AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA DE EXTRATOS AQUOSOS E DO HIDROLATO OBTIDOS DAS FOLHAS DE *Croton argyrophyllus* SOBRE O *Aedes aegypti*

Rômulo Carlos Dantas da Cruz[1] Karine da Silva Carvalho[1], Sandra Lúcia da Cunha e Silva[2], Simone Andrade Gualberto[2]

[1]Discentes do Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais – PPGCA/UESB (romulo.carlos@hotmail.com) Itapetinga-Brasil
[2]Laboratório de Pesquisa de Inseticidas Naturais (LAPIN)/Núcleo de Pesquisa em Química Aplicada/Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – Praça Primavera, 40, Bairro Primavera, Itapetinga, Bahia. Cep: 45700-000, Brasil.

Recebido em: 31/03/2015 – Aprovado em: 15/05/2015 – Publicado em: 01/06/2015

RESUMO

As plantas são compostas de substâncias bioativas com propriedade inseticidas e tem sido alvo de estudos visando o controle de insetos vetores, a exemplo do *Aedes aegypti*. Dessa forma, buscou-se avaliar o potencial dos extratos aquosos e do hidrolato obtido das folhas secas e frescas de *Croton argyrophyllus*, no que diz respeito a sua atividade larvicida sobre o *Ae. aegypti.* Foram avaliados os extratos obtidos por maceração e infusão, e o hidrolato, subproduto do processo de extração do óleo essencial por hidrodestilação, assim como o resíduo aquoso resultante, também, desse processo de extração. Para a realização dos bioensaios foram utilizadas 30 larvas de terceiro e quarto instar por repetição, as quais foram expostas a concentração de 100% (v/v) dos extratos. Em cada repetição foi utilizado 30 mL dos diferentes extratos e as larvas foram colocadas em contato com esses extratos por um período de 24 horas O resíduo aquoso e o hidrolato, obtidos das folhas secas, com 24 horas de exposição ocasionaram 53,3% e 52,5% de mortalidade das larvas de *Ae. aegypti*, respectivamente, sendo significativamente mais ativos quando comparados aos demais extratos aquosos. Os dados obtidos demonstraram que o hidrolato e o resíduo aquoso, obtido das folhas secas de *C. argyrophyllus,* teve efeito tóxico sobre as larvas de *Ae. aegypti*, o que não ocorreu com os diferentes extratos obtidos a partir das folhas frescas.

PALAVRAS-CHAVE: dengue, inseticidas botânicos, plantas bioativas

ASSESSMENT ACTIVITY LARVICIDE OF THE LEAVES AQUEOUS EXTRACTS AND HIDROLACT OF *Croton argyrophyllus ON Aedes aegypti*

ABSTRACT

The plants are composed of bioactive substances with insecticides property and has been the target of studies for the control of insect vectors, such as the *Aedes aegypti*. Thus, we sought to evaluate the potential of aqueous extracts and hidrolact obtained from dried and fresh leaves of *Croton argyrophyllus*, as regards its larvicide activity on the *Ae. aegypti*. The extracts were evaluated by maceration and infusion, and hidrolact, byproduct of the process of extracting the essential oil by hydrodistillation and the resulting aqueous residue also that extraction process. For the bioassays

were used 30 third and fourth instar larvae per replicate, which were exposed to a concentration of 100% (v/v) of the extracts. In each repetition was used 30 mL of each extract and larvae were placed in contact with these extracts for a period of 24 hours.The aqueous residue and the hidrolact obtained from the dried leaves, with 24 hours of exposure caused 53.3% and 52.5% mortality of larvae of *Ae. aegypti*, respectively, being significantly more active when compared to other aqueous extracts. The data obtained show that the hidrolact and the aqueous residue obtained from the dried leaves of *C. argyrophyllus* has a toxic effect on *Ae. aegypti* larvae, which did not occur with different extracts obtained from the fresh leaves.
KEYWORDS: dengue, botanical insecticides, bioactive plants

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de inseticidas botânicos permite a utilização de vegetais como uma fonte alternativa viável para o controle de insetos, pois os compostos bioativos produzidos pelas plantas possibilitam que as mesmas possam se proteger contra o ataque de insetos herbívoros. Entre os insetos passíveis de serem controlados a partir desses compostos encontram-se os vetores de doenças, a exemplo do *Aedes aegypti* (LIMA et al., 2006, POHLIT et al., 2011).

O *A. aegypti* é um mosquito cosmopolita e vive principalmente em locais de clima quente e úmido. Sua distribuição é limitada pela altitude, sendo geralmente abaixo de 1.000 m, todavia, já foi encontrado a 2.200 m acima do nível do mar na Colômbia e Índia. Acredita-se que esse mosquito seja originário do continente africano, sendo introduzido nas Américas no início das explorações e da colonização, apresentando posteriormente, uma ampla dispersão urbana, nos países tropicais e subtropicais (WHO, 2009, LIMA et al., 2009, DUARTE et al., 2013).

Esse vetor caracteriza-se por exibir um hábito estritamente antropofílico, e apresentar grande importância do ponto de vista epidemiológico, sendo o transmissor do vírus causador da febre amarela, da febre da chikungunya e, principalmente, do vírus da dengue (BARRETO & TEIXEIRA, 2008, VASCONCELOS, 2014).

A estratégia de controle desse vetor baseia-se, principalmente, no controle entomológico, através do uso de inseticidas sintéticos. No entanto, o uso contínuo e indiscriminado desses produtos, tem ocasionado desequilíbrio ambiental, toxicidade a mamíferos, bem como a seleção de populações de insetos resistentes (BARRETO, 2005, GARCEZ et al., 2013).

HORTA et al., (2011) ao analisarem a susceptibilidade das larvas do *A. aegypti* ao inseticida sintético temefós, no estado de Minas Gerais, verificaram uma média de mortalidade larval muito baixa (2,78%), comparada a da linhagem Rockefeller (99,0%), evidenciando assim, um elevado nível de resistência para essa população. LUNA et al., (2004) também verificaram que o inseticida cipermetrina, não apresentou-se tóxico às larvas do *A. aegypti*, e assim, tais autores, recomendaram a suspensão do uso desse inseticida, bem como a sua substituição.

Nesse sentido, cresce o interesse por plantas que apresentem potencial inseticida. Todavia, tais inseticidas de origem botânica, também devem visar a redução do impacto sobre a biodiversidade, mediante a baixa ou nenhuma ação tóxica sobre organismos não-alvo, assim como ao meio ambiente (OLIVEIRA et al., 2014). Desse modo, a formulação de inseticidas a partir de vegetais, poderá contribuir com programas de manejo integrado, para o controle de insetos vetores.

Diversas pesquisas voltadas para o potencial da flora têm sido realizadas, apresentando resultados promissores em relação ao controle do *A. aegypti* (LUNA et al., 2005, LIMA et al., 2006, FARIAS et al., 2010, SILVA et al., 2014). Para CORREA & SALGADO (2011) e GARCEZ et al., (2013) os inseticidas botânicos podem reduzir os riscos do aparecimento de populações de insetos resistentes, em virtude da sua complexidade molecular, bem como minimizar os riscos à saúde humana e ao ambiente.

LIMA et al., (2006) verificaram que hidrolatos, soluções aquosas do óleo essencial, obtidos de caules e folhas de *Croton zehntneri*, *Croton nepetaefolius* e *Croton argyrophyloides* (Euphorbiaceae), espécies endêmicas da caatinga, ocasionaram 100% de mortalidade de larvas do *Ae. aegypti*, o que demonstra o potencial inseticida desse gênero. Dentro desse contexto, buscou-se avaliar o potencial dos extratos aquosos e do hidrolato das folhas secas e frescas de *Croton argyrophyllus*, no que diz respeito a sua atividade larvicida sobre o *A. aegypti*.

MATERIAL E MÉTODOS

As etapas de coleta e identificação de *Croton argyrophyllus* (Kunth) (Euphorbiaceae), foram supervisionadas por um especialista botânico, e as exsicatas depositadas no herbário da Universidade Estadual de Feira de Santana, sob voucher HUEFS 4662 (S13º55.25' W041º06.88'). A planta foi coletada na Floresta Nacional Contendas do Sincorá, no mês de maio/2014.

Posteriormente, as folhas foram pesadas e, em seguida, divididas em duas porções de pesos idênticos, sendo uma imediatamente triturada para iniciar o processo de extração (material fresco), e a outra foi encaminhada para a estufa de circulação de ar, onde permaneceu por um período 12 horas sob a temperatura de 40 ℃. Posteriormente, as folhas pré-secas também foram trituradas e submetidas ao processo de extração.

Foram avaliados os extratos aquosos do material vegetal seco e fresco obtidos pelos processos de maceração e infusão. Avaliaram-se também o hidrolato, subproduto do processo de extração do óleo essencial por hidrodestilação, assim como o resíduo aquoso também resultante do processo de extração do óleo. Para cada extração utilizou-se 100,0 g de folhas secas e frescas, as quais foram submersas em 1,5 L de água deionizada, a temperatura ambiente (26 ± 1 ℃), por três horas (maceração), em ebulição (100 ℃), durante 30 minutos (infusão) e, durante o processo de extração do óleo essencial, em fervura sob refluxo (100 ℃) durante três horas, originando o hidrolato, e ao final do processo o resíduo aquoso.

Para a realização dos bioensaios foram utilizadas larvas de terceiro e quarto ínstar do *A. aegypti*, oriundas de uma colônia estabelecida no Laboratório de Pesquisa de Inseticidas Naturais, da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, a partir de ovos da linhagem Rockefeller, cedidos pelo Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes e Vetores (LAFICAVE), da Fundação Oswaldo Cruz, do Rio de Janeiro.

Para a realização dos ensaios larvicidas foram utilizados os extratos aquosos, assim como o hidrolato e resíduo aquoso, na concentração de 100% (v/v), com quatro repetições por tratamento. Foram utilizadas 120 larvas por tratamento, com 30 larvas por repetição e o grupo controle, no qual utilizou-se água deionizada. Em cada repetição foi utilizado 30 mL dos diferentes extratos e as larvas foram colocadas em contato com esses extratos por um período de 24 horas.

As observações foram realizadas após 1, 4, 8, 16 e 24 horas, a partir do início

do experimento. Os bioensaios foram conduzidos em câmara climatizada regulada a 27 ℃ e 12 horas de fotofase. Os percentuais de mor talidade das larvas foram submetidos ao teste de *Tukey*, em nível de 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O hidrolato das folhas secas de *C. argyrophyllus*, ocasionou, a partir de uma hora de exposição das larvas, um percentual de mortalidade de 6,6%, foi significativamente mais eficaz ($p<0,05$), quando comparado aos demais extratos (Tabela 1). A partir de quatro horas de exposição, o hidrolato, junto ao resíduo aquoso, foram significativamente mais tóxicos ($p<0,01$). Com 24 horas de exposição tanto o hidrolato (52,5%) quanto o resíduo aquoso (53,3%) continuaram sendo mais tóxicos ($p<0,01$) quando comparados aos demais extratos, que não apresentaram toxicidade sobre as larvas do *A. aegypti* (Tabela 1).

TABELA 1. Percentual de mortalidade de larvas de *Aedes aegypti*, em relação ao tempo de exposição aos diferentes extratos aquosos obtidos a partir das folhas secas de *Croton argyrophyllus.*

Métodos de extração	**Mortalidade (%)[1]**				
	1 h	4 h	8 h	16 h	24 h
Hidrolato	6,6[a]	24,2[a]	33,3[a]	41,7[a]	52,5[a]
Resíduo aquoso	0,0[b]	10,8[ab]	33,3[a]	46,7[a]	53,3[a]
Infusão	0,0[b]	0,0[b]	0,0[b]	0,0[b]	0,0[b]
Maceração	0,0[b]	0,0[b]	0,0[b]	0,0[b]	0,0[b]
Controle	0,0[b]	0,0[b]	0,0[b]	0,0[b]	0,0[b]

[1]Médias seguidas pela mesma letra nas colunas, não diferem significativamente pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Hidrolatos representam soluções aquosas de óleos essenciais e apresentam, geralmente, compostos voláteis hidrossolúveis, ricos em princípios ativos (BASER & BUCHBAUER, 2012). LIMA et al., (2006) verificaram a atividade larvicida de hidrolatos obtidos das folhas e caules de espécies pertencentes ao gênero *Croton* sobre o *A. aegypti*, e sugeriram que substâncias secundárias presentes no óleo essencial dos respectivos hidrolatos, foram os responsáveis pela ação inseticida, tais como fenilpropanóides, monoterpenos e sesquiterpenos.

A eficácia do resíduo aquoso obtido das folhas secas, quando comparado aos demais extratos aquosos (maceração e infusão), também obtidos a partir das folhas secas, pode ter ocorrido em função do método utilizado para a obtenção do óleo essencial, a hidrodestilação, ou seja, as folhas ficaram em contato direto com a água em ebulição por três horas, o que pode ter favorecido a liberação de substâncias bioativas nesse resíduo aquoso.

O hidrolato e os extratos aquosos obtidos das folhas frescas de *C. argyrophyllus*, não apresentaram toxicidade sobre as larvas do *A. aegypti*, diferentemente do observado com os extratos e com o hidrolato obtido a partir das folhas secas. A diferença do potencial larvicida entre os hidrolatos, obtidos a partir das folhas secas e frescas, de *C. argyrophyllus* pode ter ocorrido em função do processo de secagem, visto que a redução do teor de água nas folhas, ocasionado pela secagem, tende a aumentar o percentual do óleo essencial em relação à massa

total, aumentando, também, o percentual de componentes bioativos e aromáticos e, consequentemente, a presença destes no hidrolato.

Segundo BLANK et al., (2007) a pré-secagem de um órgão vegetal, com vistas à extração de óleos voláteis, aumenta consideravelmente o teor e o rendimento dos mesmos, pelo fato da temperatura afetar a resistência da membrana celular favorecendo assim, maior liberação do óleo essencial durante a hidrodestilação. Diversos trabalhos têm demonstrado diferença em termos quantitativos da composição química de seus óleos quando obtidos a partir de folhas frescas e secas, tendo com essa última, verificado um aumento no percentual dos seus constituintes (BLANK et al., 2005, BARBOSA et al., 2006, BLANK et al., 2007).

CONCLUSÃO

O hidrolato e o resíduo aquoso obtidos das folhas secas de *C. argyrophyllus* apresentam maior toxicidade sobre as larvas do *A. aegypti*, quando comparados aos demais extratos. Contudo, os diferentes extratos obtidos a partir da folhas frescas de *C. argyrophyllus*, não se mostram tóxicos para o *A. aegypti*.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB).

REFERÊNCIAS

BARBOSA, F. D. F.; BARBOSA, L. C.; MELO, E. C.; BOTELHO, F. M.; SANTOS, R. H. Influência da temperatura do ar de secagem sobre o teor e a composição química do óleo essencial de *Lippia alba* (Mill) NE Brown. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1221-1225, 2006.

BARRETO, C. F. *Aedes aegypti* - resistance to the chemical insecticides and the new control alternatives. **Revista Eletrônica Faculdade Montes Belos**, v.1, n. 2, p. 62-73, 2005.

BARRETO, M. L.; TEIXEIRA, M. G. Dengue no Brasil: situação epidemiológica e contribuição para uma agenda de pesquisa. **Estudos avançados**, v. 22, n. 64, p. 53-72, 2008.

BASER, K. H. C.; BUCHBAUER, G. **Handbook of essential oils**. Science, technology, and applications CRC Press, 2012. p. 994.

BLANK, A. F.; COSTA, A. G.; ARRIGONI-BLANK, M. D. F.; CAVALCANTI, S. C.; ALVES, P. B.; INNECCO, R.; SOUSA, I. F. D. Influência da estação, tempo de colheita e secagem em Java citronela (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) voláteis do petróleo. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 4, p. 557-564, 2007.

BLANK, A. F.; FONTES, S. M.; CARVALHO FILHO, J. L. S.; ALVES, P. B.; SILVA-MANN, R.; MENDONÇA, M. C.; RODRIGUES, M. O. Influência do horário de colheita e secagem de folhas no óleo essencial de *Melissa* (*Melissa officinalis* L.) cultivada em dois ambientes. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 8, n. 1, p. 73-78, 2005.

CORRÊA, J. C. R.; SALGADO, H. R. N. Atividade inseticida das plantas e aplicações: revisão. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 13, n. 4, p. 500-506, 2011.

DUARTE, E. H.; PEREIRA, J.; OLIVEIRA, H.; LIMA, H. S.; PEREZ, A.; PILE, E. *Aedes* (Stegomyia) *aegypti* (Diptera: Culicidae) em algumas ilhas de Cabo Verde: Tipologia dos criadouros e sua relação com a presença larval. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 80, n. 3, p. 359-362, 2013.

FARIAS, D. F.; CAVALHEIRO, M. G.; VIANA, M. P.; QUEIROZ, V. A.; ROCHA-BEZERRA, L. C. B.; VASCONCELOS, I. M. Extratos de sementes de leguminosas brasileiras como fontes ricas de compostos larvicida contra *Aedes aegypti* L. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 82, n. 3, p. 585-594, 2010.

GARCEZ, W. S.; GARCEZ, F. R.; SILVA, L. M. G. E.; SARMENTO, U. C. Substâncias de origem vegetal com atividade larvicida contra *Aedes aegypti.* **Revista Virtual de Química***,* v. 5, n. 3, p. 363-393, 2013.

HORTA, M. A. P.; CASTRO, F. I.; ROSA, C. S.; DANIEL, M. C.; MELO, A. L. Resistance of *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) to temephos in Brazil: A revision and new data for Minas Gerais state. **BioAssay**, v. 6, n. 7, p. 1-6, 2011.

LIMA, M. G. A.; MAIA, I. C. C.; SOUSA, B. D.; MORAIS, S. M.; FREITAS, S. M. Effect of stalk and leaf extracts from Euphorbiaceae species on *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) larvae. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 48, n. 4, p. 211-214, 2006.

LIMA, W. P.; CHIARAVALLOTI NETO, F.; MACORIS, M. L. G.; ZUCCARI, D. A. P. C.; DIBO, M. R. Estabelecimento de metodologia para alimentação de *Aedes aegypti* em camundongos e avaliação da toxicidade do óleo essencial de *Tagetes minuta* sobre o *Aedes aegypti*. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 6, p. 638-641, 2009.

LUNA, J. E.; MARTINS, M. F.; ANJOS, A. F.; KUWABARA, E. F.; NAVARRO-SILVA M. A. Susceptibility of *Aedes aegypti* to temephos and cypermethrin insecticides, Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. 38, n. 6, p. 842-843, 2004.

LUNA, J. S.; SANTOS, A. F.; LIMA, M. R. F.; OMENA, M. C.; MENDONÇA, F. A. C.; BIEBER, L. W. Study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from Northeast Brazil. **Journal Ethnopharmacol**, v**.** 97, n. 2, p. 199-206 2005.

OLIVEIRA, G. P.; SILVA, S. L. C. E.; GUALBERTO, S. A.; CRUZ, R. C. D.; CARVALHO, K. S. Atividade larvicida do extrato etanólico da raiz de *Croton linearifolius* sobre *Aedes aegypti*. **Enciclopédia Biosfera**, v. 10, n. 18, p. 442-448, 2014.

POHLIT, A. M.; REZENDE, A. R.; BALDIN, E. L. L.; LOPES, N. P.; NETO, V. F. Plant extract, isolated phytochemicals and plant-derived agents which are lethal to arthropod vectors of human tropical diseases – a review. **Planta Médica**, v. 77, n. 6,

p. 618-630, 2011.

SILVA, S. L. C. E.; GUALBERTO, S. A.; CARVALHO, K. S.; FRIES, D. D. Avaliação da atividade larvicida de extratos obtidos do caule de *Croton linearifolius* Mull. Arg. (Euphorbiaceae) sobre larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae). **Revista Biotemas**, v. 27, n. 2, p. 79-85, 2014.

VASCONCELOS, P. F. C. Emergência do vírus Chikungunya: risco de introdução no Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 5, n. 3, p. 9-10, 2014.

WHO (World Health Organization), 2009. **Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control**. New edition. WHO Library. 147p. Disponível em: http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241547871_eng.pdf. Acesso em: 13 mar. 2015.