

Composición química y actividad biológica del aceite esencial de *Eugenia melanadenia* (Myrtales: *Myrtaceae*) sobre *Blattella germanica* (Dictyoptera: *Blattellidae*).

Lucita Aguilera,* Juan E. Tacoronte*, Agustín Navarro, Maureen Leyva, Avilio Bello,**[†] María T. Cabrera*** y María C. Marquetti.

Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri", Autopista Novia del Mediodía km 6½, Apartado Postal 601, La Lisa, Ciudad de la Habana, e-mail: laguilera@ipk.sld.cu. *Centro de Estudios de Productos Naturales, Facultad de Química, Universidad de la Habana. **Instituto Superior Pedagógico "Rafael María de Mendive", Pinar del Río. ***Oficina Cubana de la Propiedad Industrial, Picota y Luz, Habana Vieja, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 21 de febrero de 2003. Aceptado: 26 de diciembre de 2003.

Palabras clave: aceites esenciales, componentes volátiles, *Eugenia melanadenia*, *Myrtaceae*, cucarachas, *Blattella germanica*.
Key words: essential oils, volatile compounds, *Eugenia melanadenia*, *Myrtaceae*, cockroach, *Blattella germanica*.

RESUMEN. El aceite esencial de las hojas de *Eugenia melanadenia* (Myrtales: *Myrtaceae*) fue examinado mediante CG capilar y CG-EM. De los 75 compuestos volátiles identificados, que representan cerca del 98.8 % de la composición total del aceite, el componente mayoritario fue el 1,8-cineol (45,3 %), además del terpinen-4-ol (10,6 %), β -cymene (8,2 %), β -eudesmol (7,0 %) y α -terpineol (6,7 %). Se determinó la actividad biológica de este aceite sobre la cucaracha alemana *Blattella germanica* mediante bioensayos de laboratorio con seis dosificaciones. El producto mostró actividad insecticida con valores de $DL_{50} = 19,65\%$ y $DL_{95} = 84,65\%$. Además, se brinda una dosis diagnóstico hallada mediante el software probit-log.

ABSTRACT. The leaves essential oil of *Eugenia melanadenia* (Myrtales: *Myrtaceae*) was examined by GC and GC-MS. From the seventy-five identified constituents representing 98.8 % of the oil, 1,8-cineol (45.3 %) was the major components, besides terpinen-4-ol (10.6 %), β -cymene (8.2 %), β -eudesmol (7.0 %) and α -terpineol (6.7 %). The biological activity againsts *Blattella germanica* was tested. Six dosifications of the oil from leaves were tested against the german cockroach *Blattella germanica* and were found the values of the LD_{50} (19.65 %) and DL_{95} (84.65 %) and a diagnostic doses, using a probit-log programme.

INTRODUCCION

La flora cubana es muy rica y variada, por lo que su estudio resulta de gran interés por el aporte que puede brindar a diferentes industrias. Una de las familias que presentan especial interés por su gran endemismo, elevado contenido de aceites esenciales y otros principios activos,

es la *Myrtaceae*, la cual está representada en Cuba por 16 géneros, entre los que se encuentra el *Eugenia*, representada mundialmente por más de 600 especies, distribuidas mayormente en los trópicos de América y Asia. Este género en Cuba presenta 127 especies botánicas, entre ellas, *Eugenia melanadenia*

(Myrtales: *Myrtaceae*), arbusto endémico de hasta 2 m de altura, presente en las costas de Oriente, Matanzas, La Habana y Pinar del Río.¹ Bello *et al.*^{2,3} realizaron estudios fitoquímicos de aceites esenciales aislados de plantas pertenecientes a esta familia y género, como *Eugenia axillaris* (SW.) Willd, *Eugenia cristata* Wr. y *Eugenia rocana* Britt & Wils, sin embargo, hasta el momento no se conocen reportes previos de estudios fitoquímicos ni de actividad biológica de *E. melanadenia*, por lo que el objetivo principal de este estudio fue investigar la composición química del aceite esencial de las hojas de esta planta, así como su posible actividad biológica sobre la cucaracha alemana *Blattella germanica* (L.) 1767 (Dictyoptera: Blattellidae).

MATERIALES Y METODOS

Eugenia melanadenia Krug & Urb. fue recolectada en la provincia de Pinar del Río, Cuba y fue correctamente identificada desde el punto de vista botánico y comparada con muestras del herbario del Instituto Superior Pedagógico "Rafael María

*Autor a quien se debe enviar la correspondencia.

de Mendive” de Pinar del Río por el Dr. Armando J. Urquiola. Las hojas de esta planta fueron separadas manualmente de los tallos y posteriormente, secadas al aire y a la sombra durante 15 d. El aceite esencial se extrajo de ellas por el método de hidrodestilación a partir de 1 kg de material, de forma similar a como establece la norma ISO 6571.⁴

La actividad biológica sobre la cucaracha alemana *Blattella germanica* fue determinada mediante bioensayos de laboratorio de toxicidad, con machos recién emergidos de acuerdo con las instrucciones de la WHO.⁵ Se realizaron tres bioensayos en total para cada dosificación probada y cuatro réplicas y se contó con los controles correspondientes. Los factores climáticos fueron controlados a una temperatura ambiente de $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ y 70 a 75 % de humedad relativa. Se utilizaron frascos de vidrio de boca ancha de 800 mL y se colocaron 10 machos recién emergidos por réplica. Los insectos provenían de una cepa de laboratorio cultivada desde 1999 en el insectario del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri”, Cuba, susceptible a malation, cipermetrina y propoxur (Montada, 1999; Comunicación Personal).

PARTE EXPERIMENTAL

El aceite obtenido se separó y secó sobre sulfato de sodio anhidro y se conservó refrigerado en frasco de vidrio color ámbar para su posterior análisis químico. El estudio analítico fue realizado por Cromatografía Gaseosa-Espectrometría de Masas (CG-EM). Las mediciones se realizaron en un equipo Hewlett-Packard modelo 5890 serie II o en un modelo 6890 serie II acoplado a un espectrómetro de masas HP 5972 o HP 5973, acoplados a una columna de sílice fundida (50 m x 0,32 mm, 0,4 μm) del tipo CP-SIL-5CB o a una columna de sílice fundida (60 m x 0,32 mm, 0,25 μm) del tipo AT-WAX Alltech. La temperatura fue programada como sigue: desde 60°C (10 min) hasta 280°C a razón de $3^\circ\text{C}/\text{min}$ y mantenida por 60 min en una columna apolar y de 65°C (10 min) hasta 250°C a a razón de $2^\circ\text{C}/\text{min}$ y mantenida por 60 min en una columna polar. La temperatura del inyector y de la línea de transferencia fue de 250°C y el flujo de gas portador helio a razón de 1 mL/min. Los espectros se midieron a 70 eV. La identificación de los componentes se realizó por comparación de los índices de retención relativos y los espectros de masas de

componentes de referencia en las dos columnas, así como por comparación de los índices de retención relativos a la serie homóloga de n-parafinas, en los casos en que se contó con sustancias patrones. Además, se utilizaron espectros de masas publicados.^{6,7}

En los bioensayos realizados se probaron 6 dosificaciones de este aceite (100, 75, 65, 50, 25 y 10 %) utilizando acetona como disolvente, las cuales fueron aplicadas tópicamente en el primer esternito abdominal de los insectos a razón de 1 $\mu\text{L}/\text{insecto}$, luego de ser anestesiados con frío (10 min a $0,5^\circ\text{C}$). Los controles fueron tratados de igual forma pero sólo con acetona. El conteo de mortalidad se realizó a las 24, 48 y 72 h post-aplicación. Se utilizó el paquete de programas probit-log⁸ para la obtención de los valores de DL_{50} y DL_{95} .

RESULTADOS Y DISCUSION

Se identificó un total de 75 compuestos volátiles, lo que representó cerca del 98,8 % de la composición total del aceite (Tabla 1). Los componentes mayoritarios del aceite esencial de *E. melanadenia* que se encontraron en concentraciones mayores del 5 %, fueron los monoterpenos 1,8-cineol (45,3 %), terpinen-4-ol (10,6 %), β -cymeno (8,2 %), β -eudesmol (7,0 %) y α -terpineol (6,7 %). Se comprobó además, la existencia de un número apreciable de compuestos en concentraciones traza (menos de 0,1 %). Estos componentes fueron encontrados también como mayoritarios por Bello *et al.*³ en aceites esenciales foliares de *Pimenta racemosa* (Miller) J.W. Moore, *Psidium rotundatum* Griseb y *Myrcianthes fragans* (SW)McVaugh, especies pertenecientes a la familia Myrtaceae.

La mortalidad encontrada en cada caso se obtuvo a las 24 h después de aplicado el aceite esencial, excepto para la mayor dosificación probada, la cual provocó el 100 % de mortalidad con un efecto “knock down” inmediato seguido por la muerte instantánea de los insectos tratados (Tabla 2). La mortalidad en el control no fue necesario corregirla con la fórmula de Abbott,⁹ ya que fue menor del 5 %. El análisis probit-log brindó la ecuación de la línea de regresión dosis-mortalidad $y = 5,62 + 2,58 X$, cuya pendiente indicó que la cepa estudiada presentó una elevada susceptibilidad a este aceite esencial. En esta tabla también se destacan los valores de las dosis letales $DL_{50} = 19,65 \%$ y $DL_{95} = 84,95 \%$ con

sus respectivos límites de confianza, los cuales presentan un especial interés, ya que permiten brindar una dosis diagnóstico de 2 $\mu\text{g}/\text{insecto}$ de este aceite esencial al 100 % como patrón de referencia para la vigilancia de la susceptibilidad de poblaciones de este insecto ante formulaciones del aceite utilizadas en el terreno.

Los resultados sugieren que la actividad biológica del aceite esencial foliar de *E. melanadenia* pudiera ser atribuida a la presencia mayoritaria del 1,8-cineol, ya que representa casi el 50 % de la composición total del aceite. Duke¹⁰ notó que algunos compuestos producidos por las plantas como el camphos, 1,8-cineol y pulegon son los más fitotóxicos entre los cientos de monoterpenos conocidos derivados de ellas. No obstante, se deben tener en cuenta los otros componentes mayoritarios encontrados como posibles responsables de la acción insecticida de este aceite sobre *B. germanica*, así como el efecto sinergista del α -pineno, reconocido como irritante.

Por otra parte, Karr & Coats^{11,12} demostraron que los monoterpenos δ -limoneno, α -terpineol, α -mircenol y linalool presentaron actividad insecticida al ser aplicados tópicamente a la cucaracha alemana *B. germanica*. Enan¹³ demostró que cuando *Periplaneta americana* es expuesta al α -terpineol y alcohol cinámico, así como a su mezcla a partes iguales, se produce una hiperactividad seguida por hiperextensión de las patas y el abdomen y luego, un rápido knock-down o una rápida inmovilización seguida por la muerte. Estos mismos compuestos provocaron en *B. germanica* una rápida inmovilización por knockdown seguida por la mortalidad. También se demostró que la mezcla de estos compuestos fue más eficaz contra ambas especies de cucaracha que cada uno por separado, lo que evidenció su acción sinergista.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece las colaboraciones brindadas por el Dr. Julio Pino (IIA-Watao) y Dr. Armando Urquiola (JBPR), en el análisis de los datos cromatográficos y en la recolección y taxonomía de la especie botánicas. Deseamos dedicar, con hondo pesar y orgullo, este trabajo al M.C. Avilio Bello, fallecido durante 2003, quien fuera promotor espiritual de los estudios quimiotaxonómicos de la flora occidental de Cuba.

Tabla 1. Componentes volátiles del aceite esencial de *Eugenia melanadenia* Krug & Urb.

Compuesto ^a	Índice de retención		Area CG (%)
	IR ₁	IR ₂	
3-hexanol	772	1 178	t
α-tuyeno	914	1 009	1,0
α-pineno	921	1 012	3,6
camfeno	933	1 051	t
verbeneno	937	1 118	t
sabineno	957	1 108	t
β-pineno	961	1 090	2,1
1,8-dehidrocineol	974	1 176	t
mirceno	977	1 150	0,5
1(7),8- <i>p</i> -menteno	989	1 156	t
α-felandreno	989	1 159	t
α-terpineno	1 002	1 167	0,1
<i>p</i> -cimeno	1 003	1 264	8,2
1,8-cineol	1 018	1 196	45,3
acetofenon	1 027	1 643	t
1-feniletanol	1 027	1 800	t
(E)-β-ocimeno	1 033	1 243	t
γ-terpineno	1 042	1 235	0,4
<i>trans</i> -sabineno hidrato	1 049	1 449	0,1
(E)-linalool-óxido (furanóide)	1 050	1 421	t
α, <i>p</i> -dimetilstireno	1 067	1 425	0,1
terpinoleno	1 072	1 273	0,1
linalol	1 079	1 530	0,2
<i>cis</i> -rosa óxido	1 100	1 345	t
<i>cis-p</i> -ment-2-en-1-ol	1 100	1 560	0,1
<i>trans</i> -rosa óxido	1 109	1 360	t
endo-fenchol	1 110	1 568	t
<i>trans</i> -sabinol	1 121		t
neoisopulegol	1 123		0,1
isopulegol	1 146	1 561	0,2
δ-terpineol	1 147	1 638	0,3
criptona	1 148	1 642	0,1
terpinen-4-ol	1 153	1 571	10,6
<i>p</i> -cimen-8-ol	1 158	1 829	0,4
1-feniletil-acetato	1 163	1 670	0,2
α-terpineol	1 167	1 683	6,7
mirtenol	1 182	1 769	0,1
<i>trans</i> -piperitol	1 188	1 716	0,1
<i>cis</i> -1(7),8- <i>p</i> -mentadieno-2-ol	1 204	1 863	t
β-citronelol	1 206	1 748	0,3
carvona	1 207	1 700	t
<i>p</i> -cuminaldehído	1 207	1 752	t
piperitona	1 218	1 666	t
desconocido	1 224		0,3
felandral	1 244		0,1
timol	1 263	2 100	0,1
<i>p</i> -cumin-alcohol	1 267	2 065	t
carvacrol	1 272	2 154	t

BIBLIOGRAFIA

1. León Hermano F.S.C. (Dr. JS Sauget), Alain Hermano F.S.C. (Dr. EE Liogier). Flora de Cuba. Vol. III. Dicotiledóneas: Malpighiaceae a Myrtaceae. Imp. P. Fernández y Cía. S. en C., La Habana, 462, 1953.
2. Bello A., Pino J., Marbot R., Urquiola A., Agüero J., García J. Componentes volátiles de plantas del género *Eugenia* del occidente de Cuba: *Eugenia axillaris* (SW.) Willd., *Eugenia cristata* Wr. y *Eugenia rocana* Britt & Wils. **Revista CENIC Ciencias Químicas**, **32**, 135-8, 2001.
3. Bello A., Pino J., Marbot R., Urquiola A., Agüero J. Componentes volátiles de plantas de la familia Myrtaceae de la región occidental de Cuba. **Revista CENIC Ciencias Químicas**, **32**, 143-7, 2001.
4. ISO 6571 International Organization for Standardization. Spices, condiments and herbs. Determination of volatile oil content, 1984.
5. World Health Organization. Instrucciones para determinar la resistencia y(o) susceptibilidad de las cucarachas a los insecticidas. WHO/VBC/75.593. Ginebra.
6. Mac Lafferty F.W., Staffer D.B. The Wiley/NBS Registry of Mass Spectral Data. John Wiley & Sons, New York, 1989.
7. Adams R.P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy. Allured Publishing Corp., Carol Stream, 1995.
8. Raymond M. Présentation d'un programme d'analyse log-probit pour micro-ordinateur. Cah. **ORSTOM. Sér. Ent. Méd. Et Parasitol.**, **22**, 117-21, 1985.
9. Abbott W.S. A method for computing the effectiveness of an insecticide. **J. Econ. Entomol.**, **18**, 265-7, 1925.
10. Duke S.O. Plant terpenoids as pesticides. In: R.F. Keeler and A.T. Tu [Ed.]. Toxicology of plant and fungal compounds handbook of natural toxins. Vol. 6. Marcel Dekker, New York, 269-96, 1991.
11. Karr L.L., Coats J.R. Insecticidal properties of d-limonene. **J. Pest. Sci.**, **13**, 287-90, 1988.
12. Karr L.L., Coats J.R. Effects of four monoterpenoids on growth and reproduction of the german cockroach (Blattodea: Blattellidae). **J. Econ. Entomol.**, **85**, 424-9, 1992.
13. Enan E. Insecticidal activity of essential oils: octopaminergic sites of action. 2001. En: http://esa.confex.com/esa/2001/techprogram/paper_957.htm

(Continúa en la página siguiente.)

Tabla 1. (Continuación)

Compuesto ^a	Indice de retención		Area CG (%)
	IR ₁	IR ₂	
carvacrol	1 272	2 154	t
metil-eugenol	1 370	1 988	0,3
8-hidroxicarvona	1 373		t
(E)- β -cariofileno	1 406	1 580	t
(Z)-metil-isoeugenol	1 417	2 044	0,1
aromadendreno	1 446	1 589	0,1
(E)-metil-isoeugenol	1 456	2 126	t
alo-aromadendreno	1 463	1 627	t
β -selineno	1 476	1 695	0,2
α -selineno	1 487	1 700	0,1
γ -cadineno	1 488	1 766	0,2
α,α -dihidro-agarofurano	1 501		t
α -calacoreno	1 527	1 887	t
elemol	1 529	2 076	0,2
germacreno-B	1 548	1 797	t
spatulanol	1 557	2 078	t
β -cariofileno-epóxido	1 569	1 936	t
guaiol	1 581	2 051	0,2
viridiflorol	1 583	2 045	0,1
neointermediol	1 589		0,1
eremoligenol	1 606		1,4
γ -eudesmol	1 607	2 120	1,9
Jinkoh-eremol	1 619	2 146	1,0
hinesol	1 619	2 145	0,6
β -eudesmol	1 622	2 175	7,0
α -eudesmol	1 627	2 170	3,8
α -11-selineno-4-ol	1 628	2 195	t
carissona	1 879		0,1
Total			98,8

t traza (concentración < 0,1 %).

Tabla 2. Mortalidad promedio de *Blattella germanica* ante diferentes dosis del aceite esencial de *Eugenia melanadenia* y parámetros de la línea del análisis probit-log.

Dosis (%)	Mortalidad promedio (%)	DL ₅₀	Límites de confianza (%)	DL ₉₅	Límites de confianza (%)	b*
100	100,0	19,65	14,11 a 24,38	84,95	64,19 a 131,72	2,58
75	96,6					
65	90,0					
50	87,5					
25	50,0					
10	33,3					

b* Valor de la pendiente.