

IDENTIFICAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E LARVICIDA DO ÓLEO ESSENCIAL DA *Lippia lasiocalycina*

Larisse C. F. Brito¹; João F. S. Júnior¹; Lucas M. F. Dias²; Lorenna F. Bucar³; Rafael G. A. Bacelar⁴; Márcio dos S. Rocha⁴; Sidney G. Lima⁵; Maria Christina Sanches Muratori⁶.

1. Programa de Pós Graduação em Zootecnia Tropical - Universidade Federal do Piauí
2. Programa de Pós Graduação em Saúde Pública - Universidade Federal do Ceará.
3. Mestre pelo Programa de Pós Graduação em Química - Universidade Federal do Piauí
4. Doutor pelo Programa de Pós Graduação em Ciência Animal - Universidade Federal do Piauí
5. Departamento de Química, Centro de Ciências da Natureza, Universidade Federal do Piauí
6. Departamento de Morfofisiologia Veterinária, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Piauí

Palavras-Chave: *Lippia lasiocalycina*; *Aspergillus flavus*; *Aedes aegypti*.

Introdução

Óleos essenciais (OE) são metabólitos secundários biosintetizados pelas plantas (OLIVEIRA et al., 2006) e formados por uma mistura complexa de substâncias. As classes mais comumente encontradas são monoterpenos e sesquiterpenos (PRAKASH et al., 2015). A atividade biológica está diretamente relacionada à constituição química do óleo sendo, por vezes, difícil atribuí-la a apenas um ou dois compostos. No que tange as ações dos óleos essenciais o que se observa é um efeito sinérgico entre os constituintes (RAUT; KARUPPAYIL, 2014).

Os OE são líquidos oleosos voláteis dotados de aroma característico, extraídos de plantas por processos específicos, como destilação por arraste à vapor ou por hidrodestilação. Alguns autores descrevem o uso de produtos naturais com potencial antifúngico, dentre eles, os OE foram avaliados frente ao seu potencial antifúngico contra linhagens toxigênicas (KOHYAMA, et al., 2015; KEDIA, et al., 2014A; KEDIA, et al., 2014B; KAHKHA, AMANLOO e KAYKHAIL, 2014; SILVA, et al., 2011; KUMAR, et al., 2010A; KUMAR et al., 2010B; PRAKASH, et al., 2010).

A espécie *Lippia lasiocalycina* é uma planta nativa do Brasil, encontrada nos estados da Bahia, Minas Gerais, Paraná, Mato Grosso e São Paulo, em domínios fitogeográficos do Cerrado, Caatinga, Floresta Amazônica e Mata Atlântica, porém, não é endêmica do país, apresentando registros também na Bolívia (SALIMENA, MULGURA, 2019). É um arbusto (2,0m de altura) caracterizado por ramos eretos e aromáticos, folhas opostas, piloso, pecíolo (1,6cm de comprimento), lâmina (5,0 x 3,5cm), ovada, ápice atenuado, membranácea, base truncada, face adaxial pilosa, margem crenada, venação craspedródoma e abaxial pubescente. Racemosas, brácteas (0,5cm de comprimento) Inflorescências axilares, sete lanceoladas, verde-claras; corola labiada, lilás (OLIVEIRA, 2014).

Esta espécie, *L. lasiocalycina*, possui poucos trabalhos relacionados ao rendimento, composição e atividade biológica, sendo o trabalho mais recente, àquele publicado pela equipe de pesquisa da UFPI (ALMEIDA et al. 2018).

Segundo alguns autores os componentes comumente encontrados nos óleos essenciais das espécies do gênero *Lippia* são o limoneno, β -cariofileno, *p*-cimeno, cânfora, linalol, α -pineno e timol. Sendo as principais propriedades destas plantas, comprovadas em estudos biológicos, ações antimicrobiana, antimalárica, espasmolítica, sedativa, hipotensiva, anti-inflamatória, antioxidante, antiparasitária, antifúngica e antibacteriana (ALMEIDA et al., 2010; SOARES; TAVARES-DIAS, 2013; SOUZA et al., 2015).

Apesar de várias espécies desse gênero já terem sido amplamente estudadas, a *L. lasiocalycina* tem poucos relatos (BISPO et al. 2016; ALMEIDA, 2018). Uma parceria entre o grupo de pesquisa da UFPI e a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária/Centro de Pesquisa Agropecuária do Meio-Norte (EMBRAPA MEIO-NORTE) proporcionou a

oportunidade de desenvolver estudos sobre esta espécie que possui poucos trabalhos científicos publicados, pelo exposto, com esse trabalho objetivou-se fazer a identificação da composição química do óleo essencial da *Lippia lasiocalycina* e avaliar o efeito da atividade larvicida e antifúngica.

Material e Métodos

Foram coletas partes aéreas de material vegetal (MV) da *Lippia lasiocalycina*, em Teresina, PI, em setembro de 2018, na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária/Centro de Pesquisa Agropecuária do Meio-Norte (EMBRAPA MEIO-NORTE). Óleo essencial das folhas frescas foram extraídos continuamente durante três horas em um aparelho tipo *Clevenger*. (AGUIAR, et al., 2014), no Laboratório de Geoquímica Orgânica (LAGO) - UFPI.

A análise por Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM), foi realizada em equipamento MDGC/GCMS-2010 SHIMADZU acoplado a um espectrômetro de massas GC-MS-QP5050A. A identificação foi feita pela comparação dos espectros de massas obtidos dos componentes da amostra e os espectros padrões da biblioteca NIST e comparação do índice de Kovats (ADAMS, 2007; ROCHA et al., 2018).

Para determinação da concentração inibitória mínima (MIC), foi utilizada a técnica modificada de PANDEY e DUBEY (1994). Foram utilizadas quatro concentrações dos óleos essenciais (25, 50, 100 e 200 μL), homogêneos diretamente ao meio de crescimento ainda semissólido, vertido asépticamente em placas de Petri. Após solidificação, fez-se um orifício de nove milímetros no centro da placa contendo o meio de cultura. Posteriormente, colocou-se 50 μL de uma suspensão contendo 10^5 conídios por mL diluídos em tampão fosfato salino, contados com auxílio de uma câmara de Neubauer. As placas foram seladas com filme de polietileno e incubadas a uma temperatura de $28 \pm 2^\circ\text{C}$ durante sete dias. Decorrido esse período, o diâmetro das colônias de fungos dos tratamentos e do controle foram medidos e a percentagem de inibição de crescimento calculada de acordo com a seguinte equação 1 (KUMAR, et al., 2010).

Equação 1:

$$\text{Inibição Micelial (\%)} = \frac{dc - dt}{dc} \times 100$$

Onde: dc = diâmetro médio da colônia do grupo controle;

dt = diâmetro médio da colônia do grupo tratamento;

Para a realização da atividade larvicida do OE foram utilizadas larvas de terceiro e quarto estágio do *Aedes aegypti*, obtidas no Laboratório de Parasitologia e Entomologia Sanitária da Universidade Federal do Piauí (LAPES-UFPI). O teste de atividade larvicida foi preparado segundo a metodologia sugerida pela Organização Mundial da Saúde (OMS, 2005). Foram retiradas alíquotas de 2,5 μL ; 5,0 μL ; 7,5 μL e 10 μL dos óleos essenciais e solubilizadas com 20 mL de solução aquosa de dimetilsulfóxido 1% (v/v). Em cada solução foram inseridas 10 larvas. A investigação da mortalidade foi observada em 24h e 48h após a realização do ensaio. O controle negativo consistiu em 20 ml de uma solução de dimetilsulfóxido (DMSO) a 1% e o controle positivo consistiu em uma solução de piriproxifeno a 0,05%. A eficiência de mortalidade das larvas foi determinada em percentagem por meio da (equação 2). Os ensaios foram realizados em triplicata (ABBOTT, 1925).

Equação 2:

$$E(\%) = \frac{Nc - Nt}{Nc} \times 100$$

Onde: Nc = Número de indivíduos vivos no tratamento controle;

Nt = Número de indivíduos vivos tratados;

Resultados e Discussão

Apesar de poucos estudos, a composição do óleo essencial da *Lippia lasiocalycina* (OELL) apresentou alguns componentes como descrito na literatura que são frequentemente encontrados por plantas desse gênero *Lippia*, como o limoneno, linalol, α -pineno e timol (ALMEIDA et al., 2010; SANTOS, 2017; SOARES; TAVARES-DIAS, 2013; SOUZA et al., 2015).

Como pode ser visto na Tabela 1, o OELL coletado em Teresina – PI, apresentou como principais constituintes o limoneno (65,27%), 4-Isopropilbenzaldeído (11,24%), *p*-cimeno (3,12%), espatulenol (1,44%), biciclogermacreno (1,26%) e o timol (1,14%).

Tabela 1: Composição química do Óleo essencial da espécie *Lippia lasiocalycina* (OELL) coletado no município de Teresina, PI, 2018.

Composto	Similaridade	TR	Área (%)	IK
α -pineno	97	6,3	0,96	939
mirceno	95	7,9	0,49	991
α -terpineno	94	8,9	0,08	1018
<i>p</i> -cimeno	97	9,2	3,12	1026
limoneno	95	9,4	65,27	1031
<i>cis</i> -ocimene	96	9,6	0,19	1040
<i>trans</i> - β -ocimeno	96	10,0	1,12	1050
γ -terpineno	97	10,5	0,83	1062
1-isopropenil-4-metilbenzeno	96	11,8	0,22	1206
NI	-	14,1	0,09	-
4-isopropilbenzaldeído	86	17,3	11,24	1239
carvona	95	18,6	0,17	1242
timol	97	20,7	1,14	1290
tridecano	97	21,1	0,93	1299
<i>trans</i> -acetato de carveol	94	22,6	0,35	1337
piperitenona	96	22,9	0,60	1342
NI	-	23,9	8,02	-
NI	-	25,4	0,17	-
NI	-	25,5	1,54	-
β -farneseno	91	27,9	0,42	1458
biciclogermacreno	93	29,8	1,26	1494
β -bisaboleno	95	30,2	0,35	1509
espatulenol	95	33,1	1,44	1576

TR: Tempo de Retenção; IK: Índice de Kovats; NI: Não Identificado.

Assim como é descrita por alguns pesquisadores (ALMEIDA et al., 2010; SOARES; TAVARES-DIAS, 2013; SOUZA et al., 2015), a atividade antifúngica do óleo essencial das espécies do gênero *Lippia*, podemos observar (Tabela 2), que o OE da *L. lasiocalycina*, coletado em Teresina-PI (OELL-1), inibiu o crescimento micelial da linhagem toxigênica de *Aspergillus flavus* em todas as concentrações testadas, tendo esse óleo como componente majoritário o limoneno, ao qual é atribuído as atividades biológicas do gênero *Lippia* aos compostos da família dos terpenoides, principalmente monoterpênicos e sesquiterpênicos, presentes nos óleos essenciais (BISPO, 2016).

Tabela 2: Atividade Antifúngica do óleo essencial da *Lippia lasiocalycina*, sob a inibição do crescimento de *Aspergillus flavus*.

Concentrações	Inibição do Crescimento Micelial (%)			
	25 μ L	50 μ L	100 μ L	200 μ L
OELL-1	100	100	100	100

Os óleos essenciais (OE) oriundos de plantas são constituídos por substâncias bioativas distintas que com passar do tempo vêm recebendo atenção especial como opção aos inseticidas sintéticos. Além de ecologicamente corretos e de simples manuseio, resultam em menor probabilidade de resistência (PAVELA, 2016). Alguns estudos como de KAURA et al., 2019; LIMA et al., 2019; MARTIANASARI et al., 2019; SCALVENZI et al., 2019; LIMA SANTOS et al., 2019, tem comprovado a atividade larvicida contra o *Aedes aegypti* L. de vários óleos essenciais testados.

Pode-se observar nos Gráficos 1 e 2 a eficiência de mortalidade das larvas do mosquito frente as concentrações testadas de OE. No gráfico 1, o óleo essencial da *Lippia lasiocalycina* (OELL-1) coletado em Teresina (PI), que tem como principal constituinte o Limoneno (65,27%), apresentou eficiência de 100% com 24h (Gráfico 1) nas concentrações de 5 a 20 μ L. Enquanto que com 48h (Gráfico 2) obtivemos um percentual de 100% de mortalidade das larvas em todas as concentrações testadas.

Gráfico 1: Ação larvicida do óleo essencial da *Lippia lasiocalycina* (OELL-1) coletado em Teresina (PI) frente as larvas do mosquito *Aedes aegypti* no período de 24h.

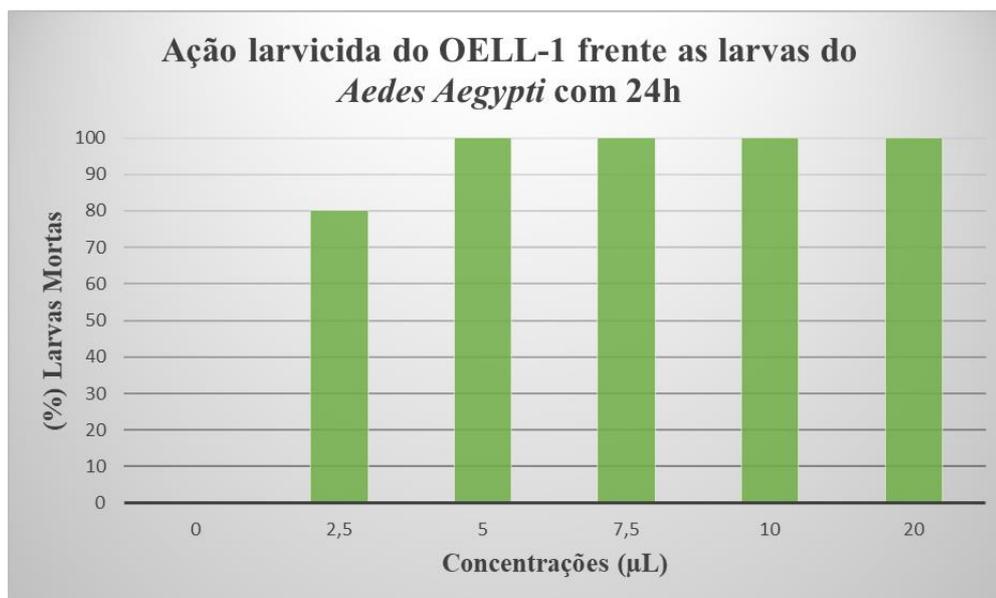
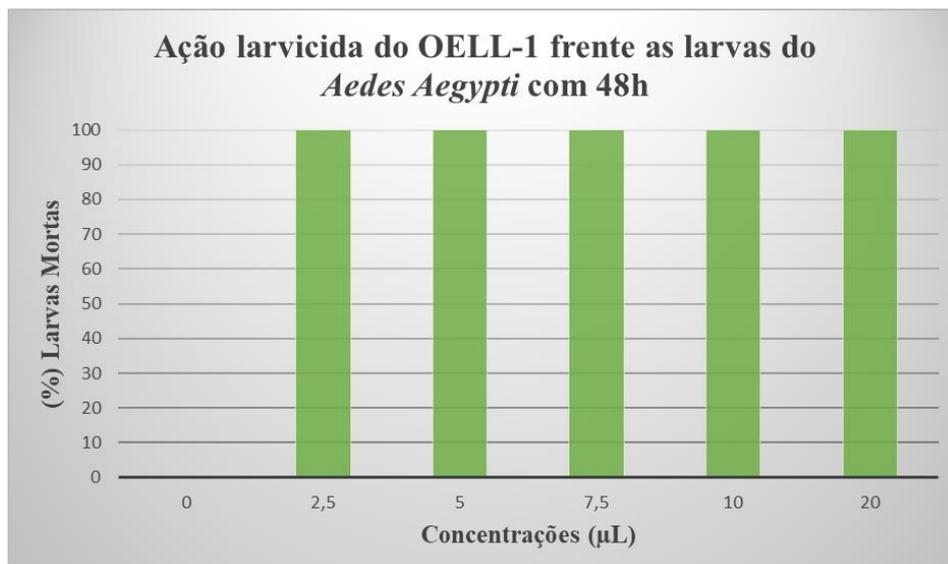


Gráfico 2: Ação larvicida do óleo essencial da *Lippia lasiocalycina* (OELL-1) coletado em Teresina, PI frente as larvas do mosquito *Aedes aegypti* no período de 48h.



O Piriproxifeno é usado como larvicida nos programas de controle do *A. aegypti* da OMS (Organização Mundial da Saúde) e o Ministério da Saúde. Ele age inibindo o desenvolvimento do inseto adulto, possui pouco efeito na letalidade das larvas, sendo sua capacidade larvicida observada em pupas e na inibição da afloração do adulto. A quantidade recomendada de uso é de 0,01g/Litro de água potável (BRASIL, 2014). O Piriproxifeno foi utilizado como controle positivo no teste. Quando comparada a sua atividade com as dos óleos essenciais testados da *Lippia lasiocalycina*, podemos observar que ele apresentou uma eficácia muito inferior aos OE.

Quadro 1: Resultado do Controle Positivo utilizando Piriproxifeno

Concentrações (g)	Eficiência de mortalidade (%)	
	24h	48h
0,01	20	26,66
0,02	10	16,66
0,03	13,33	20

Conclusões

O óleo essencial da *Lippia lasiocalycina* apresentou como principal constituinte o limoneno. A atividade antifúngica inibiu o crescimento micelial da linhagem toxigênica de *Aspergillus flavus* em todas as concentrações testada e a atividade larvicida apresentou eficiência de 100% com 24h nas concentrações de 5 a 20 μ L frente as larvas do mosquito *Aedes aegypti*.

Referências

- Adams, R. P. Identification of essential oils components by gas chromatography/mass spectroscopy. Illinois: Allured Publishing Corporation. Carol Stream, USA. Ed. 14, 2007.
- Aguiar, U. N.; Lima, S. G.; Rocha, M. S.; Freitas, R. M.; Oliveira, T. M.; Silva, R. M.; Moura, L. C. B.; Almeida, L. T. G. Preparação e caracterização do complexo de inclusão do óleo essencial de *Croton zehntneri* com β -ciclodextrina. **Química Nova**, v. 37, n. 1, p. 50-55, 2014.
- Almeida, M. C. S. et al. Flavonoids and other substances from *Lippia sidoides* and their antioxidant activities. **Química Nova**, v. 33, n.10, p.1877-1881, 2010.
- Almeida, W.S.; Lima, S. G.; Barreto, H. M.; Andrade, L. M. S.; Fonseca, L.; Athayde Sobrinho, C.; Santos, A. R. B.; Muratori, M. C. S. Chemical composition antimicrobial activity of the oil of *Lippia lasiocalycina* Cham. (*Verbenaceae*). **Industrial Crops And Products**, v. 125, p. 236-240, 2018.
- Bispo, L. P.; Oliveira, L. M.; Nascimento, M.N.; Ledo, C. A. S. Effect of indolebutyric acid and cutting type on vegetative propagation of three *Lippia* species *Ciência Rural*, Santa Maria, v.46, n.8, p.1364-1367, ago, 2016.
- Brasil, Ministério da Saúde. Orientações técnicas para a utilização do larvicida pyriproxifen (0,5 G) no controle de *Aedes aegypti*. 2014.
- Kakhkha, M. R. R.; Amanloo, S.; Kaykhah, M. Antiaflatoxigenic activity of *Carum copticum* essential oil. **Environmental Chemistry Letters**, v.12, p.231-234, 2014.
- Kaura, Taruna et al. Utilizing larvicidal and pupicidal efficacy of *Eucalyptus* and neem oil against *Aedes* mosquito: An approach for mosquito control. **Tropical parasitology**, v. 9, n. 1, p. 12, 2019.
- Kedia, A.; Prakash, B.; Mishra, P. K.; Chanotiya, C. S.; Dubey, N. K. Antifungal, antiaflatoxigenic, and insecticidal efficacy of spearmint (*Mentha spicata* L.) essential oil. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.89, p.29-36, 2014A.
- Kedia, A.; Prakash, B.; Mishra, P. K.; Dubey, N. K. Antifungal and antiaflatoxigenic properties of *Cuminum cyminum* (L.) seed essential oil and its efficacy as a preservative in stored commodities. **International Journal of Food Microbiology**, v.168-169, p.1-7, 2014B.
- Kohiyama, C. Y.; Ribeiro, M. M. Y.; Mossini, S. A. G.; Bando, E.; Bomfim, N. S.; Nerilo, S. B.; Rocha, G. H. O.; Grespan, R.; Mikcha, J. M. G.; Machinski Júnior, M. Antifungal properties and inhibitory effects upon aflatoxin production of *Thymus vulgaris* L. by *Aspergillus flavus* Link. **Food Chemistry**, v.173, p.1006-1010, 2015.

- Kumar, A.; Shukla, R.; Singh, P.; Anuradha; Prasad, C. S.; Dubey, N. K. Efficacy of extract and essential oil of *Lantana indica* Roxb. Against food contaminating moulds and aflatoxin B1 production. **International Journal of Food Science and Technology**, v.45, p.179-185, 2010A.
- Kumar, A.; Shukla, R.; Singh, P.; Dubey, N. K. Chemical composition, antifungal and antiaflatoxic activities of *Ocimum sanctum* L. essential oil and its safety assessment as plant based antimicrobial. **Food and Chemical Toxicology**, v.48, p.539-543, 2010B.
- Lima Santos, Lizandra et al. Evaluation of the Larvicidal Potential of the Essential Oil *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth in the Control of *Aedes aegypti*. **Pharmaceuticals**, v. 12, n. 2, p. 53, 2019.
- Martianasari, Riesna; Hamid, Penny Humaidah. Larvicidal, adulticidal, and oviposition-deterrent activity of *Piper betle* L. essential oil to *Aedes aegypti*. **Veterinary world**, v. 12, n. 3, p. 367, 2019.
- Oliveira, R. A. G.; Lima, E. O.; Vieira, W. L.; Freite, K. R. L.; Trajano, V. N.; Lima, I. O.; Souza, E. L.; Toledo, M. S.; Silva-Filho, R. N. Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 16. n. 1. 2006.
- Oliveira, A. R. M. F. Morfoanatomia, produção e composição química de óleo essencial e atividade biológica de quatro espécies nativas de *Lippia*. 2014. 1v. 114f. Tese (Doutorado em Recursos Genéticos Vegetais) – Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), Feira de Santana, Bahia.
- Pavela, Roman. History, presence and perspective of using plant extracts as commercial botanical insecticides and farm products for protection against insects—a review. **Plant Protection Science**, v. 52, n. 4, p. 229-241, 2016.
- Prakash, B.; Shukla, R.; Singh, P. Kumar, A.; Mishra, P. K.; Dubey, N. K. Efficacy of chemically characterized *Piper betle* L. essential oil against fungal and aflatoxin contamination of some edible commodities and its antioxidant activity. **International Journal of Food Microbiology**, v.142, p.114-119, 2010.
- Prakash, B.; Kedia, A.; Mishra, P. K.; Dubey, N. K. Plant essential oils as food preservatives to control moulds, mycotoxin contamination and oxidative deterioration of agri-food commodities - Potentials and challenges. **Food Control**. v. 47. p. 81-91. 2015.
- Raut, J. S.; Karuppayil, S. M. A status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial Crops and Products**. v. 62. p. 25-264. 2014.
- Salimena, F. R. G.; Mulgura, M. *Lippia*. In: Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: Acesso em: 24 fev. 2019.
- Santos, D. R. dos. Atividade inseticida de extratos e óleos essenciais de espécies do Gênero *Lippia* contra *Callosobruchus maculatus* (Fabricius, 1775) e *Nasutitermes corniger* (Motschulsky, 1855). Dissertação (mestrado) Universidade Estadual de Feira de Santana, 2017.
- Scalvenzi, Laura et al. Larvicidal activity of *Ocimum campechianum*, *Ocotea quixos* and *Piper aduncum* essential oils against *Aedes aegypti*. **Parasite**, v. 26, 2019.
- Silva, V. A.; Freitas, A. F. R.; Pereira, M. S. V.; Oliveira, C. R. M.; Diniz, M. F. F. M.; Pessoa, H. L. F. Eficácia antifúngica dos extratos da *Lippia sidoides* Cham. e *Matricaria recutita* Linn. sobre leveduras do gênero *Candida*. **Biofar**. v. 5. n. 1. 2011.
- Soares, B. V.; Tavares-Dias, M. Espécies de *Lippia* (Verbenaceae), seu potencial bioativo e importância na medicina veterinária e aquicultura. **Biota amazônica**, v.3, n.1, p.109-123, 2013.
- Souza, D. S. et al. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Lippia organoides* e *Lippia rotundifolia* frente a enterobactérias isoladas de aves. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.67, n.3, p. 940 – 944, 2015.