

## **EFEITO DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE MENTHA PULEGIUM E FOENICULUM VULGARE SOBRE AEDES AEGYPTI (LINNAEUS, 1762)**

ROCHA, D. K.<sup>1,3</sup>; MATOS, O.C.<sup>2,3</sup>; CABRAL, M.D.<sup>4</sup> & NOVO, M.T.<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Higiene e Medicina Tropical, UNL, Lisboa

[diara@ihmt.unl.pt](mailto:diara@ihmt.unl.pt); [tenovo@ihmt.unl.pt](mailto:tenovo@ihmt.unl.pt)

<sup>2</sup> Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, INIAV. Oeiras

[oliviamatos@sapo.pt](mailto:oliviamatos@sapo.pt)

<sup>3</sup> Unidade de Parasitologia e Microbiologia Médicas, IHMT. Lisboa

<sup>4</sup> UniCV, Campus Palmarejo. Praia

[marilena.cabral@docente.unicv.edu.cv](mailto:marilena.cabral@docente.unicv.edu.cv)

### **Resumo**

A dengue é uma arbovirose potencialmente fatal transmitida por mosquitos, com 50 milhões de casos anuais e 2,5 mil milhões de pessoas em risco nas regiões tropicais e subtropicais. Em 2009 foi declarada a primeira epidemia de dengue em Cabo Verde, com 21313 casos.

Não existindo tratamento específico ou vacina para esta arbovirose, o controlo do vetor *Aedes aegypti* é uma das principais medidas para prevenir ou reduzir a transmissão do vírus.

Como medida a ser aplicada numa luta integrada, ressurgiu a utilização de substâncias de origem vegetal, que têm como vantagens o facto de se decomporem facilmente, possuírem baixa ou nenhuma toxicidade para humanos e animais e terem reduzido impacto ambiental.

Assim, no presente trabalho pretende-se avaliar os efeitos inseticidas de plantas de regiões geoclimáticas diferentes, com vista ao seu uso no controlo do mosquito vetor do vírus da dengue.

Para esse fim procedeu-se à colheita de *Mentha pulegium* e *Foeniculum vulgare* nas ilhas de Santiago e Santo Antão, a partir das quais se procedeu à obtenção dos óleos essenciais, inseticidas, por hidrodestilação, em aparelho Clevenger modificado. Procedeu-se a ensaios biológicos utilizando protocolos de sensibilidade a tendo os óleos essenciais de funcho e poejo apresentado efeitos larvicidas bastante promissores em *Ae. aegypti*.

**Palavras-chave** - *Aedes aegypti*, dengue, controlo vetorial, plantas aromáticas.

\*

### **INTRODUÇÃO**

Os mosquitos são vetores de doenças tais como malária, filariose linfática, dengue e febre-amarela, entre outras arboviroses (James, 1992; Gubler, 1998; Almeida, 2011). Estas doenças causam elevados níveis de mortalidade e/ou morbilidade, particularmente em países de regiões tropicais e subtropicais, onde são mais prevalentes, com consequentes impactos socio- económicos (Fradin & Day, 2002).

A dengue, conhecida como a “febre de quebra ossos” é uma doença infecciosa febril aguda, que pode ser de evolução benigna ou grave, dependendo da forma como se apresente: infeção inaparente, dengue clássica (DC), febre hemorrágica da dengue (FHD) ou síndrome de choque da dengue (SCD). O agente causal é um arbovírus do género *Flavivirus*, pertencente à família Flaviviridae, sendo conhecidos quatro serotipos: DEN1, DEN2, DEN3 e DEN4.

A DC, em geral, inicia-se abruptamente com febre alta (39°C a 40°C), seguida de cefaleia, mialgia, prostração, artralgia, anorexia, astenia, dor retro-orbitária, náuseas, vômitos, exantema, prurido cutâneo, hepatomegalia (ocasional) e dor abdominal generalizada (principalmente em crianças). Pequenas manifestações hemorrágicas (petéquias, epistaxe, gengivorragia, sangramento gastrointestinal, hematúria e metrorragia) podem ocorrer. A sua duração é de cerca de 5 a 7 dias, ocorrendo regressão dos sinais e sintomas mas podendo persistir a fadiga, [Ministério da Saúde (Brasil), 2006].

A transmissão é feita através da picada de mosquitos fêmea, principalmente da espécie *Aedes aegypti*, no ciclo humano-*Aedes aegypti*-humano. Após uma refeição de sangue infetado, o mosquito está apto a transmitir o vírus após 8 a 12 dias de incubação extrínseca. A transmissão mecânica também é possível, quando uma refeição infetante é interrompida e o mosquito se alimenta imediatamente num outro hospedeiro suscetível próximo. Não ocorre transmissão por contato com um doente, sendo esta, no entanto, possível através de transfusões sanguíneas ou transplante de órgãos.

*Aedes aegypti* (Fig. 1) é um mosquito de elevada capacidade invasora e importância médica, sendo o mais competente vetor da febre-amarela, do dengue.



**Figura 1** - *Aedes aegypti* macho, fêmea e larva do 3º estadio [Diara Rocha].

Não existindo tratamento específico (drogas antivirais) ou vacina para esta arbovirose, as medidas de controlo concentram-se no vetor *Aedes aegypti*, quer através de proteção individual contra as picadas quer através de combate à população vetora. Este deve consistir em ações contínuas de vigilância de potenciais locais de criação, com particular incidência nos domésticos e peridomésticos, com eliminação e tratamento de criadouros, sendo prioritárias atividades de educação para a saúde e mobilização social. O objetivo das ações de rotina é manter a densidade da população do vetor em níveis reduzidos, incompatíveis com a transmissão da doença. Em caso de epidemia, a utilização de adulticidas poderá ainda ser fundamental.

A resistência aos inseticidas tem-se vindo a desenvolver na maioria dos insetos, nomeadamente nos vetores de agentes patogénicos. Em 1992, a lista de espécies vetores resistentes a inseticidas incluía 56 mosquitos anofelíneos e 39 mosquitos culicíneos, piolhos, percevejos, triatomíneos, oito espécies de pulgas e nove

espécies de carraças (WHO, 1992). A resistência surgiu para todas as classes de inseticidas, incluindo agentes microbianos e reguladores de crescimento de insetos (Brogdon *et al.*, 1998). O desenvolvimento de resistência conduz à diminuição de rendimentos, dado que implica o aumento da frequência de aplicação de inseticida e/ou a aplicação de dosagens crescentes, com repercussões ambientais e em Saúde Pública, podendo ainda implicar a mudança de tipo de inseticida. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o custo da resistência aos inseticidas pode alcançar anualmente US\$ 1,4 biliões nos Estados Unidos (Hemingway *et al.*, 2000). O aparecimento de resistência aos piretróides por parte dos vetores anofelíneos tem vindo a colocar limitações à sustentabilidade dos programas de controlo de doenças transmitidas por mosquitos, como no caso da malária, da malária (WHO/UNICEF/RBM, 2005).

No âmbito das substâncias com atividade sobre mosquitos, poucos foram os inseticidas eficazes e economicamente viáveis desenvolvidos, desde a introdução dos piretróides. Os produtos naturais de origem vegetal ressurgem, assim, como uma promissora fonte de compostos biologicamente ativos úteis no controlo de vetores de agentes patogénicos. Os óleos essenciais (OE) obtidos de plantas são fontes de substâncias biologicamente ativas com potencial inseticida (Kelsey, 1984; Ayvaz *et al.* 2010). São misturas voláteis, geralmente aromáticas, relativamente complexas, tendo na sua composição principalmente monoterpenos e sesquiterpenos, nomeadamente, terpenos, álcoois, ésteres, cetonas e aldeídos (Simas. *et al.*, 2004; Svoboda, & Hampson, 1999). Muitos destes compostos apresentam propriedades biocidas, nomeadamente inseticidas, que poderão ser aplicadas em luta integrada contra vetores.

Assim, os óleos essenciais das espécies *Mentha pulegium* (poejo) e *Foeniculum vulgare* (funcho), provenientes de diferentes regiões geoclimáticas, foram avaliados quanto ao seu potencial de controlo de mosquitos vetores do vírus da dengue.

*Mentha pulegium* (Fig. 2a) é autóctone do sudoeste da Península Ibérica, ocorrendo em locais húmidos ou inundados de inverno, valas, linhas de água, represas, açudes. Em Portugal, é abundante e frequente, iniciando o seu desenvolvimento na Primavera. Em Cabo Verde encontra-se apenas na ilha de Santo Antão, junto a ribeiras.



**Figura 2 - *Mentha pulegium* (a) e *Foeniculum vulgare* (b), [Diara Rocha].**

*Foeniculum vulgare* (Fig. 2b) é nativa da bacia do Mediterrâneo, com variedades da Macaronésia e do Médio Oriente, onde ocorre no estado silvestre. Atualmente é cultivado, sob diversas formas varietais, em todas as regiões temperadas e subtropicais. Encontra-se vulgarmente nas margens dos campos e caminhos, sebes, lugares secos e rochosos.

## MÉTODOS

As folhas foram recolhidas nos diferentes locais, em diferentes épocas do ano, e foram transportadas para Lisboa devidamente acondicionadas.

Colheram-se exemplares das espécies vegetais em estudo os quais foram identificados, herborizados e depositados no Herbário do Instituto Científico Tropical (ICT) em Lisboa. Referenciou-se o coletor, número, local e data de colheita, de forma assegurar a conservação das plantas, validar os espécimes e a sua origem geográfica. Os óleos essenciais de *M. pulegium* (poejo) e *F. vulgare* (funcho) foram obtidos no laboratório do INRB/INIAV em Oeiras (URGENP), por hidrodestilação, utilizando um aparelho de Clevenger modificado.

Para obtenção do OE de *M. pulegium* adicionou-se 700 ml de água destilada a uma amostra de 40 mg de folhas secas e trituradas. A suspensão obtida foi colocada num balão de fundo redondo, com capacidade de 1 litro, acoplado ao Clevenger modificado. Como fonte de calor, foi utilizada uma manta de aquecimento (Isopad-Labsafe). A hidrodestilação foi mantida durante 3 horas, à temperatura de cerca de 100°C, com circuito de arrefecimento a água. Em seguida o sistema foi desligado, mantendo-se a circulação da água de refrigeração durante mais 45 minutos. O óleo essencial obtido foi retirado com o auxílio de uma pipeta volumétrica e seco em sulfato de magnésio anidro. Repetiu-se este procedimento o número de vezes necessário para se obter a quantidade de óleo essencial de poejo suficiente para os bioensaios programados. O OE de poejo foi conservado a temperatura ambiente num frasco selado com parafilme.

O óleo essencial de *F. vulgare* (funcho) foi obtido mediante o mesmo protocolo, variando a quantidade de folhas previamente trituradas e o volume de água. Constatou-se que o rendimento da hidrodestilação de OE de funcho é muito baixo, pelo que a obtenção do volume necessário para os ensaios seria incompatível com os prazos a cumprir. Assim, optou-se por utilizar nos ensaios OE de funcho comercial (Terra Pura®), tendo sido feito apenas a identificação dos compostos ativos (resultados não apresentados).

A colónia de *Ae. aegypti* (Cabo Verde) é mantida em laboratório em condições de 26±2°C de temperatura, 80±10% de humidade relativa e fotoperíodo de 12h:12h, estando os adultos acondicionados em câmara de segurança. As larvas e pupas são mantidas em tinas com água, renovada pelo menos duas vezes por semana. As larvas são alimentadas diariamente com comida de peixe triturada “Tetra Menu”®. As pupas são retiradas das tinas diariamente, contadas e colocadas numa gaiola de eclosão com uma solução de sacarose 10 %

embebida em papel de filtro. Às fêmeas é dada oportunidade de efetuar refeição sanguínea, uma a duas vezes por semana, em ratões (*Rattus rattus*) previamente anestesiados por via intramuscular com Rompun 2% (Bayer®) e Imalgène 1000 (Rhône Mérieux®), na proporção de 1:2. Na gaiola dos adultos, para além de se disponibilizar solução de sacarose a 10% para sua alimentação, são colocadas 1 a 2 placas de Petri com água para oviposição.

De acordo com as normas estabelecidas pela Organização Mundial de Saúde em 1963, o teste de sensibilidade de mosquitos imaturos aos inseticidas consiste em colocá-los, durante um determinado período, em contacto com água à qual se misturou previamente o inseticida a testar, em recipientes com diferentes concentrações do mesmo. Cada ensaio tem uma testemunha (branco ou controlo), que consiste em agrupar igual número de larvas no mesmo volume de água e/ou solvente. Uma vez determinada a gama de concentrações a usar, foram testados 4 lotes de insetos, com o respetivo controlo, correspondendo cada lote a uma concentração diferente. O número de insetos por lote foi de 15 a 25 larvas, tendo sido feitas pelo menos 4 réplicas (WHO, 1968).

Relativamente aos óleos essenciais, a emulsão foi preparada com Tween® 20 em água, tendo sido previamente avaliada a toxicidade deste tensioativo. As condições de temperatura na sala de ensaios foram monitorizadas, tendo variado entre 25±2°C. Os valores de mortalidade para cada tratamento foram somados e, quando necessário, corrigidos relativamente ao valor percentual de mortalidade registada no controlo (solução de Tween®20) aplicando-se para o efeito a fórmula de Abbot (WHO, 1968).

Os dados foram posteriormente sujeitos a análise Probit recorrendo ao Software SPSS (SPSS 20.0 for Windows®).

Foram efetuados os testes de óleos essenciais de *M. pulegium* e *F. vulgare* (origem portuguesa e cabo-verdiana), tendo sido feitas as réplicas necessárias para as larvas de *Aedes aegypti*.

## RESULTADOS

Na tabela 1 estão indicadas as concentrações letais CL<sub>50</sub>, CL<sub>90</sub> e CL<sub>99</sub> (mortalidade de 50%, 90% e 99%, respetivamente) correspondentes aos OE's de funcho de Cabo Verde e de Portugal e de poejo de Portugal. Qualquer dos OE's ensaiados apresentou atividade larvicida sobre *Ae. aegypti*, com uma relação direta de dose-mortalidade crescente. Esta relação é mais evidente quando se procede à representação comparativa dos valores de concentrações letais obtidas para cada um dos OE's (Fig. 3).

Os óleos de funcho apresentaram atividade larvicida, sendo a planta proveniente de Cabo Verde mais ativa que a de origem portuguesa. Efetivamente, o OE de funcho conduziu a mortalidade larvar em concentrações de 23,7 e 29,0 µl/L (CL<sub>50</sub>), 28,8 e 42,4 µl/L (CL<sub>90</sub>) e 33,6 e 57,9 µl/L (CL<sub>99</sub>), respetivamente para os OE's

provenientes de Cabo Verde e de Portugal. O OE de poejo foi menos eficiente que o funcho tendo apresentado níveis de mortalidade larvar para 88,4 µl/L (CL<sub>50</sub>), 222,2 µl/L (CL<sub>90</sub>) e 169,8 µl/L (CL<sub>99</sub>), respetivamente.

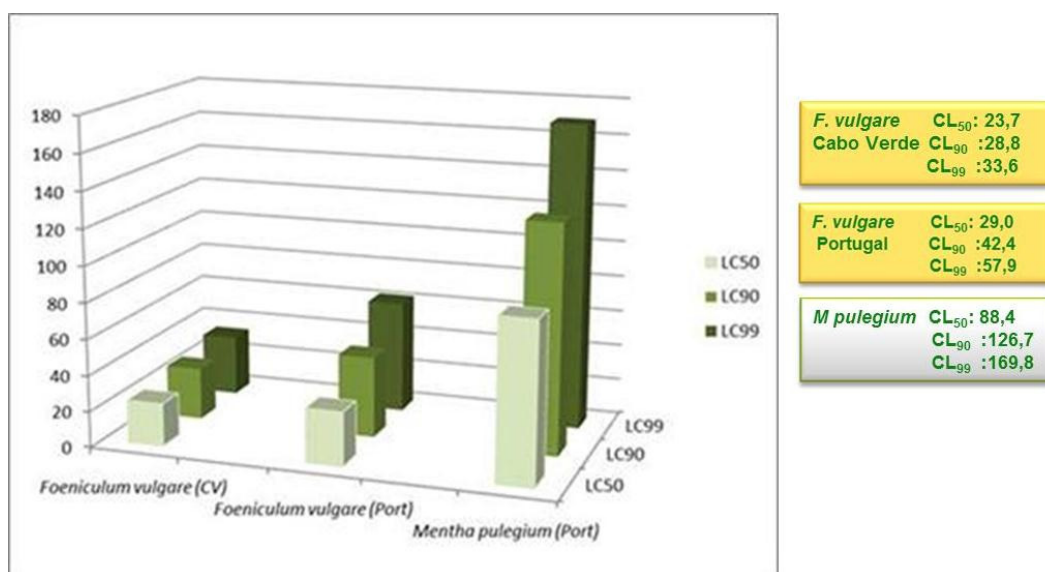
Em estudos com o óleo essencial de *F. vulgare* verificou-se que uma concentração de 40 mg/L causou 50% de mortalidade em larvas do segundo estágio de *Culex pipiens*, 2 horas após o contacto, enquanto que uma concentração de 60 mg/L, e após 4 h de exposição, verificou-se 90% de mortalidade nas larvas de 4.º estágio de *C. pipiens* (Zoubiri *et al*, 2011).

Existem, ainda, referências à atividade biocida de extratos de *F. vulgare* contra ácaros e diferentes espécies de insetos (Mimica-Dukić *et al*, 2003).

Os efeitos inseticidas dos OE de poejo contra mosquitos foram também referidos por Michaelakis *et al* (2011), sendo também conhecida a aplicação do óleo desta planta no controlo de outro tipo de insetos (Conceição *et al*, 2010).

Ação larvicida dos óleos essenciais			
Concentração, µl/l (Intervalo de Confiança 95%)			
Concentrações letais	<i>F. vulgare</i> Cabo Verde (A)	<i>F. vulgare</i> Portugal (B)	<i>M. pulegium</i> Portugal (C)
LC <sub>50</sub>	23,7 (23,2-24,4)	29,0 (24,6-32,3)	88,4 (72,9-101,4)
LC <sub>90</sub>	28,8(27,7-30,3)	42,4 (36,8-61,9)	126,7 (108,3-206,1)
LC <sub>99</sub>	33,6 (31,7-36,6)	57,9 (45,9-117,2)	169,8 (132,8-413,9)
Equação da reta	15,43*x +(-21,24)	5,0*x+ (-7,25)	8,00*x +(-15,55)
Coeficiente de correlação	0,999	0,979	0,941

**Tabela 1** - Atividades larvicida dos OE's das plantas testadas em larvas do 3.º estágio, 24 horas após a exposição.



**Figura 3** - Comparação de concentrações letais determinadas para OE's de *F. vulgare* (Cabo Verde / Portugal) e *M. pulegium* (Portugal) contra *Aedes aegypti*.

## CONCLUSÕES

Os resultados dos ensaios larvicidas das plantas em estudo confirmam as propriedades larvicidas descritas por outros autores, mas a relevância deste estudo reside no facto de, pela primeira vez, ter sido avaliada a atividade inseticida de espécies vegetais de regiões geográficas distintas. Ensaio preliminares revelaram que o funcho de origem cabo-verdiana apresenta um elevado potencial larvicida, superior ao do funcho português.

Relativamente ao óleo essencial de poejo constatamos que, embora apresente boa atividade larvicida, a sua atividade adulticida parece ser mais acentuada (resultados não apresentados). Estes resultados são, no entanto, preliminares, não se tendo ainda procedido à avaliação do efeito do OE de poejo proveniente de Cabo Verde.

## AGRADECIMENTOS

Fundação Calouste Gulbenkian pelo financiamento.

Doutora Cândida Maria Liberato (Investigadora jubilada do IICT) pelo apoio na identificação das plantas.

Eng. Manuel Delgado da Delegação do Ministério do Desenvolvimento Rural, MDR. Porto Novo, Santo Antão, Cabo Verde, pelo apoio técnico na colheita das plantas.

Sr<sup>a</sup> Conceição, Responsável pelo viveiro do Porto Novo (Santo Antão) pela ajuda na colheita das plantas.

Sr. Jorge Rocha pelo apoio na colheita de mosquitos na ilha de Santiago, Cabo Verde.

## BIBLIOGRAFIA

- ALMEIDA, A.P.G. 2011. Mosquitoes (Diptera, Culicidae) and Their Medical Importance for Portugal. Review. Challenges for the XXI Century, *Acta Med Port*, 24, 961-974.
- AYVAZ A, SAGDIC O, KARABORKLU S, OZTURK I. 2010. Insecticidal activity of the essential oils from different plants against three stored-product insects,. *Journal of Insect Science* 10, 21-34.
- BROGDON, W.G. & MCALLISTER, J.C. 1998. Synopses Insecticide resistance and vector control, *Emerg. Inf. Diseases*, 4: 605-611.
- CONCEIÇÃO, C., MATOS, O, BARBOSA, A., MEXIA, A., 2010. Potential of plant products as protectants of stored maize against *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae). In: Carvalho, O.M, Fields, P.G., Adler, C.S., Arthur, F.H., Athanassiou, C.G., Campbell, J.F., Fleurat-Lessard, F., Flinn, P.W., Hodges, R.J., Isikber, A.A., Navarro, S., Noyes, R.T., Riudavets, J., Sinha, K.K., Thorpe, G.R., Timlick, B.H., Trematerra, P., White, N.D.G. (Eds), *Proceedings of the 10th International Working Conference of Stored Product Protection*. Julius Kühn-Institut, Berlin, Germany, 618-624.
- FRADIN, M.S. & DAY, J.F. 2002. Comparative efficacy of insect repellents against mosquitoes bites. *N. Engl. J. Med.*, 347, 13-18.
- FRANCO, L., DI CARO, A., CARLETTI, F., Vapalahti, O., RENAUDAT, C., Z., H. & TENORIO, A., 2010. Recent expansion of dengue virus serotype 3 in West Africa. *Eurosurveillance*, 15 (7).
- GUBLER D.J., 1998. Resurgent vector borne diseases as a global health problem. *Emerg. Infect. Dis.*, 4, 442-450.
- HEMINGWAY, J. & RANSON H., 2000. Insecticide Resistance in Insect Vectors of Human Disease. *Annual Rev. Entomol.*, 45: 371-391.
- JAMES A.A., 1992. Mosquito molecular genetics: the hands that feed bite back. *Science*, 257, 37-38.
- KELSEY, R.G., REYNOLDS, G.W., RODRIGUEZ, E., 1984. *Biology and Chemistry of Plant Trichomes*. Eds Rodriguez, E., Healey, P.L., Metha, I.. Plenum Press. New York.
- MICHAELAKIS A., PAPACHRISTOS, D., KIMBARIS A. e POLISSIOU M., 2011. Larvicidal evaluation of three *Mentha* species essential oils and their isolated major components against the West Nile virus mosquito. *Hellenic Plant Protection Journal* 4: 35-43.
- MIMICA-DUKIĆ, N., KUJUNDŽIĆ S., SOKOVIĆ, M., COULADIS, M., 2003. Essential oils composition and antifungal activity of *F. vulgare* Mill. obtained by different distillation conditions. *Phytother. Res.*, 17(4), 368-371.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE (Brasil), 2006. *Doenças Infecciosas e Parasitárias, 2006: guia de bolso*. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, - 6. Ed.
- RORIZ-CRUZ, M., SPRINZ, E., ROSSET, I., GOLDANI, L., TEIXEIRA, M.G. 2010. Dengue and Primary Care: a Tale of two Cities. *Bulletin of the World Health Organization*, 88: 244-245.
- SIMAS, N.K., COSTA-LIMA, E., CONCEIÇÃO, S.R., KUSTER, R.M., OLIVEIRA- FILHO, A.M., SALGUEIRO-LAGE, C.L., 2004. Natural Products for Dengue Transmission Control - Larvicidal Activity of *Myroxylon balsamum* (red oil) and of Terpenoids and Phenylpropanoids. *Quím. Nova*, 27, 9 p.



- SVOBODA, K. P.& HAMPSON, J. B. (1999). Bioactivity of essential oils of selected temperature aromatic plants: antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory and other related pharmacological activities. *Proceedings NAHA*, Louis Missouri, USA 105-127.
- ZOUBIRI, S, BAALIOUAMER, A, SEBA, N., CHAMOUNI, N., 2011. Chemical composition and larvicidal activity of Algerian *F. vulgare* seed essential oil. *Arab. J. Chem.*, DOI: 10.1016/j.arabjc.2010.11.006.
- WHO, 1963."Criteria and meaning of test for determining susceptibility or resistance of Insects of insecticides". *Techn. Rep. Ser.*, Nº 265, Geneva.
- WHO, 1968. *Méthodes Stastiques utilisable dans les Campagnes d' eradication du Paludism*. Satra Swaroop. OMS, Genève. 117-129.
- WHO, 1992. Vector resistance to insecticides. *15 th Report of the WHO Expert Committee on Vector Biology and Control*. *World Health Organization Tech Rep. Ser.*, **818**: 1-62.
- WHO/UNICEF/RBM. 2005. *World Malaria Report*. Acedido em Agosto de 2009. <http://www.rbm.who.int/wmr2005 /index.html>.