

Andrews M Nascimento^{1,2}, Drielle L Almeida^{1,3}, Ewelyne M Lima^{1,4}, Silas N Ronchi^{1,5}, Zilma MA Cruz^{1,6}, Ary G Silva^{1,7}

Risco de morfomutagenicidade e atividade larvívica do óleo essencial de pimenta rosa, *Schinus terebinthifolia* Raddi para *Aedes aegypti* (L.)

Morphomutagenesis risk and larvicide activity of the essential oil of Christmas berry, *Schinus terebinthifolia* Raddi against *Aedes aegypti* (L.)

Resumo O dengue é hoje a principal doença re-emergente e sazonal no mundo. Na ausência de uma vacina preventiva eficaz, de tratamento etiológico e quimioprofilaxia efetivos, o único elo vulnerável para reduzir a sua transmissão é o mosquito *Aedes aegypti*, seu principal vetor. Entretanto, este trabalho avaliou o efeito larvívica do óleo essencial de Aroeira vermelha (*Schinus terebinthifolius*) sobre larvas desse mosquito vetor e conseguinte determinação da CL₅₀ (Concentração letal média) para esta. Para isso, o óleo essencial foi extraído por hidrodestilação em aparelho Clevenger modificado, onde uma vez obtido, foi purificado e disperso em Tween 20 a 0,4% (sistema dispersor). Deste sistema, 10 mL foram direcionados para cada tubo de ensaio nos quais foram distribuídas 10 larvas cada, sendo preparadas oito replicatas com diluições entre 0,1% a 1,0% de concentração do óleo. Avaliou-se também no presente estudo o potencial mutagênico que o óleo essencial pode fazer manifestar em microorganismos, para isso efetuou-se diluições do óleo essencial em caldo nutritivo em que estava presente *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708. Tendo esse microorganismo se desenvolvido na presença do óleo, efetuou-se a semeadura do mesmo em meio de cultura específico para seu crescimento e avaliou-se a morfologia da colônia da bactéria para averiguar possíveis alterações. As leituras dos resultados foram feitas a cada 24 horas, mostrando em 72 horas morte total das larvas, e crescimento das bactérias nos meios específicos, porém não conseguiu-se identificar alterações que denotassem indícios de morfomutagenicidade nas colônias de *Salmonella* e com relação ao ensaio biológico com as larvas não foi possível efetuar a determinação da CL₅₀ neste estudo,

porém os procedimentos para dessa determinação estão em andamento.

Palavras-chaves Dengue; Culicidae, aroeira, controle biológico.

Abstract Dengue is now the main re-emerging and seasonal disease in the world. In the absence of an effective preventive vaccine, of etiologic treatment and of chemoprophylaxis, the only vulnerable link for reducing dengue transmission is the mosquito *Aedes aegypti*, its main vector. Therefore, this study aimed to evaluate the larvicidal effect of the Christmas berry (*Schinus terebinthifolius*) essential on larvae of this mosquito, and determining the median lethal concentration – LC₅₀. The essential oil was extracted by hydrodistillation in a modified Clevenger apparatus, where once obtained, the essential oil was purified and dispersed in a 0.4% solution of Tween 20 as a disperser system. From that solution, 10 mL were assigned to each test tube in which each tube received 10 larvae, and eight replicates prepared with essential oil dilutions from 0.1% to 1.0% concentration of essential oil. In this study the mutagenic potential that the essential oil can manifest in microorganisms, for it has made dilutions of essential oil in nutrient broth was also evaluated, taking *Salmonella choleraesuis* ATCC 10,708 as biological model. That microorganism was grown in the presence of the subminimum inhibitory essential oil concentration, meanwhile, were sown in the same culture medium specific for growth and evaluated the morphology of the colony of bacteria to investigate possible changes, and the induced mutation characterized by the development of lysine decarboxylation Bpositive reaction. The larvae examinations were made every 24 hours, until 72 hours in total death of the larvae, and growth of bacteria in specific media, but failed to identify changes that implied evidence morphomutagenicity in colonies of *Salmonella* and in relation to biological assay with the larvae could not make the determination of LC₅₀ in this study, but the procedures in support of that determination are in process.

Keywords Dengue; Culicidae, peppertree, biological control.

1 Centro Universitário Vila Velha - UVV. Rua Comissário José Dantas de Melo., 21, Boa Vista, Vila Velha, ES. CEP 29101-770

2 andrews_file@hotmail.com

3 driellelima@yahoo.com.br

4 ewelynelima@hotmail.com

5 silas.nasc@hotmail.com

6 Laboratório de Biomarcadores Ambientais e Genotoxicidade.
zilma.cruz@terra.com.br

7 Laboratório de Ecologia Vegetal. arygomes@uvv.br

Introdução

Schinus terebinthifolia Raddi, (Anacardiaceae), popularmente conhecida como aroeira-vermelha é uma árvore de folhas perenes, originária da América do Sul, especialmente do Brasil, Paraguai e Argentina. Possui inflorescências, os frutos são do tipo drupa e têm coloração verde no início e depois, quando maduros, se tornam vermelhos com uma casca seca que se transforma em uma espécie de concha de papel que envolve a semente. A semente é única por fruto, marrom escura e mede cerca de 0,3 milímetros de diâmetro (Degaspari, 2004). É uma espécie dióica com ampla distribuição e grande plasticidade ecológica (Lenzi & Orth, 2004), sendo encontrada também na Europa e nos Everglades norte americanos onde foi introduzida como ornamento e hoje é considerada uma das espécies mais agressivas e invasoras de ambientes (Degaspari, 2005). Sua polinização é feita basicamente por insetos (Lenzi & Orth, 2004).

Este pequeno fruto se inscreve entre as muitas especiarias existentes que são utilizadas essencialmente para acrescentar sabor e refinamento aos pratos da culinária mundial. O sabor suave e levemente picante do fruto da aroeira-vermelha, bem como sua bonita aparência, de uso decorativo permite o seu emprego em diversas preparações, podendo ser utilizados na forma de grãos inteiros ou moídos para confecção de molhos que acompanham as carnes brancas, de aves e peixes, carne de porco, salames, massas, é bastante adequada para combinar com queijos cremosos em entradas por não abafar o seu gosto sutil, e ainda é utilizada para conferir sabores exóticos a bebidas e doces, como coquetéis e chocolate. (Carvalho, 2003).

Apesar da árvore que dá os frutos da aroeira vermelha ser nativa da América tropical, presente especialmente em vários locais do Brasil, ela é exportada da França, onde deu um toque tropical à *nouvelle cuisine*, prato típico francês, e foi por lá rebatizada *poivre rose*, retornando ao Brasil como produto importado (Carvalho, 2003).

Nos frutos de *S. terebinthifolia* o sistema secretor é representado por inúmeras cavidades que ocupam quase todo o mesocarpo. Essas cavidades variam de circulares a ovaladas, tanto em seções transversais quanto longitudinais e ocorrem associadas ao floema (Machado & Carmello-Guerreiro, 2000). Contudo os estudos referem-se, em sua maior parte, aos canais secretores presentes nos órgãos vegetativos por isso as partes utilizadas que apresentam propriedades medicinais são a casca, as folhas e os frutos.

De acordo com senso comum, esta espécie se apresenta como adstringente, antidiarréica, antiinflamatória, depurativa, diurética e febrífuga. Devido à composição de seus óleos essenciais, é usada no tratamento de distúrbios

respiratórios. Popularmente, também é empregada no tratamento da diarreia, inflamações, para promover a transpiração e a eliminação de líquidos. A casca da aroeira tem ação contra febre, hemoptises e afecções uterinas em geral. Da casca extrai-se um óleo empregado contra tumores e doenças da córnea (Degaspari, 2005).

Seu óleo essencial mostrou atividade antimicrobiana devido à presença de diversas substâncias, como a terebinthona, o ácido hidroximasticadienóico, o ácido terebinthifólico e o ácido ursólico que já se demonstraram, *in vitro*, atividade contra *Klebsiella pneumoniae*, *Alcaligenes faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Leuconostoc cremoris*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus vulgaris*, *Clostridium sporogenes*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Escherichia coli*, *Beneckea natriegens*, *Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e várias espécies de fungos (Martinez et al., 1996). Ainda estudos realizados confirmam a atividade antifúngica desse óleo, pois demonstraram resultados positivos para os testes com os fungos de *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. fumigatus* e *Trichoderma* spp. (Siddiqui et al., 2003).

Este trabalho tem por objetivo geral efetuar a extração do óleo essencial provindo dos frutos de *S. terebinthifolia*, fazer uma análise do possível efeito larvicida sobre larvas do mosquito *Aedes aegypti* bem como efetuar a determinação da DL_{50} para estas e investigar uma eventual morfofomutagenicidade em *Salmonella choleraesuis*, considerando a perspectiva de aplicação em escala ambiental de um produto para controlar a proliferação do mosquito da dengue.

Métodos

Extração e purificação do óleo essencial.

Os frutos da aroeira foram colhidos de espécimes ocorrentes na região de Barra do Riacho, no município de Aracruz – ES. Os frutos colhidos foram escolhidos, separando-os de quaisquer impurezas como pedaços de galhos ou folhas.

A extração do óleo essencial foi feita por hidrodestilação em aparelho Clevenger com as sementes trituradas submetidas à uma hora de processo extrativo. A purificação do óleo deu-se por separação do mesmo da água que restou do processo de extração onde se reduziu a temperatura ao ponto de congelamento da água, para que, uma vez solidificado, fosse, o resíduo de água, separado do óleo essencial obtido, que se manteve em fase líquida.

Ensaio biológico com larvas de *Aedes aegypti*.

O Centro de Controle de Zoonoses da Prefeitura de Vitória forneceu os ovos do mosquito *A. aegypti* que

se apresentavam de tamanho muito reduzido e coloração escura, o qual foi submetido a meios necessários para que os mesmos eclodissem e para assim realizar o ensaio biológico com as larvas do referido mosquito.

O desenvolvimento completo do embrião do mosquito se dá em 48 horas, em condições favoráveis de umidade e alta temperatura. Completado o desenvolvimento embrionário, os ovos são capazes de resistir por mais de ano, mesmo longe da água (Silva et al., 2004). Após esse período, se colocado em contato com locais úmidos, pode haver a eclosão. Esta condição permite que os ovos sejam transportados a grandes distâncias, o que o torna o principal meio de proliferação e dispersão do mosquito (Funasa, 2001).

Assim providenciou-se que os ovos fossem submetidos a um meio em que fosse possível a eclosão dos mesmos em larvas. Num período de 24 horas já se notou que havia presente, no recipiente, indivíduos na fase larval que foram alimentados com ração para peixe. Como a duração da fase larval, em condições favoráveis de temperatura (25 a 29°C) e boa alimentação, pode chegar a 10 dias, podendo se prolongar por algumas semanas. Deixou-as nesse meio durante quatro dias para que o crescimento e desenvolvimento do estágio larval chegasse ao terceiro ínstar.

Num primeiro momento preparou-se o sistema em que o óleo fosse dissolvido, para isso fez-se uso de um agente dispersor, Tween 20, na concentração de 0,4% para um litro de solução preparada. De posse do sistema em que óleo pudesse ser disperso montou-se as diluições em oito replicatas para cada, na seguinte seqüência: duas seqüências de tubos controle, onde havia água (Branco 1) e agente dispersante do óleo a 0,4% (Branco 2) respectivamente, e uma seqüência crescente de concentração do óleo essencial, 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4%, 0,5%, 0,6%, 0,7%, 0,8%, 0,9% e 1,0% do óleo presente em 10 mL de solução 0,4 % do agente dispersante.

Após inoculação das larvas na bateria de tubos, elas foram incubadas em temperatura ambiente por 24 horas, para assim fazer a leitura e avaliar a mortalidade das larvas para avaliar o efeito do mesmo sobre a mortalidade das larvas e assim a determinar a CL_{50} .

Ensaio de mutagenicidade em *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708.

Tendo em vista todos os aspectos patogênicos que rondam esse microorganismo, com a ajuda do Centro Tecnológico de Análises (CETAN), adquiriu-se uma amostra de *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708 e efetuou-se de imediato uma replicação para evitar que o microorganismo sofresse mutagênese pelo simples fato de, no meio, possuir muitas colônias.

Colocou-se em incubação em estufa a 35 °C a atmosfera ambiente esperando dois dias para que as colônias crescessem satisfatoriamente. Com o replique feito montou-se o teste de mutagenicidade onde se esterilizou o óleo essencial, filtrando-o em micromembrana.

Para se efetuar as microdiluições esterilizou o óleo essencial, filtrando-o em micromembrana e adicionou-se ao caldo nutritivo um agente dispersor de óleos, o Tween 80, efetuando-se as diluições do óleo nas concentrações de 0,1%, 0,25%, 0,5%, 0,75%, 1,0%, 1,5% e 2,0% , lém de tubos controle, um somente com Tween e outro somente com caldo nutritivo, sem óleo essencial e sem Tween.

Para a inoculação do microorganismo no teste preparou-se uma solução na qual se lançou mão da escala de Mc Farland (escala de concentração celular) para que houvesse uma padronização na quantidade de microorganismos inseridos no teste. Com as diluições preparadas se efetuou a semeadura da *Salmonella* nos meios teste sendo encaminhadas para incubação em estufa a 35° C a atmosfera ambiente. Após 48 horas de incubação efetuou-se a primeira leitura que consistiu em localizar a maior concentração da diluição em que houve crescimento da bactéria.

Posteriormente efetuou-se a semeadura das bactérias que cresceram na maior concentração do óleo em meio de cultura apropriado (Agar XLD), avaliando o aspecto macroscópico da colônia formada para assim determinar se houve ou não mudanças gênicas nos microorganismos testados.

Resultados

Obtenção e purificação do óleo essencial

Os frutos da aroeira foram colhidos de espécimes ocorrentes na região de Barra do Riacho, no município de Aracruz – ES. Após a coleta foi feita a separação física dos grãos de quaisquer impurezas como pedaços de galhos ou folhas.

A extração do óleo essencial se deu por hidrodestilação em aparelho Clevenger com as sementes trituradas submetidos a uma hora de processo extrativo, sendo esse processo efetuado em diversas etapas para que todas as sementes colhidas fossem submetidas ao mesmo processo extrativo resultando num volume de aproximadamente 80 mL de óleo essencial possuindo água residual resultante do processo de volume irrisório. A purificação do óleo deu-se por separação do mesmo da água residual. Para isso se reduziu a temperatura ao ponto de fusão da água, para que, uma vez solidificada, fosse o resíduo de água separado do óleo essencial obtido, que se manteve em fase líquida. Foi obtido um rendimento de 3,2% do processo citado.

Ensaio biológico com larvas de *Aedes aegypti*

Com a montagem do sistema de diluições demonstrado no Quadro 1, inclusão das larvas no dito sistema e tendo transcorridas as 24 horas de teste efetuou-se a leitura onde se constatou que as larvas do controle ainda mantinham-se

não se estabeleceu o que era intencionado no presente estudo, a determinação da DL_{50} do óleo essencial sobre as larvas, porém estudos estão sendo direcionados para a determinação desse índice.

Considerando outros produtos de origem natural, como os taninos, tem sido proposto que substâncias com CL_{50} variando entre 0,1 a 0,49 ppm são bons agentes larvívicos (Silva et al 2004). Entretanto, para óleos essenciais a atividade inibidora tem se manifestado em teores bem diferentes. O óleo essencial de *Pterodon polygalaeiflorus* Benth (Leguminosae), o óleo essencial dos frutos teve uma CL_{50} foi $134,90 \pm 0,25 \mu\text{g/mL}$ (Pimenta et al., 2006)

A resina exsudada por plantas do gênero *Protium* (Burseraceae), que também contém óleos essenciais, é usada dentre outras funções, quando queimada, para repelir insetos. Seu óleo essencial apresenta em sua composição uma predominância de monoterpenos nos frutos e sesquiterpenos nas folhas (Citó et al, 2006; Pontes et al, 2007; Rüdiger, Siani, Veiga Jr, 2007). Entretanto, essa constituição pode variar de acordo com o local, clima e fatores genéticos da planta (Siani et al, 2004). Os monoterpenos apresentam boa atividade larvívica e os sesquiterpenos têm capacidade para inibir a ecdise (Lima et al, 2005).

A inibição da ecdise em larvas de dípteros tem sido freqüentemente relatada para extratos de plantas. Por exemplo, a ação da azadiractina, uma substância extraída de *Azadirachta indica* A. Juss., atua no sistema neurosecretor de *A. aegypti*, promovendo uma alteração dos teores da ecdisona e intervindo, portanto na síntese e liberação do hormônio protoacicotrópico (PPTH) do corpus allatum, que é o responsável pela produção de ecdisona pelas glândulas protorácicas. A azadiractina bloqueia a liberação deste hormônio, o que leva a um aumento de sua concentração dentro do corpus allatum, o que em última análise leva a um efeito *feedback*, juntamente na intervenção na liberação da alotropina pelos corpora cardíacos, interferindo desta maneira nos teores de hormônio juvenil da hemolinfa (Martinez, 2002).

No que diz respeito à pesquisa do efeito morfo-mutagênico, o aspecto macroscópico da colônia formada no meio em que a bactéria foi retirada das diluições do óleo não se apresentou diferente das bactérias originadas do tubo controle, nem quanto à morfologia e nem quanto . Assim, sem a expressão da mutação para o desenvolvimento de superfície rugosa constatado por este teste, deduz-se que os componentes do óleo essencial da pimenta rosa não tem potencial o potencial pesquisado.

Este fato também foi observado por Degáspari (2005) em que a referida bactéria se mostrou um tanto resistente a presença do óleo, onde foi necessária a diluição de uma elevada concentração do mesmo para que houvesse inibição total do seu crescimento.

Agradecimentos

Ao Setor de Controle de Zoonoses da Prefeitura Municipal de Vitória - ES pela ajuda na aquisição dos ovos dos mosquitos, pois sem os mesmos, não realizar-se-ia a presente análise. À FUNADESP pela pelo financiamento da pesquisa.

Referências

- Carvalho PER (2003) **Espécies arbóreas brasileiras**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Colombo: Embrapa Florestas, v. 1, p 1039.
- Citó AMGL, Costa FB, Lopes JAD, Oliveira VM & Chaves MH (2006) Identificação de constituintes voláteis de frutos e folhas de *Protium heptaphyllum* (Aubl) March. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais** 8: 4-7.
- Coêlho AAM (2006) **Análise inseticida de extratos de plantas do bioma Cerrado sobre triatomíneos e larvas de *Aedes aegypti***. Dissertação de Mestrado. Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, DF.
- Degáspari CL, Waszczynskyj N & Prado MRM (2005) Propriedades antimicrobianas dos frutos da aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi). **Ciência e Agrotecnologia** 29: 617-622.
- Funasa (2001) **Dengue: instruções para pessoal de combate ao vetor**; manual de normas técnicas. 3 edição. Brasília: Fundação Nacional de Saúde.
- Lenzi M & Orth AI (2004) Fenologia reprodutiva, morfologia e biologia floral de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae), em restinga da Ilha de Santa Catarina, Brasil. **Biotemas (UFSC)**, 17: 67-89.
- Machado SR & Carmello-Guerreiro SM (2001) Estrutura e desenvolvimento de canais secretores em frutos de *Schinus terebinthifolius* Raddi (ANACARDIACEAE); **Acta Botanica Brasilica** 15: 189-195.
- Martinez SS (2002) **O Nin – *Azadirachta indica***: natureza, usos múltiplos, produção. Londrina: Instituto Agrônômico do Paraná.
- Martinez MJ, Betancourt J, Alonso-Gonzalez N & Jauregui A (1996) Screening of some Cuban medicinal plants for antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology** 5: 171-174.
- Pontes WJT, Oliveira JCG, Câmara CAG, Lopes ACHR, Gondim MCG, Oliveira JV, Barros R & Schwartz MOE (2007) Chemical composition and acaricidal activity of the leaf and fruit essential oils of *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand (Burseraceae). **Acta Amazonica** 37: 103-110.
- Rüdiger AL, Sianib AC & Veiga Jr VF (2007) The chemistry and pharmacology of the South America genus *Protium* Burm. f. (Burseraceae). **Pharmacognosy Reviews** 1: 93-104.
- Siddiqui R, Zunino MP & Zygodlo JA (2003) *Tagetes minuta* and *Schinus areira* essential oils as allelopathic agents. **Biochemical Systematics and Ecology** 31: 563-572.
- Silva HHG, Silva IG, Santos RMG, Rodrigues Filho E & Elias CN (2004) Atividade larvívica de taninos isolados de *Magonia pubescens* St. Hil. (Sapindaceae) sobre *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 37: 396-399.