL, 2013. **Guia de vigilância epidemiológica. Influenza/varíola**. Brasília: Ministério da Saúde. Vol. II, 1-12 pp.
 3. Organização Mundial de Saúde (OMS) 2015. **Global malaria situation**. Disponível em: www.who.int/globalatlas/autorlogin/malaria/login.asp. Acesso em: 07 jun. 2018.
 4. POWEL, J. R.; TABACHNICK, W. J. History of domestication and spread of *Aedes aegypti* – a review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 108, suppl 1, p. 11-17, 2013.
 5. PEREIRA, C. F.; FERREIRA, T. G.; BORGES, J. L. Política de saúde e controle da dengue em Uberaba-MG. **Revista Eletrônica Interdisciplinar**, v. 1, n. 9, 2013.
 6. JOHANSEN, I. C.; DO CARMO, R. L.; ALVES, L. C. Desigualdade social intraurbana: implicações sobre a epidemia de dengue em Campinas, SP, em 2014. **Cadernos Metrôpole**. v. 18, n. 36, p. 421-440, 2016.
 7. Ministério da Saúde (MS). Secretaria de Vigilância em Saúde. **Vigilância em saúde no Brasil 2003|2019: da criação da Secretaria de Vigilância em Saúde aos dias atuais**. 2019. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/boletins-epidemiologicos>. Acesso em: 10 ago. 2020.
 8. GUIRADO, M. M.; BICUDO, H. E. M. C. Alguns aspectos do controle populacional e da resistência a inseticidas em *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). **BEPA, Boletim Epidemiológico Paulista**, v.6, n.64, p.5-14, 2009.
 9. MEDEIROS, E. S. Eficiência de extrato vegetal e do eugenol do cravo *Eugenia caryophyllata* (MYRTACEAE), para controle larval de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) E *Anopheles darlingi* Root, 1926 (Diptera, Culicidae). Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual do Amazonas, Manaus, UEA, 2012.
 10. CORRÊA, J. C.R.; SALGADO, H. R. N. Atividade inseticida das plantas e aplicações: revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.13, n.4, p.500-506, 2011.
 11. GUIMARÃES, E.F.; GIORDANO, L.C.S. Piperaceae no Nordeste Brasileiro I: Estado do Ceará. **Rev. Rodriguésia**, v. 55, n.84, p. 21-46; 2004.
 12. MIRANDA, J. E. *et al.* Potencial inseticida do extrato de *Piper tuberculatum* (Piperaceae) sobre *Alabama argillacea* (Huebner, 1818) (Lepidoptera: Noctuidae). **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, v. 6, n. 02, p. 557-563, 2002.
 13. SARAIVA, R. C. G.; PINTO, A. C.; NUNOMURA, S. M.; POHLIT, A. M. Estudo fitoquímico de *Simaba polyphylla* (Cavalcante) e atividades biológicas. **Quim. Nova**, 29, 264. 2006.
 14. OMS – World Health Organization (WHO). **Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicidas**. 2005.
 15. LEORA SOFTWARE. POLO-PC, A user's guide to probit and logit analysis computer program, version By LeOra Software, Berkeley, CA, 1987.
 16. RAMOS, R.S.; RODRIGUES, A. B. L.; ALMEIDA, S. S. M. S. Preliminary Study of the Extract of the Barks of *Licania macrophylla* Benth: Phytochemicals and Toxicological

Aspects. **Biota Amazônia**, v. 4, n. 1, p. 94-99, 2014.

17. SILVA, J.K.; SILVA, N.N.; SANTANA, J.F.; ANDRADE, E.H.; MAIA, J.G.; SETZER, W.N. Phenylpropanoid-rich essential oils of Piper species from the Amazon and their antifungal and anti-cholinesterase activities. **Natural Product Communications**, 11 (12), 1907–1911. 2016.
18. BENELLI, G. ROMANO, D. Mosquito vectors of Zika virus. **Entomologia Generalis**, 36(4): 309-18. 2017.
19. GARCEZ, W. S.; GARCEZ, F. R.; SILVA, L. M. G.; SARMENTO, U. C. Substâncias de Origem Vegetal com Atividade Larvicida Contra *Aedes aegypti*. **Revista Virtual de Química**, 5(3). 2013.
20. FRANÇA, L. P. **Avaliação da atividade larvicida de extratos e óleo essencial de *Piper capitarianum* sobre *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) E *Anopheles darlingi* Root, 1926 (Diptera, Culicidae)**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, UFAM, 2015.
21. ISMAN, M.B. Plant essential oils for pestand disease management. **Crop Protection**, v.19, p.603-8. 2000.