ATIVIDADE LARVICIDA DO ÓLEO ESSENCIAL *SYZYGium AROMATICUM* (CRAVO-DA-ÍNDIA) FRENTE AO MOSQUITO *Aedes Aegypti* (LINNAEUS, 1762)

ACTIVITY LARVICIDE OF THE ESSENTIAL OIL *SYZYGium AROMATICUM* (CARNIVAL-OF- INDIA) IN FRONT OF THE MOSQUITO *Aedes Aegypti* (LINNAEUS, 1762)

GOMES, Paulo Roberto Barros^{1*}; De OLIVEIRA, Rayone Wesley Santos²; MOUCHREK FILHO, Victor Elias³; Do NASCIMENTO, Alexandre Albuquerque⁴; EVERTON, Adriana Pereira⁵; LOUZEIRO, Hilton Costa⁶; REIS, Jonas Batista⁷; FONTENELE, Maria Alves⁸

^{1,2,3,4,5,7} Universidade Federal do Maranhão, Laboratório de Pesquisa em Óleos Essenciais, Departamento de Tecnologia Química, Av dos Portugueses, 1966, Bacanga, cep 65080-805, São Luís – MA, Brasil

⁶ Universidade Federal do Maranhão, Coordenação de Licenciatura em Ciências Naturais, Pinheiro – MA, Brasil

⁸ Universidade Federal do Maranhão, Coordenação de Engenharia de Alimentos, Imperatriz – MA, Brasil

* Autor correspondente

e-mail: prbgomes@yahoo.com.br

Received 07 August 2017; received in revised form 13 November 2017; accepted 15 November 2017

RESUMO

A dengue, o zika vírus e a chicungunya são doenças transmitida pela picada da fêmea do mosquito *Aedes aegypti* Linn. Por causa disso, essas doenças acarretam um problema de saúde pública, especialmente nos países tropicais. Até o momento presente, não há vacinas específicas que atue contra os diferentes sorotipos da doença. Dessa forma, as medidas adotadas para combatê-la restringem-se no controle do mosquito. Isso é realizado empregando-se larvicida químicos e inseticidas, cujo principal componente são os organofosforado, como Temephos e piretroides. No entanto, o uso frequente desses produtos trouxe ao longo dos anos algumas desvantagens que são: resistência dos mosquitos, contaminação das águas e o ataque a seres vivos não-alvos. Portanto, este trabalho avaliou o potencial larvicida dos botões florais da espécie *Syzygium aromaticum* contra larvas em terceiro estágio do mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762). Para isso, extraiu-se quantitativamente o óleo essencial por hidrodestilação. Determinaram-se as propriedades físico-químicas do óleo essencial (densidade, índice de refração, solubilidade, cor e aparência). Além disso, caracterizou-se quimicamente o óleo, quantificando seus componentes e identificando seu componente majoritário por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. Calculou-se a CL₅₀ do óleo, além do limite de confiança a 95% de probabilidade, a partir dos métodos de Reed-Muench (1938) e Pizzi (1950), respectivamente. O rendimento do óleo foi de 3,54% m/m e 3,63% v/m. Pelo método utilizado foi possível identificar e quantificar os componentes: eugenol (52,53 %), cariofileno (37,25 %), humuleno (4,11 %), acetato de eugenila (4,05 %) e copaeno (2,05 %), sendo o eugenol o componente majoritário do óleo. O óleo exibiu atividade larvicida sendo totalmente letal a uma concentração de 120 µg/mL.

Palavras-chave: *Syzygium aromaticum*, Eugenol, Atividade larvicida, *Aedes aegypti*

ABSTRACT

Dengue, zika virus and chicungunya are diseases transmitted by the bite of the female mosquito *Aedes aegypti* Linn. Because of this, these diseases pose a public health problem, especially in tropical countries. To date, there are no specific vaccines that act against the different serotypes of the disease. In this way, the measures adopted to combat it are restricted in the control of the mosquito. This is done using larvicide chemicals and insecticides, whose main component are organophosphorus, such as Temephos and pyrethroids. However, frequent use of these products has brought over the years some disadvantages: mosquito resistance, water contamination and attack on non-target living beings. Therefore, this work evaluated the larvicidal potential of the flower buds of the *Syzygium aromaticum* species against larvae in the third stage of the *Aedes aegypti* mosquito (Linnaeus, 1762). For this, the essential oil was quantitated by hydrodistillation.

The physicochemical properties of the essential oil (density, refractive index, solubility, color and appearance) were determined. In addition, the oil was characterized chemically, quantifying its components and identifying its major component by gas chromatography coupled to mass spectrometry. The oil LC50 was calculated, in addition to the confidence limit at 95% probability, from the methods of Reed-Muench (1938) and Pizzi (1950), respectively. The yield of oil was 3.54% m / m and 3.63% v / m. Using the method used, it was possible to identify and quantify eugenol (52.53%), caryophyllene (37.25%), humulene (4.11%), eugenyl acetate (4.05%) and copaene (%), With eugenol being the major component of the oil. The oil exhibited larvicidal activity being totally lethal at a concentration of 120 µg / mL.

Keywords: *Syzygium aromaticum*, *Eugenol*, *Activity larvicidal*, *Aedes aegypti*

INTRODUÇÃO

Atualmente, a arbovirose que ameaça a saúde pública, especialmente dos países tropicais, é a dengue. Esta doença é transmitida pela picada da fêmea do mosquito *Aedes aegypti* Linn (Sharp *et al.*, 2014). Além disso, esse mesmo mosquito é vetor de outras, tais como o zika vírus e a chikungunya. (Ministério da Saúde, 2016).

Até o momento presente, não há vacinas específicas que atue contra os diferentes sorotipos da doença. Dessa forma, as medidas adotadas para combatê-la restringe-se no controle do mosquito (Bisset *et al.*, 2011; Coelho 2012). Isso é realizado empregando-se larvicida químicos e inseticidas, cujo principal componente são os organofosforado, como Temephos e piretroides. No entanto, o uso frequente desses produtos trouxe ao longo dos anos algumas desvantagens que são: resistência dos mosquitos, contaminação das águas e o ataque a seres vivos não-alvos (Pocquet *et al.*, 2014; Muhammetoglu *et al.*, 2010).

Segundo Melo-Santos e colaboradores (2010) a resistência da população de mosquitos está relacionada com as atividades de enzimas presentes nas rotas bioquímicas. Nesse estudo, esses autores constataram que o principal caminho para desintoxicação do Temephos é realizado por esterases.

Dessa maneira, é necessário utilizar outras formas que sejam mais eficientes, baixo custo e que provoque menor impacto ambiental. Dentro desta proposição, destacam-se os inseticidas à base de óleos essenciais. Na literatura, observa-se que há uma diversidade de plantas que possuem atividade larvicida frente ao *Aedes aegypti* (Cavalcanti *et al.*, 2004; Costa *et al.*, 2005; Barbosa *et al.*, 2012; Murugan *et al.*, 2012; Warikoo *et al.*, 2012; Fayemiwo *et al.*, 2014; Araújo *et al.*, 2016). Levando-se isso em consideração, este trabalho avalia a atividade

larvicida dos botões florais do *Syzygium aromaticum* (cravo-da-índia).

PARTE EXPERIMENTAL

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Físico-Química do Pavilhão Tecnológico, Núcleo de Imunologia Básica e Aplicada (NIBA) da Universidade Federal do Maranhão (UFMA), Central Analítica da Universidade de Campinas, Central Analítica da UFMA, Núcleo de Combustível, Catálise e Ambiental (NCCA).

Realizou-se o teste de atividade larvicida calculando-se a CL₅₀ segundo o método Reed-Muench (Colegate & Molyneux, 1993).

Obtenção do óleo essencial

Os botões florais do cravo-da-índia foram obtidos em mercados da rede varejista de São Luís. Em seguida, o material selecionado foi condicionado em sacos plásticos devidamente lacrados e guardados em local seco e arejado. Após isso, os botões secos foram triturados no moinho elétrico de facas (TECNAL, modelo TE-340) e o material armazenado em frasco de polietileno para posterior extração do óleo essencial.

Para a extração do óleo essencial, utilizou-se um extrator de Clevenger de vidro acoplado a um balão de fundo redondo de 6000 mL acondicionado em manta elétrica como fonte geradora de calor. A cada rotina de extração do óleo essencial, foram pesados e triturados 68,79g dos botões florais, adicionando-se 200 mL de água destilada. Em seguida a mistura foi colocada em um balão de fundo redondo acoplado ao sistema extrator. A hidrodestilação foi conduzida a 100°C por 5 horas, recolhendo-se o óleo essencial extraído. O óleo foi seco por meio de percolação em sulfato de sódio anidro

(Na₂SO₄). Essas operações foram realizadas em triplicatas e as amostras armazenadas em ampolas de vidro âmbar sob refrigeração de 4°C para evitar possíveis perdas de constituintes voláteis. Posteriormente esses óleos foram submetidos às análises.

O rendimento do óleo essencial foi expresso em porcentagem na relação massa/volume pela medida de densidade. Para realização dessa medida, foi utilizado um picnômetro de 1,0 mL, previamente seco, tarado e aferido, onde se adicionaram as amostras a 25°C, pesando-as em seguida. Após essa etapa, observou-se o volume (mL) de óleo essencial obtido após a extração do óleo por massa (g) de material vegetal, conforme a fórmula descrito pela quarta edição da Farmacopeia Brasileira (1996) e por Fabrowski (2002).

Obtenção e Cultivo das Larvas

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, semipreenchidos com água e um pedaço de madeira de dimensões de aproximadamente 20cmx5cm 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 da madeira 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 litros de água mineral para a eclosão. Após a imersão dos ovos, 0,5g 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 terceiro estágio do desenvolvimento, quando então foram utilizadas nos ensaios de atividade larvicida. Foram necessários de quatro a cinco dias para que as larvas atingissem o tamanho ideal para os ensaios.

As larvas foram identificadas como *Aedes aegypti* por técnicos do Laboratório do Núcleo de

Patologia Tropical e Medicina Social do Departamento de Patologia da Universidade Federal do Maranhão.

Análises Químicas

Para a determinação química do óleo, foi utilizada a análise por meio da cromatografia gasosa contendo uma coluna capilar HP-5MS, 5% difenil, 95% dimetil polisiloxano (30 m x 0,25 mm; 0,25 µm de espessura de filme) com fase estacionária. O cromatógrafo do modelo QP-500 fabricado pela Shimadzu tendo hélio como gás de arraste, com fluxo na coluna de 1 mL.min⁻¹.

Para as análises, foram injetadas alíquotas de 0,3 µL da amostra diluída (1,0 mg do óleo em 1000 µL de diclorometano com pureza de 99,9 %), fixando-se as seguintes condições: temperatura do injetor em 280°C; split de 1:10; programação de temperatura do forno de 40°C (5,0 min.) a 240°C (com taxa de aquecimento de 4°C/min.) e de 240 a 300°C (com taxa de aquecimento de 8°C/min., 7,5 min.).

No Espectrômetro de Massas do tipo quadrupolo linear o modo de varredura foi de 0,5 seg/scan, a faixa de varredura variou de 40 a 500 Daltons cada uma, a linha de transferência foi de 280°C e o filamento desligado em 0,0 a 4,0 min.

Determinação pelo método de normalização

A determinação da concentração do eugenol e dos demais componentes do óleo essencial por esse método foi obtida através da integração eletrônica das áreas dos picos cromatográficos, utilizando o programa AMDIS (*Automated Mass Spectral Deconvolution Mass & Identification System*): Programa utilizado para a interpretação dos espectros de massas quando havia diferenças significativas entre o espectro de massas obtido e o encontrado na biblioteca do CG/EM.

Teste de Toxicidade

Para a realização do teste de toxicidade, as larvas selecionadas no terceiro estágio foram transferidas para um béquer contendo 20 mL de água mineral com temperatura de 26 a 28°C. Dez larvas foram capturadas utilizando-se pipeta Pasteur. Cada teste foi feito em triplicata para cada concentração testada. Os controles positivos foram realizados com o organofosforado temephos em larvas do *Aedes aegypti*, na concentração utilizada pela Vigilância Sanitária que é de 100 mg/L. Os controles negativos foram realizados com 20 mL de água

mineral (26-28°C) contendo 0,04% de Tween 80 (tensoativo hidrofílico que facilita a aplicação em emulsões do tipo óleo em água). As larvas foram expostas às soluções por 24 horas, sendo monitoradas de hora em hora. Ao fim dos períodos registrou-se a mortalidade.

Para o preparo da solução teste, pesou-se 20 mg do óleo essencial em um recipiente (do tipo eppendorf), para cada mililitro da solução teste e, em seguida, foi adicionada uma gota de solvente do tipo Tween 80 sobre o óleo, fazendo-se então a homogeneização. A seguir, utilizando-se uma pipeta automática, foi adicionado um mililitro de água destilada fazendo-se nova homogeneização.

Esta solução foi então transferida para o béquer contendo as larvas separadas para o teste, de acordo com as concentrações pré-estabelecidas.

Análise Estatística

Após os testes, montou-se uma tabela com os valores das seis concentrações, logaritmo das mesmas, o número de larvas mortas após 24 horas (média dos cinco pontos), número de larvas vivas após 24 horas (média dos cinco pontos), o acumulado de mortos (soma das células de mortos abaixo) e o acumulado de vivos (soma das células de vivos acima).

A análise estatística dos dados foi realizada de acordo com o método de Reed & Muench (1938), o qual parte do princípio de que um animal que sobreviva a certa dose, também irá sobreviver em qualquer outra dose menor que aquela, conseqüentemente, o animal que morrer com certa dose, também irá morrer em doses maiores que aquela. A partir de uma tabela contendo os dados de mortalidade para cada concentração testada, é construído um 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 & Molyneux, 1993).

O intervalo de confiança foi calculado segundo o método de Pizzi (1950) no qual se constrói um gráfico do percentual de mortos *versus* logaritmo (log) da dose. A seguir determina-se o valor de "R", que é a diferença entre o log da dose que mata 75% das larvas e o log da dose que mata 25% das larvas. Calcula-se também a variável "h" que consiste na média das

diferenças dos valores de log das doses. Com esses dados determina-se o log do erro padrão (SE), através da seguinte fórmula: $(SE)^2 = 0,79 \times h \times R/20$. Finalmente, o valor do intervalo de confiança é igual 2×10^{SE} .

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliação do rendimento dos óleos essenciais

A determinação das condições de extração de óleos voláteis é uma etapa muito importante por ser um fator determinante na relação entre a composição química e a qualidade do óleo extraído (Gomes *et al.*, 2016). Segundo Mouchrek Filho (2000), o tempo de extração do óleo essencial é um dos principais parâmetros físico-químicos da indústria de essências, no que se refere à qualidade e à natureza econômica. Por isso, há dois tipos de destilação: a rápida que conduz a um produto com constituintes mais voláteis, porém destituído das melhores características, e a lenta que conduz a uma extração que encarece o produto e também pode sobrecarregá-lo de compostos de aromas indesejáveis (Chaar, 2000).

O trabalho de extração do óleo essencial estudado foi realizado em 5 horas, para a massa de 68,79 g/amostra a 100°C.

Os parâmetros físico-químicos do óleo essencial dos botões florais do *Syzygium aromaticum* estão expostos na Tabela 1.

Tabela 1. Propriedades físicas do óleo essencial extraído dos botões florais do *Syzygium aromaticum*

Propriedades Físico-químicas	Óleo essencial
Densidade(g/mL)	0,973
Solubilidade em álcool 90%	1:2
Índice de refração (N _D 25°)	1,526
Rendimento (m/m%)	3,54
Rendimento (v/m%)	3,63
Cor	Transparente
Aparência	Límpido

O óleo essencial apresentou valor de densidade de 0,973 g/mL, a maioria dos óleos essenciais apresentam valores de densidade menores do que 1, sendo normalmente a fase superior quando em contato com água. Quanto à solubilidade, o óleo mostrou-se solúvel em uma

solução de etanol a 90% na proporção de 1 parte de óleo para 2 de solução alcoólica.

O óleo de cravo-da-índia apresentou nos parâmetros físico-químicos analisados um índice de refração (ND 25°) de 1,526. Esse valor é coerente com valores encontrados na literatura. Sulieman *et al.* (2007), determinou o índice de refração de 1,531 para o óleo do cravo. Reis (2006) investigando o óleo de cravo extraído dos talos e frutos secos do cravo da índia, relatou um índice de refração 1,523 e 1,525 respectivamente. Além do valor encontrado na pesquisa se mostrar bem próximo dos encontrados na literatura, ele se mostra ainda muito próximo do índice de refração citado para o padrão de eugenol que é de 1,541 (Aldrich, 2001). O eugenol é tido como componente majoritário do óleo do cravo, por isso a proximidade dos valores.

O óleo apresentou-se transparente logo após ser extraído, tornando-se levemente amarelado com o passar do tempo. Sua aparência foi límpida, não sendo observada nenhuma presença de impureza ou particulado. O seu odor foi característico do cravo-da-índia, sendo o odor idêntico ao do eugenol puro, seu componente majoritário.

O rendimento da extração foi calculado diante da quantidade de óleo que se obteve a partir de uma determinada massa vegetal. Nesse experimento partiu-se de uma massa de 68,79 g dos botões florais do cravo da índia e obteve-se 2,5 mL de óleo essencial em cada extração dessa forma o rendimento (% v/m) foi de 3,63 %. Como a densidade do óleo foi determinada em 0,973 g.mL⁻¹, rendimento (% m/m) foi de 3,54 %. Segundo Simões *et al.* (2007), a composição do óleo essencial de uma planta é determinada geneticamente, sendo, geralmente, específica para um determinado órgão e característica para o seu desenvolvimento, mas as condições ambientais são capazes de causar variações significativas. Silvestri *et al.* (2010), encontrou rendimento de 1,87% (v/m), já Lee & Shibamoto (2001) e Raina *et al.* (2001), obtiveram rendimentos de 2,75% (m/m) e 4,8% (v/m) respectivamente.

Avaliação das características químicas dos óleos essenciais obtidas por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectroscopia de Massas (CG-EM)

Os resultados desse estudo são

mostrados na Figura 1. O óleo essencial em estudo apresentou cinco picos cromatográficos, sendo que o pico cromatográfico 1 é o Eugenol, cujo tempo de retenção foi 27,40 min; o pico cromatográfico 2 é o Copaeno, com tempo de retenção 27,99 min; o pico cromatográfico 3 é o Cariofileno, o qual apresentou o tempo de retenção 29,47; o pico cromatográfico 4 é o Humuleno, cujo tempo de retenção foi 30,57 min; o pico cromatográfico 5 é o Acetato de Eugenila, com tempo de retenção 32,94 min.

A Tabela 2 mostra a identificação de cada pico apresentados na Figura 1, assim como o seu Tempo de retenção (T_r) na coluna e o respectivo teor na mistura de óleos essenciais, sendo que a quantificação dos cinco picos cromatográficos foi determinada pelo método de normalização (integração da área do pico correspondente). Nota-se que o eugenol e o cariofileno são os componentes majoritários, pois os mesmos estão presentes em, respectivamente 52,53% e 37,25%.

Tabela 2. Composição química dos botões florais *Syzygium aromaticum*

Pico	T _r (min)	Substância identificada	Teor (%)
1	27,40	Eugenol	52,53
2	27,99	Copaeno	2,05
3	29,47	Cariofileno	37,25
4	30,57	Humuleno	4,11
5	32,94	Acetato de Eugenila	4,05

Um comparativo mostrado na tabela 3 entre óleos essenciais extraídos de *Syzygium aromaticum* em diferentes trabalhos ilustra essas diferenças.

Os óleos 1,2,3 e 4 foram obtidos pelo método da hidrodestilação, o óleo 5 por destilação por arraste de vapor e o óleo 6 de uma amostra comercial.

Na literatura o eugenol é sempre apresentado como componente majoritário do óleo de cravo. Seu teor varia muito de um óleo para outro e os teores dos componentes minoritários também.

Atividade Larvicida

A atividade larvicida do óleo essencial extraído da espécie *Syzygium aromaticum* (cravo-da-índia) foi testada em seis concentrações diferentes: 20, 50, 70, 90, 100 e 120 µg/mL, sendo n é o número de larvas do mosquito *Aedes aegypti* utilizadas no ensaio larvicida para cada concentração (totalizando 10 larvas por ensaio).

Para cada concentração os testes foram realizados em triplicata. 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 seis concentrações testadas (Tabela 4).

De acordo com a Tabela 4, a concentração de 20 µg/mL do óleo essencial do *Syzygium aromaticum* apresentou a menor atividade larvicida, matando, em média, duas larvas, o que corresponde a 20% de mortalidade. A partir da concentração de 70µg/mL do óleo essencial a atividade larvicida foi constante, provocando a morte de 100% dos indivíduos testados, ou seja, 10 larvas.

A taxa de percentagem da mortalidade das larvas frente o óleo é mostrada na Figura 2, mostrando-se constante a partir do Log dose 1,8451 (concentração 70 µg/mL).

A Figura 3, mostra que a Concentração Letal 50% (CL₅₀), concentração na qual cinquenta por cento das larvas testadas morrem, foi encontrada próxima ao Log dose 1,69 (abaixo da concentração de 50µg/mL). De acordo com Cheng *et al.* (2003) valores de CL₅₀<100 µg/mL são considerados ativos.

A dose letal 50% para o óleo essencial do cravo-da-índia foi calculada através da intersecção das curvas de indivíduos acumulados mortos e indivíduos acumulados vivos da Figura 3, tendo como resultado a concentração de 38,86 µg/mL com um intervalo de confiança de 2,25 µg/mL.

Logo a atividade larvicida do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* não foi de todo uma surpresa, pois encontra-se na literatura vários trabalhos sobre o potencial biológico desse óleo contra insetos e outros organismos. Segundo Shapiro (2012), o óleo de cravo tem sido estudado por suas propriedades antibacteriana, antimicrobiana e antifúngica contra manifestações cutâneas infecciosas, antiinflamatórias, repelentes, citotoxicidade

contra insetos, anestésicas entre outras além de ter demonstrado ser ambientalmente seguro e não tóxico para os seres humanos, para uso em medicina, perfume e aromas alimentares.

De acordo com Chaieb *et al* (2007), a atividade biológica do óleo de *Eugenia caryophyllata* (outro nome de *Syzygium aromaticum*) foi investigada contra diversos parasitas. Foi mostrado que o óleo tem atividade contra larvas de *Culex pipiens*, atividade inseticida contra *Pediculus capitis* e mosquitos *Dirus anopheles*. Iniang & Emosairue (2005 apud Lucca, 2009), estudando a atividade repelente de extratos aquosos de plantas sobre moleque-da-bananeira (*Cosmopolites sordidus* Germar) obtiveram para cravo-da-índia e pimenta dióica um nível de repelência de 60 a 80%. Segundo os autores esse efeito repelente do cravo-da-índia estaria relacionado com sua característica pungente, que sugere uma ação fumegante contra insetos.

Dayan *et al.* (2009), citam o cravo da índia como inseticida eficaz sobre pragas de artrópodes, pulgões, ácaros entre outros. Um estudo de Bhat & Kempraj (2009), confirmou o potencial biocida do óleo essencial das folhas de *S. aromaticum* contra o *Aedes albopictus*. Dessa forma o óleo de cravo é usado na agricultura orgânica como uma alternativa para os métodos de agricultura não-orgânicos. Pois acredita-se ser o óleo de cravo um biopesticida mais seguro do que os pesticidas químicos (Shapiro, 2011).

Óleos essenciais de plantas em geral, têm sido reconhecidos como importantes recursos naturais de inseticidas. Sua natureza lipofílica facilita-lhes interferir com funções metabólicas, bioquímicas, fisiológicas e comportamentais dos insetos, sendo geralmente pesticidas ecologicamente menos agressivos e seguros para os seres humanos e outros mamíferos (Prajapati, 2005).

No entanto, segundo Lahlou (2004), a atividade biológica de óleos essenciais está diretamente relacionada com sua composição química. Essa relação de composição e atividade, muitas vezes sugere que a atividade biológica de um óleo pode ser atribuída tanto a seus componentes majoritários, quanto a componentes presentes em menor concentração. É possível que eles ajam em conjunto sinergicamente, contribuindo para toxicidade total do óleo testado. Nesse trabalho o componente majoritário foi identificado como sendo o Eugenol com (52,53%), segundo a literatura (Brewer,

2011), os principais componentes do óleo essencial de cravo são fenilpropanóides tais como eugenol, carvacrol, timol, e cinamaldeído. O cravo também contém uma variedade de compostos não voláteis (taninos, esteróis, flavonoides e triterpenos). Algumas dessas substâncias como terpenos e fenilpropanóides voláteis sintetizados por espécies vegetais podem ter, dependendo do inseto em análise, propriedades atrativas (alimentação, polinização) e/ou inseticidas (Simas *et al.*, 2004).

O eugenol pertence à classe dos fenóis e também é classificado como fenilpropanóide. Encontra-se na literatura relatos sobre a atividade larvica desses compostos. Segundo (Simas *et al.*, 2004), os fenilpropanóides safrol, eugenol e aldeído cinâmico foram ativos contra larvas do *Aedes aegypti* com CL₅₀ de 49,0; 44,5 e 24,4 ppm, respectivamente. O eugenol e outros compostos das folhas de *Cinnamomum osmophloeum* mostraram ainda uma forte atividade contra cupins (*Coptotermes formosanus*). Possui também atividade inseticida comprovada contra espécies de besouros *Sitophilus zeamais* e *Tribolium castaneum* (Huang *et al.*, 2002).

Em um estudo da ação larvica de óleos contendo limoneno, linalol e eugenol frente ao mosquito *Aedes aegypti*, Furtado *et al.* (2005) confirmaram atividade larvica para esses compostos e segundo os autores os óleos apresentaram melhores atividades que os padrões testados isoladamente (como ocorreu no presente trabalho). Ainda segundo eles há a possibilidade de outros compostos serem responsáveis pela atividade larvica do óleo essencial ou ainda a existência de um sinergismo entre o composto majoritário e outro(s) componente(s) do óleo, existentes em menor fração.

Esse tipo de comportamento de óleos essenciais já foi relatado em outros trabalhos. Em estudo de Gillij *et al.* (2008), com atividade repelente de óleos essenciais, o autor sugere que fenômenos sinérgicos entre os diversos componentes dos óleos essenciais podem resultar em uma maior bioatividade (um aumento de resposta repelente) do óleo como um todo em relação aos seus componentes isolados.

Geralmente se atribui o potencial biológico ao componente majoritário. Logo, o efeito sinérgico no óleo em questão não é responsável por conferir a atividade larvica, mas sim potencializa essa atividade. Outras

substâncias presentes em menor quantidade no óleo também possuem atividade contra insetos, o sesquiterpeno β -cariofileno é citado como um forte repelente contra o *Aedes aegypti* (Gillij *et al.*, 2008).

Em trabalho de Simas *et al.* (2004), o autor destaca a importância da lipofilicidade de terpenos para a atividade larvica em *Aedes aegypti*, quando se compararam monoterpenos e sesquiterpenos de estruturas correlatas. Também foi observada a menor atividade de fenilpropanóides contendo núcleos benzênicos que possuem substituintes nucleofílicos, como hidroxila, metoxila e benzodioxola.

O número de ligações duplas conjugadas parecem contribuir para um aumento na potência, já que compostos aromáticos, tais como, timol, carvacrol, e eugenol apresentam potencial larvica mais elevado do que a carvona (Santos *et al.*, 2011).

De acordo com Rattan (2010), os óleos essenciais e seus constituintes afetam os processos bioquímicos, que especificamente perturbam o equilíbrio endócrino dos insetos. Eles podem ser neurotóxicos ou podem atuar como reguladores de crescimento de inseto, interrompendo o processo normal de morfogênese. Esse modo de ação neurotóxica possui os seguintes sintomas em artrópodes: hiperatividade seguido por hiperexcitação levando rapidamente à queda e imobilização.

CONCLUSÕES:

No presente estudo as constantes físicas do óleo essencial do Cravo-da-Índia (*Syzygium aromaticum*), apresentaram resultados satisfatórios no que se diz respeito à avaliação da qualidade do óleo extraído; A identificação positiva do eugenol no óleo essencial foi realizada utilizando-se as técnicas de Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas, baseado nos seus tempos de retenção comparados com seus padrões e aos seus fragmentos de massas, nas mesmas condições de análises; A quantificação por normalização dos componentes do óleo essencial por cromatografia gasosa mostrou que o eugenol apresentou-se como componente majoritário apresentando um teor de 52,53%. A letalidade larval causada pelo óleo ocorreu na primeira hora de teste com a dose 120 μ g/mL, acusando uma mortalidade de 60% $\pm$ 0,3 e uma

CL₅₀ de 38,86 µg/mL; tornando-se crescente ao final de 24 horas de monitoramento.

AGRADECIMENTOS:

Os autores agradecem à Fundação Sausândrade, Capes e o CNPq por fomentar esta pesquisa.

REFERÊNCIAS:

1. Aldrich ; Handbook of fine chemicals and laboratory equipment; Brasil, **2001**.
2. Alma, M. H.; Ertas, M.; Nitz, S.; Kollmannsberger, H.; BioResources. **2007**, 2(2), 265.
3. Araújo, A.F.O.; Paes, J.T.R.; De Deus, J.T.; Cavalcanti, S.C.H.; Nunes, R.S.; Alves, P.B.; Macoris, M.L.G.; Mem. Inst. Oswaldo Cruz. **2016**, 11.
4. Barbosa, J.D.; Silva, V.B.; Alves, P.B.; Gumina, G.; Santos, R.L.; Sousa, D.P.; Pest Manag Sci. **2012**, 68(11), 1478-83.
5. Bhat, S. K.; Kempuraj, V.; African Journal of Biotechnology. **2009**, 8(24), 6933.
6. Bisset, J.A.; Rodríguez, M.M.; Ricardo, Y.; Ranson, H.; Perez, O.; Moya, M.; Med Vet Entomol. **2011**, 25, 233.
7. Brewer, M. S.; Compr Rev Food Sci Food Saf. **2011**, 10, 221.
8. Cavalcanti, E.S.B.; de Moraes, S.M.; Lima, M.A.A.; Santana, E.W.P.; Mem Inst Oswaldo Cruz. **2004**, 99(5), 541.
9. Chaar, J. S. Tese de Doutorado em Química, Universidade Federal de São Carlos, Brasil, **2000**.
10. Chaieb, K.; Hajlaoui, H.; Zmantar, T.; Kahla-Nakbi, A. B.; Rouabhia, M.; Mahdouani, K.; Bakhrouf, A.; Phytother Res. **2007**, 21, 501.
11. Cheng, S.S.; Changa, H.T.; Chang, S.T.; Tsai, K.H.; Chen, W.J.; Bioresource Technology. **2003**, 89, 99.
12. Coelho, G.E.; Rev Inst Med Trop Sao Paulo. **2012**, 54(Suppl. 18), S13-4.
13. Colegate, S. M. & Molyneux, R. J. Bioactive Natural Products: Detection, Isolation, and Structural Determination. Boca Raton: CRC Press, **1993**. 544 p
14. Costa, J.G.M.; Rodrigues, F.F.G.; Angélico, E.C.; Silva, M.R.; Mota, M.L.; Santos, N.K.A.; Rev Bras Farmacogn. **2005**, 15(4), 304-9.
15. Dayan, F. E.; Cantrell, C. L.; Duke, S. O. Bioorg Med Chem. **2009**, 17, 4022.
16. Fabrowski, F. J. R. T. Tese de Doutorado em Engenharia Florestal, Universidade Federal do Paraná, Brasil, **2002**.
17. Farmacopeia Brasileira IV – Parte 1. 4. ed. São Paulo: Editora Atheneu, **1996**, 1.320p.
18. Fayemiwo, K.A.; Adeleke, M.A.; Okoro, O.P.; Awojide, S.H.; Awoniyi, I.O.; Asian Pac J Trop Biomed. **2014**, 4(1), 30-4.
19. Fichi, G.; Flamini, G.; Giovanelli, F.; Otranto, D.; Perrucci, S.; Experimental Parasitology. **2007**, 115, 168.
20. Furtado, R.F.; Lima, M.G.A.; Andrade Neto, M.; Bezerra, J.N.S.; Silva, M.G.; Neotrop Entomol. **2005**, 34 (5), 843.
21. Gillij, Y.G.; Gleiser, R.M.; Zygodlo, J.A.; Biores Technol. **2008**, 99, 25078.
22. Gomes, P.R.B.; Silva, A.L.S.; Pinheiro, H.A.; Carvalho, L.L.; Lima, H.S.; Silva, E.F.; Silva, R.P.; Louzeiro, C.H.; Oliveira, M.B.; Filho, V.E.M.; Rev. Bras. Plantas Med. **2016**, 18(2 supl.1), 597.
23. Huang, Y.; Ho, S. H.; Lee, H. C.; Yap, Y. L.; J Stored Prod Res. **2002**, 38, 403.
24. Lahlou, M.; Phytother Res. **2004**, 18, 435.
25. Lee, K. G.; Shibamoto, T.; Food Chemistry. **2001**, 74, 443.
26. Lucca, P. S. R. Dissertação de Mestrado em Engenharia Agrícola, Unioeste, Brasil, **2009**.
27. Melo-Santos, M.A.V.; Varjal-Melo, J.J.M.; Araújo, A.P.; Gomes, T.C.S.; Paiva, M.H.S.; Regis, L.N.; Acta Trop. **2010**, 113(2), 180-9.
28. Ministério da Saúde. Dengue, Zica, Chikungunya: Prevenção e Combate. **2016**.

29. Mouchrek Filho, V.E. Tese de Doutorado em Química, Universidade Federal de São Carlos, Brasil, **2000**.
30. Muhammetoglu, A; Durmaz, S; Uslu, B; Environ Forensics. **2010**, 11, 179-86.
31. Murugan, K; Kumar, P.M; Kovendan, K; Amerasan, D; Subrmaniam, J; Hwang, J.S.; Parasitol Res. **2012**, 111(4), 1757-69.
32. Oliveira, R. A.; Reis, T. V.; Sacramento, C. K.; Duarte, L. P.; Oliveira, F. F.; Rev bras farmacogn. **2009**, 19(3), 771.
33. Pizzi, M; Human Biology. **1950**, 22, 151.
34. Pocquet, N; Darriet, F; Zumbo, B; Milesi, P; Thiria, J; Bernard, V; Parasit Vectors. **2014**, 7, 299.
35. Prajapati, V.; Tripathi, A. K.; Aggarwal, K.K.; Khanuja, S.P.S.; Biores Technol. **2005**, 96, 1749.
36. Raina, V. K.; Srivastava, S. K.; Aggarwal, K. K.; Syamasundar, K. V.; Kumar, S.; Flavour and fragrance jornal. **2001**, 16, 334.
37. Rattan, R. S.; Crop Protection. **2010**, 29, 913.
38. Reed L.J & Muench H; Am J Hyg. **1938**, 27(3), 493-497.
39. Reis, T. V. XLVI Congresso Brasileiro De Química, Associação Brasileira De Química, Salvador, Brasil, **2006**.
40. Santos, S. R. L.; Melo, M. A.; Cardoso, A. V.; Roseli L.C. Santos, R.L. C.; Sousa, D. P.; Cavalcanti, S. C. H.; Chemosphere. **2011**, 84, 150.
41. Shapiro, R.; J. Pediatr Nurs. **2012**, 27, 4, 346.
42. Sharp, T.M; Mackay, A.J; Santiago G.A; Hunsperger, E; Nilles E.J; Perez-Padilla, J.; PLoS ONE. **2014**, 9(9), e108445.
43. Silvestri, J. D. F.; Paroul, N.; Czyewski, E.; Lerin, L.; Rotava, I.; Cansian, R. L.; Mossi, A.; Toniazzo, G.; Oliveira, D.; Treichel, H.; Rev Ceres, Viçosa. **2010**, 57, 589.
44. Simas, N. K.; Lima, E. C.; Conceição, S. R.; Kuster, R. M.; Oliveira Filho, A. M.; Lage, C. L. S.; Quim Nova. **2004**, 27(1), 46.
45. Simões, C. M. O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; Mello, J.C.P.; De Petrovick, L.A.; Farmacognosia: da planta ao medicamento; Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil, **2007**.
46. Sulieman, A. M. E.; El Bosra, I. M. O.; El Khalifa, E. A. A; Res Journal of microbiology. **2007**, 3, 266.
47. Warikoo, R; Ray, A; Sandhu, J.K; Samal, R; Wahab, N; Kumar, S.; Asian Pac J Trop Biomed. **2012**, 2(2), 152.

Figura 1. Cromatograma do óleo essencial do cravo da Índia.

Tabela 3. Comparativo da composição química de diferentes óleos do *Syzygium aromaticum*

Trabalhos	Eugenol (%)	Cariofileno (%)	Humuleno (%)	Acetato de Eugenila (%)	Copaeno (%)
Proposto	52,53	37,25	4,11	4,05	2,05
Óleo 1	88,38	0,64	-	10,98	-
Óleo 2	90,3	4,83	-	1,87	-
Óleo 3	94,41	2,91	0,36	-	0,04
Óleo 4	88,58	1,38	0,19	5,62	-
Óleo 5	87,00	3,56	0,40	8,01	0,10
Óleo 6	59,3	24,9	2,8	4,2	1,2

Óleo 1 (Oliveira *et al.*, 2009); Óleo 2 (Silvestri *et al.*, 2010); Óleo 3 (Raina *et al.*, 2001); Óleo 4 (Chaieb *et al.*, 2007); Óleo 5 (Alma *et al.*, 2007); Óleo 6 (Fichi *et al.*, 2007)

Tabela 4. Mortalidade das larvas do mosquito *Aedes aegypti* após 24 horas de exposição em várias concentrações do óleo essencial *Syzygium aromaticum*

Dose, $\mu\text{g mL}^{-1}$	Log dose	Mortos	Vivos	Acumulados mortos	Acumulados vivos	Mortalidade e%
120	2,0791	10	0	48	0	100
100	2,0000	10	0	38	0	100
90	1,9542	10	0	28	0	100
70	1,8451	10	0	18	0	100
50	1,6989	6	4	8	4	60
20	1,3010	2	8	2	12	20

Número de larvas (n=10)

Figura 2. Taxa de mortalidade das larvas do mosquito *Aedes aegypti* – expostas a seis concentrações diferentes do óleo essencial do *Syzygium aromaticum* (cravo-da-índia), após 24 horas – versus o logaritmo de cada dose aplicada

Figura 3. Estimativa da CL_{50} do óleo essencial do *Syzygium aromaticum* pelo método Reed-Muench a partir do acumulado de larvas mortas e vivas em função do logaritmo decimal da dose aplicada. A CL_{50} é o ponto de intersecção das duas curvas.