

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA

MARCUS VINICIUS DE SÁ GONÇALVES DA SILVA

Composição química e atividade larvicida contra *Aedes aegypti* do óleo essencial da
Eugenia calycina

UBERLÂNDIA

2018

MARCUS VINÍCIUS DE SÁ GONÇALVES DA SILVA

Composição química e atividade larvicida contra *Aedes aegypti* do óleo essencial da
Eugenia calycina

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Química.

Área de concentração: Química Orgânica

Orientador: Prof. Dr. Sérgio A. L. de Moraes

Coorientadora: Profa. Dra. Raquel M. F. de Sousa

UBERLÂNDIA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

S586d
2018 Silva, Marcus Vinícius de Sá Gonçalves da, 1989-
Composição química e atividade larvicida contra *Aedes aegypti* do
óleo essencial de *Eugenia calycina* / Marcus Vinícius de Sá Gonçalves
da Silva. - 2018.
120 f. : il.

Orientador: Sérgio Antônio Lemos de Morais.
Coorientadora: Raquel Maria Ferreira de Sousa.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Química.
Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2018.1118>
Inclui bibliografia.

1. Química - Teses. 2. *Aedes aegypti* - Teses. 3. Sesquiterpenos -
Teses. 4. Essências e óleos essenciais - Teses. I. Morais, Sérgio Antônio
Lemos de. II. Sousa, Raquel Maria Ferreira de, 1981- III. Universidade
Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Química. IV.
Título.

CDU: 54



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



Ata da defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO junto ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia
DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO ACADÊMICO, NÚMERO 284/PPQUI.

DATA: 26/03/2018

DISCENTE: Marcus Vinícius de Sá Gonçalves da Silva

MATRÍCULA: 11612QMI009

TÍTULO DO TRABALHO: Avaliação da atividade larvicida do óleo essencial das folhas de Eugenia calycina (pitanga-do-cerrado) contra o Aedes aegypti e identificação de compostos bioativos.

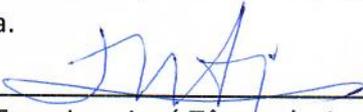
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Química

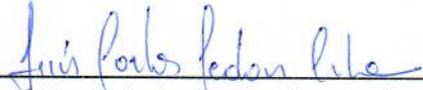
LINHA DE PESQUISA: Química de Produtos Naturais

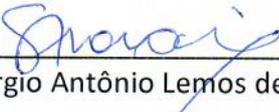
PROJETO DE PESQUISA DE VINCULAÇÃO: Variação química no óleo essencial das folhas de seis indivíduos de duguetia furfuracea (Annonaceae)

Às quatorze horas do dia vinte e seis de março do ano dois mil e dezoito, no(a) Auditório Prof. Dr. Manuel Gonzalo Hernández-Terrones, piso superior do Bloco 5I no Campus Santa Mônica, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelo Prof. Dr. Francisco José Tôrres de Aquino, Universidade Federal de Uberlândia, Prof. Dr. Luis Carlos Scalon Cunha, Instituto Federal do Triângulo Mineiro e Prof. Dr. Sérgio Antônio Lemos de Moraes, professor(a) orientador(a) e presidente da mesa. Iniciando os trabalhos, o(a) presidente da mesa apresentou o(a) candidato(a) e a Banca Examinadora, agradeceu a presença do público e discorreu sobre as normas e critérios para a realização desta sessão, baseadas no Regulamento do Programa PPQUI. Em seguida, o(a) presidente da mesa concedeu a palavra ao(à) candidato(a) para a exposição do seu trabalho e, em sequência, aos examinadores, em ordem sucessiva, para arguir o(a) apresentador(a). A duração da apresentação e o tempo de arguição e resposta deram-se conforme as normas do Programa. Ultimada a arguição, desenvolvida dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais e A provou o(a) candidato(a). Por sugestão da Banca Examinadora, o título do trabalho será Composição química, e atividade larvicida contra Aedes aegypti do óleo essencial da Eugenia calycina

Esta defesa de Dissertação de Mestrado Acadêmico é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento do estabelecido nas normas do Programa, legislação e regulamentação internas da UFU. As correções observadas pelos examinadores deverão ser realizadas no prazo máximo de 30 dias. Nada mais havendo a tratar, deu-se por encerrada a sessão às 16 horas e 30 minutos e lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pela Banca Examinadora.


Prof. Dr. Francisco José Tôrres de Aquino


Prof. Dr. Luis Carlos Scalon Cunha


Prof. Dr. Sérgio Antônio Lemos de Moraes

MARCUS VINICIUS DE SÁ GONÇALVES DA SILVA

Composição química e atividade larvicida contra *Aedes aegypti* do óleo essencial da
Eugenia calycina

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Química.

Área de concentração: Química Orgânica

Uberlândia, 26 de março de 2018

Banca examinadora:

Prof. Dr. Francisco José T. de Aquino
(Examinador – UFU)

Prof. Dr. Luis Carlos Scalon Cunha
(Examinador – IFTM)

A Deus.

Aos meus pais Mário e Maria Eugênia.

A minha querida esposa, Kamilla.

Aos meus irmãos Pedro Henrique e Gustavo.

Ao meu grande amigo Leandro.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por possibilitar a conclusão deste trabalho.

Ao professor Dr. Sérgio A. L. Morais, pela orientação, ensinamentos e confiança.

A Profa. Dra. Raquel Maria Ferreira de Sousa pelas imensas ajudas e sugestões, pela enorme paciência, pelos ensinamentos e amizade. Muito obrigado mesmo.

Ao professor Dr. Alberto de Oliveira, pelas viagens realizadas a Estação Ecológica do Panga, para a coleta do material vegetal.

Ao professor Dr. Evandro A. do Nascimento, pelos ensinamentos adquiridos dentro e fora do meio acadêmico.

Aos demais professores do NuPPEN (Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais) do Instituto de Química da UFU, Dr. Roberto Chang, e Prof. Dr. Marcos Pivatto pelos ensinamentos adquiridos na disciplina, bem como pelo auxílio no laboratório.

Ao professor Dr. Ricardo R. Soares da Engenharia Química da UFU pela utilização do CG-EM.

Ao Prof. Dr. Francisco Tôrres de Aquino pelo incentivo e colaboração.

Ao Prof. Dr. Júlio Mendes Instituto de Ciências Biomédicas da UFU, pelo auxílio tanto na identificação quanto na coleta dos ovos de *Aedes aegypti*.

A Profa. Dra. Laila S. Espindola e as professoras Drs. Mariana e Lorena pela ajuda nas análises larvicidas na Divisão de Vigilância Ambiental (DIVAL) em Brasília, bem como no Laboratório de Farmacognosia da UnB.

Ao Magayver do Instituto de Química da UFU, pelas análises de RMN.

A aluna de iniciação científica Sheila Assunção Silva que me auxiliou em todas das etapas deste trabalho.

Aos amigos do NuPPEN: Luís, Éder, Carla, Rose, Bruno, Edmilson, Thamires, Marília, Tiara, Flávia, Vanessa e John Kennedy pelo companheirismo, amizade e ajuda.

Aos alunos Ms. Mário M. Martins e Michelle Nauara pela imensa ajuda no cotidiano do laboratório, bem como pelos ensinamentos a respeito do programa utilizado na elucidação estrutural das substâncias (TopSpin).

A Ms. Thaise Lara Teixeira e ao Professor Dr. Cláudio pelas análises de citotoxicidade realizadas no Laboratório de Tripanosomatídeos.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Muñoz, coordenador da Pós-Graduação do Instituto de Química, que colaborou e ajudou na compra dos reagentes para o laboratório.

Aos meus pais, Mário e Maria Eugênia, pelo grande carinho, dedicação e incentivo à minha formação.

A minha esposa, Kamilla S. Soares, por todo carinho, ajuda e paciência que teve durante o desenvolvimento deste trabalho.

À FAPEMIG por apoio aos auxílios nos Congressos de Química.

E por fim, ao Instituto de Química da UFU e ao seu Programa de Pós-Graduação em Química, que possibilitaram o desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

O estudo de compostos bioativos extraídos de produtos naturais tem exercido um papel essencial no reconhecimento de novos fármacos com atividades biológicas promissoras. Estes compostos podem atuar como padrão de referência para a síntese de novas substâncias ou como protótipos ativos. Este trabalho teve como objetivos: identificar a composição química do óleo essencial (OE) da *Eugenia calycina*, isolar compostos e caracterizá-los por técnicas espectroscópicas, avaliar a atividade larvicida contra o *Aedes aegypti* e, por fim, avaliar a atividade citotóxica para células Vero e HeLa. O OE foi analisado por cromatografia gasosa acoplado a espectrometria de massas (CG-EM), sendo sesquiterpenos cíclicos oxigenados e não oxigenados os principais constituintes identificados. O biciclogermacreno (13,22 %), o espatulenol (15,98 %) e o β -cariofileno (6,96 %) foram os compostos majoritários. O óleo essencial (400 mg) foi fracionado em coluna cromatográfica e a partir dos perfis das frações obtidos através de um cromatógrafo gasoso acoplado ao detector por ionização de chama (CG-DIC), foi possível identificar a presença de três compostos isolados. Estes constituintes também foram analisados por ressonância magnética nuclear (RMN) e suas estruturas foram identificadas como espatulenol (51,2 mg), 4 β ,10 α -aromadendranodiol (5,27 mg) e 1 β ,11-dihidróxi-5-eudesmeno (7,54 mg), sendo os dois últimos inéditos na espécie *E. calycina*. A atividade larvicida do OE foi avaliada, em 24, 48 e 72 horas, e os CL₅₀ observados foram de 199,3 \pm 1,1; 166,4 \pm 1,2 e 148,3 \pm 1,1 μ g mL⁻¹, respectivamente, sendo considerada uma atividade promissora. Os compostos isolados foram testados nas concentrações de 25 e 100 μ g mL⁻¹, mas foram inativos. Através dos resultados pode-se observar que quanto maior o tempo de exposição menor é quantidade de óleo essencial para matar 50% das larvas de *A. aegypti*, diminuindo o valor do CL₅₀. Além disso, os compostos presentes no óleo agem sinergicamente na atividade avaliada. A concentração citotóxica do OE para células HeLa e Vero (266,8 \pm 46,5 e 312,1 \pm 42,5 μ g mL⁻¹, respectivamente) em 48h de exposição foram superiores ao CL₅₀, mostrando baixa citotoxicidade na concentração que apresenta atividade larvicida, resultando em índice de seletividade positivo. Sendo assim, as folhas de *E. calycina* mostram-se como uma fonte de produto natural muito promissora na atividade larvicida.

Palavras-chave: *Eugenia calycina*. Sesquiterpenos. *Aedes aegypti*. Compostos isolados.

ABSTRACT

The study of bioactive compounds extracted from natural products has played an essential role in the recognition of new drugs with promising biological activities. These compounds can act as a reference standard for the synthesis of new substances or as active prototypes. The objective of this work was to identify an essential oil chemical composition (OE) of *Eugenia calycina*, to isolate compounds and to characterize it by spectroscopic techniques, to evaluate a larvicidal activity against *Aedes aegypti* and, finally, to evaluate a cytotoxic activity for Vero and HeLa. The OE was analyzed by gas chromatography coupled to a mass spectrometer (GC-MS), with oxygenated and non-oxygenated cyclic sesquiterpenes were identified as major constituents. The majority compounds were bicyclogermacrene (13.22%), spathulenol (15.98%) and β -caryophyllene (6.96%). The essential oil (400 mg) was fractionated in a chromatographic column and from the profile of the fractions by gas chromatography coupled to the flame ionization detector (GC-FID) was possible to identify the presence of three isolated compounds. These constituents were also analyzed by nuclear magnetic resonance (NMR) and their structures were identified as spathulenol (51.2 mg), $4\beta,10\alpha$ -aromadendranediol (5.27 mg) and $1\beta,11$ -dihydroxy-5-eudesmene (7, 54 mg), the last two unpublished in the *E. calycina*. The larvicidal activity of the EO, was evaluated at 24, 48 and 72 hours and the LC_{50} obtained were $199.3\pm 1,1$; 166.4 ± 1.2 and $148.3\pm 1.1 \mu\text{g mL}^{-1}$, considered a promising activity. The isolated compounds were tested at 25 and $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, but they were inactive. Through the results it can be observed that the longer the exposure time, the lower the amount of essential oil to kill 50 % of the *A. aegypti* larvae, decreasing the LC_{50} . In addition, the compounds present in the EO act synergistically in the assessed activity. The cytotoxic concentration of EO for HeLa and Vero cells (266.8 ± 46.5 and $312.1 \pm 42.5 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectively) in 48 hours of exposure were higher than the LC_{50} , showing low cytotoxicity at concentration that shows larvicidal activity, resulting in a positive selectivity index. Therefore, the leaves of *E. calycina* are shown as a very promising source of natural product in larvicidal activity.

Keywords: *Eugenia calycina*. Sesquiterpenes. *Aedes aegypti*. Isolated compounds.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estruturas de alguns compostos naturais presentes em inseticidas.....	16
Figura 2 - Estruturas dos <i>terpenoides</i> com atividade larvicida.....	16
Figura 3. Unidade de isopreno e exemplos de compostos terpênicos encontrados em óleos essenciais.....	18
Figura 4. Rota biossintética de formação do precursor DMAPP dos terpenos através da condensação de moléculas acetil-SCoA.....	19
Figura 5. Rota biossintética de formação do precursor DMAPP dos terpenos mediada pela coenzima TPP.....	20
Figura 6. Esquema de formação de monoterpenos a partir do geranyl difosfato.....	22
Figura 7 Esquema de formação dos sesquiterpenos a partir do farnesil pirofosfato.....	23
Figura 8. Esquema de formação de diterpenos a partir do farnesil pirofosfato.....	24
Figura 9. Fotografia da planta e do fruto de <i>E. calycina</i>	27
Figura 10. Alguns terpenos identificados em espécies de <i>Eugenia</i>	30
Figura 11. Esquema representativo dos estágios de vida do <i>A. aegypti</i>	35
Figura 12. Fotografia dos ovos de <i>A. aegypti</i> depositados em uma placa de madeira.....	36
Figura 13. Fotografia do aparelho de Clevenger utilizado na extração do óleo essencial de <i>E. calycina</i>	39
Figura 14. Fotografia do óleo essencial obtido da <i>E. calycina</i>	40
Figura 15. Fluxograma de fracionamento do óleo essencial de <i>E. calycina</i>	42
Figura 16. Fotografia do insetário da DIVAL com cepa Rockfeller.....	43
Figura 17. Fotografia do processo de contagem dos ovos de <i>Aedes aegypti</i> através de microscópio.....	44
Figura 18. Fotografia da cuba de vidro com os ovos de <i>A. aegypti</i>	44
Figura 19. Fotografia do sistema de dessecação dos ovos de <i>A. aegypti</i>	45
Figura 20. Fotografia das larvas sendo transferidas para bandeja com água declorada.....	45
Figura 21. Fotografia das larvas sendo alimentadas com ração.....	46
Figura 22. Fotografia do ensaio larvicida em copos descartáveis contendo larvas de terceiro estágio.....	46
Figura 23. Fotografia da placa de 96 poços utilizada na análise de citotoxicidade...48	

Figura 24. Perfil cromatográfico de CG-DIC do óleo essencial de <i>E. calycina</i>	49
Figura 25. Estruturas das moléculas identificadas por CG-EM no óleo essencial de <i>E. calycina</i>	51
Figura 26. Compostos com esqueleto (núcleo básico) selinano.....	53
Figura 27. Rotas biossintéticas para a formação de alcoóis sesquiterpênicos.....	54
Figura 28. Cromatograma de CG-DIC da fração MVM_4.....	56
Figura 29. Estrutura do espatulenol.....	57
Figura 30. Espectro do CG-EM do espatulenol.....	59
Figura 31. Propostas de fragmentações para o espatulenol.....	59
Figura 32. Cromatograma de CG-DIC da fração MVM_11-F65-69.....	60
Figura 33. Cromatograma de CG-DIC da fração MVM_12-F70-72.....	60
Figura 34. Estrutura do 4 β ,10 α -aromadendranodiol.....	61
Figura 35. Espectro de CG-EM do 4 β ,10 α -aromadendranodiol.....	63
Figura 36. Propostas de fragmentações para o 4 β ,10 α -aromadendrano diol.....	63
Figura 37. Propostas de rotas biossintéticas para formação do espatulenol e 4 β ,10 α -aromadendranodiol.....	65
Figura 38. Cromatograma de CG-DIC da da fração MVM_10.....	66
Figura 39. Estrutura do 1 β ,11-dihidróxi-5-eudesmeno.....	66
Figura 40. Espectro de CG-EM do 1 β ,11-dihidróxi-5-eudesmeno.....	69
Figura 41. Propostas de fragmentações para o 1 β ,11-dihidróxi-5-eudesmeno.....	70
Figura 42. Gráfico para o cálculo do CL ₅₀ após 24 horas de exposição.....	72
Figura 43. Gráfico para o cálculo do CL ₅₀ após 48 horas de exposição.....	72
Figura 44. Gráfico para o cálculo do CL ₅₀ após 72 horas de exposição.....	72
Figura 45. Reação de conversão da resasurina em resofurina.....	77
Figura 46. Placa de 96 poços utilizada na análise de citotoxicidade após 24 horas de incubação com o óleo essencial.....	77
Figura 47. Placa de 96 poços utilizada na análise de citotoxicidade após 48 horas de incubação com o óleo essencial.....	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Atividades biológicas de óleos essenciais e seus constituintes majoritários.....	25
Tabela 2. Rendimentos (%) de extração de óleos essenciais de espécies de <i>Eugenia</i> e seus constituintes majoritários.....	29
Tabela 3. Estágios de vida do <i>A. aegypti</i>	34
Tabela 4. Tempos de retenção dos alcanos utilizados para o cálculo do índice aritmético na análise por GC-EM.....	41
Tabela 5. Códigos das frações utilizadas neste trabalho	42
Tabela 6. Rendimento (%) de óleo essencial espécies de Myrtaceae.....	49
Tabela 7. Composição do óleo essencial de <i>E. calycina</i> identificada por CG-EM.....	50
Tabela 8. Atribuição dos deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C no espectro de RMN do espatulenol e comparação com a literatura.....	58
Tabela 9. Atribuição dos deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C no espectro de RMN do $4\beta,10\alpha$ -aromadendranodiol e comparação com a literatura.....	62
Tabela 10. Atribuição dos deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C no espectro de RMN do $1\beta,11$ -dihidróxi-5-eudesmo e comparação com a literatura.....	68
Tabela 11. Equações realizadas para o cálculo do CL_{50}	73
Tabela 12. CL_{50} de 24 horas de exposição frente a larvas de <i>A. aegypti</i> de óleos essenciais de espécies de Myrtaceae.....	73
Tabela 13. CL_{50} de 24 horas de exposição frente a larvas de <i>A. aegypti</i> de compostos.....	75
Tabela 14. Resultados da concentração citotóxica (CC_{50}) em 24 e 48 horas frente as células HeLa e Vero e da concentração letal (CL_{50}) contra larvas de <i>A. aegypti</i> do óleo essencial das folhas de <i>E. calycina</i> avaliada	78
Tabela 15. Índice de seletividade do óleo essencial das folhas de <i>E. calycina</i> avaliada em 24 e 48 horas.....	79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Acetil-SCoa	Acetil coenzima A
HMG-CoA	β -hidróxi- β -metilglutaril coenzima A
IPP	Isopentilpirofosfato
DMAPP	Dimetil alil pirofosfato
TPP	Tiamina difosfato
TPP-enamina	Enamina de tiamina difosfato
Ilida de TPP	Ilida de tiamina difosfato
DXP	1-Deóxi-D-xilulose-5-fosfato
GPP	Geranil difosfato
NPP	Neril difosfato
LPP	Linalil difosfato
FPP	Farnesil difosfato
CC ₅₀	Concentração citotóxica para inibir o crescimento celular
IS	Índice de seletividade
CIM	Concentração inibitória mínima
CG-EM	Cromatógrafo gasoso acoplado a espectrometria de massas
CG-DIC	Cromatógrafo gasoso acoplado a detector por ionização de chama
IA	Índice aritmético
CL ₅₀	Concentração letal para matar 50% das larvas
DMSO	Dimetilsulfóxido
DIVAL	Divisão de Vigilância Ambiental
UV	Ultravioleta
NIST	National Institute of Standard and Technology
NuPPeN	Núcleo de Pesquisas em Produtos Naturais
UFU	Universidade Federal de Uberlândia
CCD	Cromatografia em camada delgada
RMN	Ressonância magnética nuclear
OE	Óleo essencial
UnB	Universidade de Brasília
Vero	Célula de rim de macaco
HeLa	Célula de carcinoma humano (colo de útero)

SUMÁRIO

1.0 Introdução	15
1.1 Referencial teórico.....	15
1.2 Metabólitos essenciais de plantas: óleo essencial.....	17
1.3 Atividades biológicas de óleos essenciais.....	25
2.0 Características da <i>Eugenia calycina</i> e do gênero <i>Eugenia</i>	26
2.1 Compostos identificados nos óleos essenciais do gênero <i>Eugenia</i>	28
2.2 Atividades biológicas do gênero <i>Eugenia</i>	31
2.3 Doenças relacionadas ao <i>Aedes aegypti</i>	32
2.4 Descrição do <i>Aedes aegypti</i>	33
3.0 Objetivo geral	37
3.1 Objetivos específicos.....	37
4.0 Procedimento experimental	37
4.1 Materiais.....	37
4.2 Equipamentos.....	37
4.3 Material vegetal.....	38
4.3.1 Obtenção dos óleos essenciais.....	38
4.3.2 Obtenção dos óleos essenciais.....	38
4.3.3 Análise dos óleos essenciais.....	40
4.3.4 Fracionamento do óleo essencial de <i>Eugenia calycina</i>	41
4.3.5 Reagente de prospecção fitoquímica utilizado.....	43
4.4 Ensaio larvicida frente ao <i>Aedes aegypti</i>	43
4.4.1 Coleta dos ovos.....	43
4.4.2 Análise larvicida.....	44
4.4.3 Atividade citotóxica.....	47
4.4.3.1 Preparo do meio de cultura.....	47
4.4.3.2 Cultura de células.....	47
4.4.3.3 Preparo das amostras e teste de viabilidade celular.....	47
4.4.3.4 Análise estatística.....	48
5.0 Resultados e Discussão	49
5.1 Óleos essenciais.....	49
5.2 Fracionamento do óleo essencial das folhas de <i>E. calycina</i>	55

5.2.1 Identificação das substâncias isoladas do óleo essencial das folhas de <i>E. calycina</i>	55
5.2.1.1 Identificação do Espatuleno.....	55
5.2.1.2 Identificação do 4 β ,10 α -aromadendranodiol.....	60
5.2.1.3 Identificação do 1 β ,11-dihidróxi-5-eudesmeno.....	66
5.3 Atividade larvívica do óleo essencial de <i>E. calycina</i> frente ao <i>Aedes aegypti</i>	71
5.4 Avaliação da atividade citotóxica.....	76
6.0 Conclusões	81
Referências	82
Apêndice A. Espectro de RMN de ^1H do espatulenol (400 MHz; CDCl_3).....	100
Apêndice B. Expansão da região entre 0,44 a 0,70 ppm do espectro de RMN de ^1H do espatulenol (400 MHz; CDCl_3).....	101
Apêndice C. Espectro de RMN ^{13}C do espatulenol (100 MHz, CDCl_3).....	102
Apêndice D. Espectro de RMN DEPT-135 do espatulenol (100 MHz, CDCl_3).....	103
Apêndice E. Mapa de contorno de gHSQC do espatulenol.....	104
Apêndice F. Expansão da região entre 4,60 a 4,7 ppm do mapa de contorno do gHSQC do espatulenol.....	105
Apêndice G. Expansão da região entre 0,72 a 0,43 ppm do mapa de contorno de gHSQC do espatulenol.....	106
Apêndice H. Expansão da região entre 1,02 a 1,30 ppm do mapa de contorno de gHSQC do espatulenol.....	107
Apêndice I. Espectro de RMN de ^1H do 4 β ,10 α -aromadendranodiol (400 MHz; CDCl_3).....	108
Apêndice J. Expansão da região entre 1,24 a 0,38 ppm do espectro de RMN de ^1H do 4 β ,10 α -aromadendranodiol (400 MHz; CDCl_3).....	109
Apêndice K. Espectro de RMN ^{13}C do 4 β ,10 α -aromadendranodiol (100 MHz, CDCl_3).....	110
Apêndice L. Espectro de RMN DEPT-135 do 4 β ,10 α -aromadendranodiol (100 MHz, CDCl_3).....	111
Apêndice M. Mapa de contorno de gHSQC do 4 β ,10 α -aromadendranodiol.....	112
Apêndice N. Expansão da região entre 1,24 a 1,02 ppm do mapa de contorno de gHSQC do 4 β ,10 α -aromadendranodiol.....	113

Apêndice O. Expansão da região entre 0,66 a 0,38 ppm do mapa de contorno de gHSQC do 4 β ,10 α -aromadendranodiol.....	114
Apêndice P. Espectro de RMN de ¹ H do 1 β ,11-dihidróxi-5-eudesmeno (400 MHz; CDCl ₃).....	115
Apêndice Q. Espectro de RMN ¹³ C do 1 β ,11-dihidróxi-5-eudesmeno (100 MHz, CDCl ₃).....	116
Apêndice R. Espectro de RMN DEPT-135 do 1 β ,11-dihidróxi-5-eudesmeno (100 MHz,CDCl ₃).....	117
Apêndice S. Mapa de contorno de gHSQC do 1 β ,11-dihidróxi-5-eudesmeno.....	118
Apêndice T. Expansão da região entre 5,60 a 3,30 ppm do mapa de contorno de gHSQC do 1 β ,11-dihidróxi-5-eudesmeno.....	119
Apêndice U. Expansão da região entre 1,20 a 1,05 ppm do mapa de contorno de gHSQC do 1 β ,11-dihidróxi-5-eudesmeno.....	120

1.0 INTRODUÇÃO

1.1 Referencial teórico

Historicamente os produtos naturais têm sido usados no tratamento de diversas doenças. As metodologias clássicas de química de produtos naturais bem como a utilização de técnicas hifenadas permitiram a identificação de vários metabólitos secundários bioativos de fontes naturais (DIAS; URBAN; ROESSNER, 2012).

Em um estudo realizado por Newman e Craig (2016) a respeito da origem dos fármacos descobertos entre 1981 e 2014, mostra que 74% dos medicamentos desenvolvidos tem sua origem em produtos naturais (NEWMANN; CRAGG, 2016).

O estudo de produtos naturais obtidos de plantas com atividade contra *Aedes aegypti* é recente. Na literatura são encontrados estudos referentes ao extrato bruto e aos óleos essenciais. Muitos destes compostos são conhecidos, mas existem outros no qual não se conhece o composto responsável por tal atividade (GARCEZ et al.,2013).

O mosquito *Aedes aegypti* é um vetor responsável por diversas doenças como dengue, dengue hemorrágica, febre amarela, chikungunya e zika e que são consideradas um grande problema de saúde mundial, principalmente em países tropicais, que apresentam condições propícias para a proliferação do inseto. A estratégia mais adotada para minimizar a disseminação dessas doenças reside no controle da população de larvas deste mosquito. O uso de inseticidas sintéticos tem gerado populações de mosquitos resistentes, bem como prejuízos ao ser humano, o que estimulou a busca de métodos alternativos para o controle dos mesmos (GARCEZ et al.,2013).

Os inseticidas botânicos são produtos naturais derivados de plantas que são utilizados no controle de pragas. Eles diferem em suas composições e possuem modos de ação distintos. Estes compostos agem por ação tóxica, repelente e antialimentar, destruindo os tecidos e interferindo nos processos de desenvolvimento da síntese proteica e da respiração, causando retardo e paralisia, matando o inseto por intoxicação (BUSS e PARK-BROWN, 2002).

Na Figura 1 são apresentadas algumas estruturas de compostos naturais utilizados como larvicidas. Além destes, foram relatados na literatura com forte atividade larvicida um monoterpeno, dois sesquiterpenos e seis diterpenos extraídos de óleos essenciais detentores de tal atividade (Figura 2) (GARCEZ et al.,2013).

A crescente pressão da agropecuária e a extração predatória de carvão têm gerado novas áreas de desmatamento levando à extinção progressiva dos recursos naturais. A correlação desses fatores situa o Cerrado como um *hotspot* de biodiversidade e desperta uma atenção especial para a conservação dos seus recursos naturais (MEDEIROS, 2011).

Neste contexto, este trabalho avaliou a atividade larvicida do óleo essencial das folhas de *Eugenia calycina* contra as larvas de 3º estágio de *Aedes aegypti*, que é endêmica do Cerrado. Além disso, a composição química do óleo essencial foi identificada e foram isolados três compostos, sendo que dois deles são inéditos na espécie *E. calycina*. Até o momento na literatura existe apenas um estudo com o óleo essencial das folhas desta espécie contra bactérias da cavidade oral (SOUSA et al., 2015). A maioria dos estudos com relação a *Eugenia calycina* está relacionada com informações botânicas (QUEIROZ et al., 2015). Dessa forma, o estudo da composição química do óleo essencial da espécie *E. calycina* é de extrema importância para fornecer conhecimento sobre a espécie, bem como propor um produto de origem natural com atividade larvicida contra *Aedes aegypti*.

1.2 Metabólitos secundários de plantas: óleo essencial

Os óleos essenciais pertencem ao metabolismo secundário das plantas e são misturas de substâncias voláteis, onde seus componentes majoritários são substâncias terpênicas, como mono e sesquiterpenos. Alguns compostos minoritários de cadeia longa como alcanos (SOUZA-FILHO et al., 2009), álcoois e ésteres (STEFANELLO; CERVI; WISNIEWSKI JR., 2005) também podem ser encontrados nos mesmos.

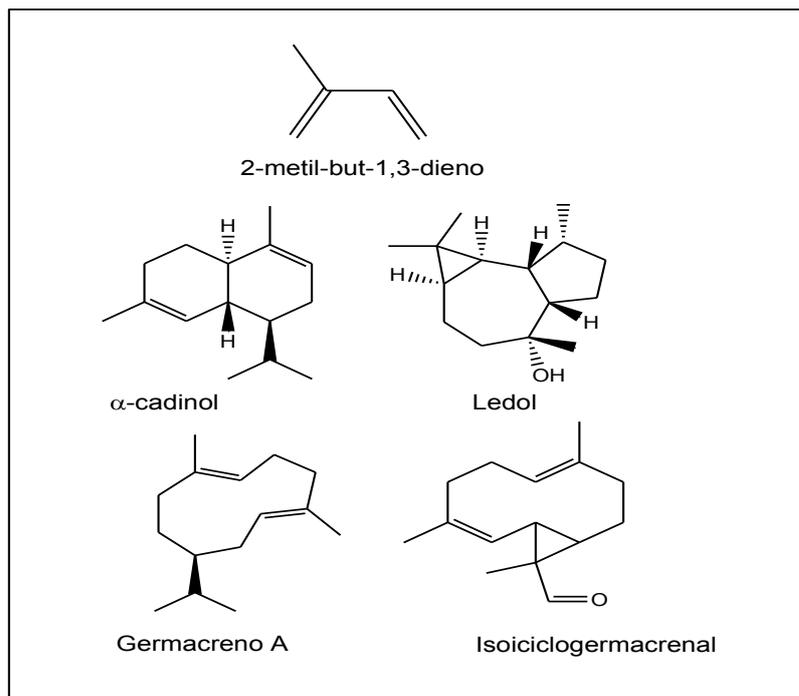
Estes compostos podem ser extraídos dos vegetais através de várias técnicas como a hidrodestilação, gases supercríticos e micro-ondas (SANTOS et al, 2004). Na técnica por gases supercríticos, o óleo essencial pode ser extraído com gás carbônico supercrítico (MELO; ULLER; PESSOA, 1997). Na técnica por micro-ondas, a transferência de energia é a principal característica dessa extração, no qual a mesma é transferida para a amostra por fenômenos de convecção, condução e radiação. A energia de micro-ondas é passada diretamente para o material vegetal através de interações moleculares com o campo magnético por intermédio da conversão de energia eletromagnética em energia térmica (MOVALIYA, 2017).

Na técnica por hidrodestilação o material bruto da planta é colocado em um aparelho de destilação sobre água aquecida, o óleo essencial é transportado com o fluxo de vapor de água à medida que o vapor passa através do material vegetal permeando nas estruturas das folhas (ORIO et al., 2012).

Tanto a atividade biológica quanto as fragrâncias observadas nos óleos essenciais, fazem com que sejam muito utilizados em indústrias farmacêuticas e em perfumarias agregando valor comercial ao produto final. Alguns fatores como índice pluviométrico, sazonalidade, temperatura e altitude influenciam na composição e no teor dos óleos essenciais biossintetizados pelos vegetais (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Os terpenos, componentes dos óleos essenciais, são compostos orgânicos responsáveis pelo odor que as plantas exalam e estão presentes em inúmeras espécies. Eles são sintetizados nas plantas através da junção de duas unidades isoprênicas, constituídas de cinco átomos de carbono. Estes são classificados como monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15) e sesquiterpenos (C20) (VOLLHARDT; NEIL, 2013). Na Figura 3 são mostradas as unidades isoprênicas e alguns exemplos de compostos terpênicos presentes em óleos essenciais.

Figura 3. Unidade de isopreno e exemplos de compostos terpênicos encontrados em óleos essenciais.

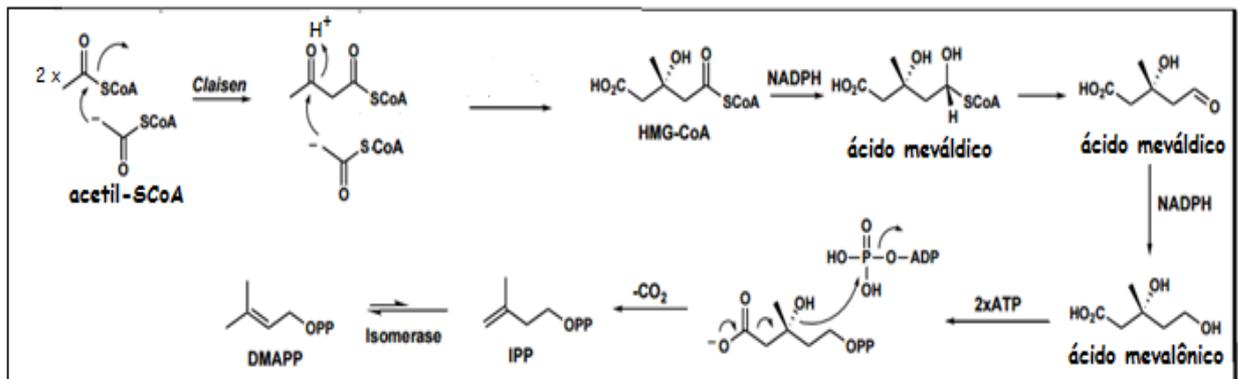


Fonte: O autor.

A biossíntese dos constituintes terpênicos ocorre no citoplasma das plantas e na maioria dos seres eucariontes e algumas eubactérias (DEWICK, 2002). Na literatura são encontradas duas propostas de mecanismos para gerar o precursor destes compostos. A primeira delas é a rota do mevalonato que representa a etapa inicial para que a reação enzimática aconteça.

Primeiramente ocorre uma condensação de Claisen entre duas moléculas de acetil-S-CoA. Na sequência, uma terceira molécula de acetil-S-CoA é adicionada à molécula inicial através de uma reação aldólica transformando-se em β -hidróxi- β -metilglutaril-CoA. Este, por sua vez, sofre redução enzimática pela molécula de NADPH originando o ácido mevalônico. Neste ocorrerão três fosforilações nos grupos hidroxilas, seguida de descarboxilação afim de formar o isopentilpirofosfato (IPP). A enzima isomerase converte o IPP em dimetililpirofosfato (DMAPP) (DEWICK, 2002). A Figura 4 mostra os mecanismos para a formação do precursor dos compostos terpênicos.

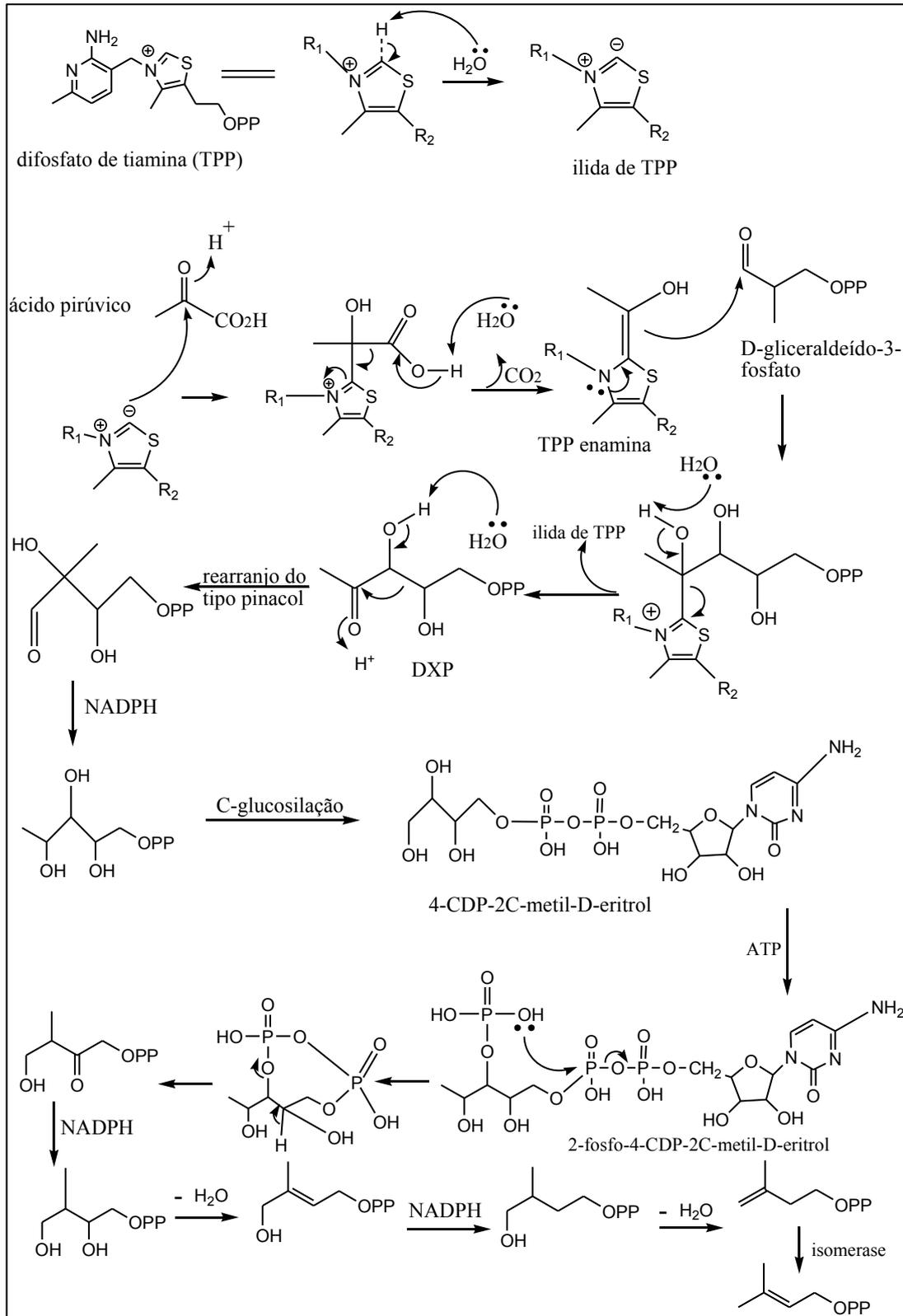
Figura 4. Rota biossintética de formação do precursor DMAPP dos terpenos através da condensação de moléculas acetil-S-CoA.



Fonte: Adaptado de Dewick, 2002.

Outra rota biossintética abordada na literatura a respeito da formação do IPP é mediado pela coenzima tiamina difosfato (TPP) (Figura 5).

Figura 5. Rota biossintética de formação do precursor DMAPP dos terpenos mediada pela coenzima TPP

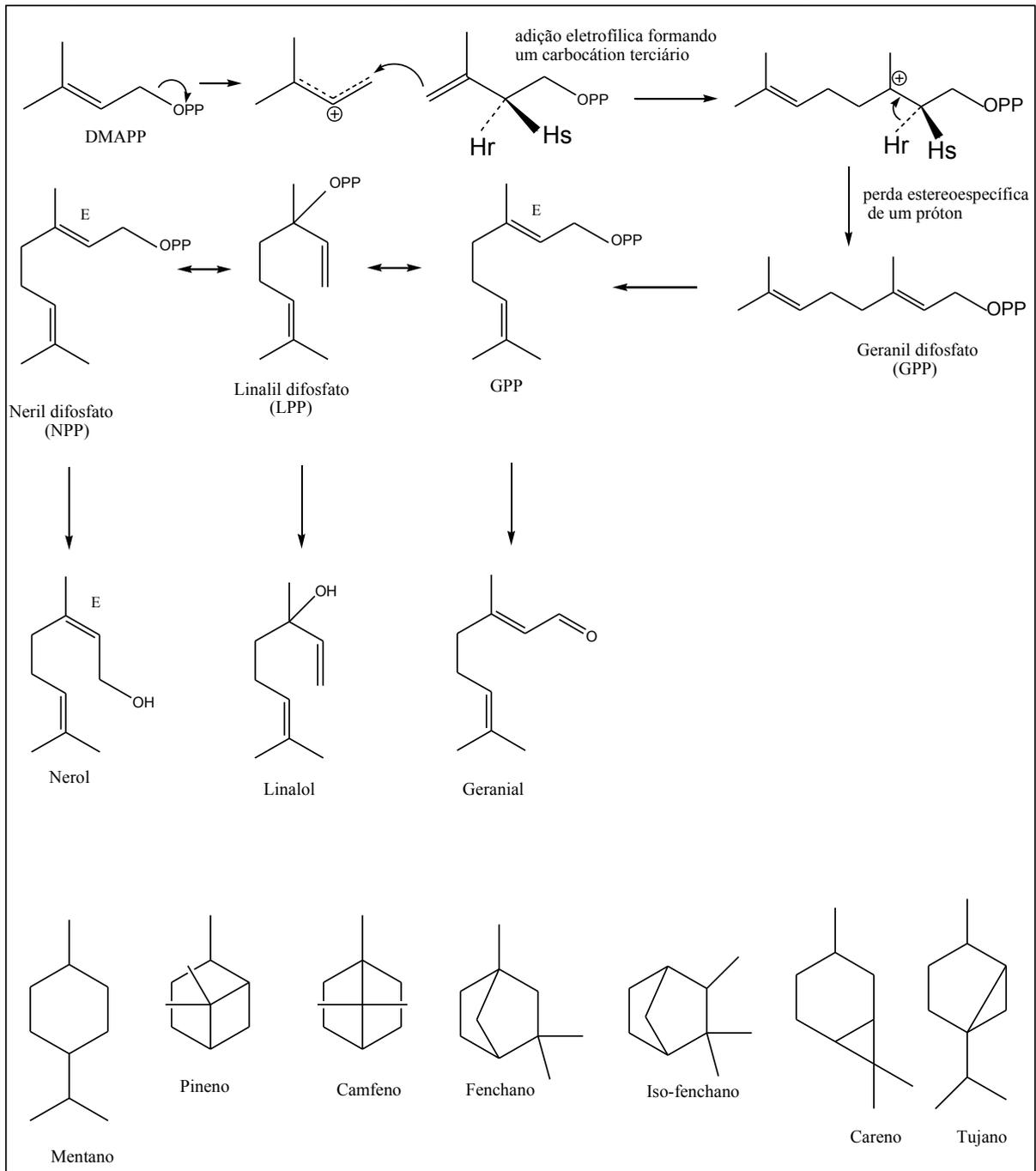


Fonte: Adaptado de Dewick, 2002.

Inicialmente o TPP está com uma carga positiva no átomo de nitrogênio, mas, quando uma base retira o hidrogênio mais ácido da estrutura (entre os átomos de nitrogênio e enxofre), o composto é estabilizado e se torna neutro, gerando a ilida de TPP. Esta irá reagir com uma molécula de ácido pirúvico, seguida descarboxilação para formar a TPP-enamina. Ocorrerá então uma condensação aldólica entre a TPP-enamina e uma molécula de D-gliceraldeído-3-fosfato. Sendo assim, uma base irá retirar outro hidrogênio ácido da molécula, liberando a ilida de TPP e originando a 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato (DXP). Através de um rearranjo do tipo pinacol a DXP é convertida em pinacolona, seguida de redução com NADPH, formando o 2-C-metil-D-eritrol-4-fosfato. Este sofre uma C-glucosilação originando o 4-CDP-2C-metil-D-eritrol, que ao reagir com uma molécula de ATP converte-se em 2-fosfo-4-CDP-2C-metil-D-eritrol (que possui um grupo fosfato no oxigênio central da molécula). Um destes oxigênios com o par eletrônico livre ataca o átomo de fósforo da cadeia lateral, formando um intermediário cíclico. Neste, um hidrogênio é retirado para formação do enolato, que por sua vez, transforma-se em uma cetona através do equilíbrio ceto-enólico. Esta cetona sofrerá uma redução com uma molécula de NADPH, seguido da perda sucessiva de duas moléculas de água para formar o IPP. Sendo assim, uma enzima isomerase irá converter o IPP em DMAPP, tornando-se o precursor para os compostos terpênicos. (DEWICK, 2002).

A combinação entre DMAPP e IPP, via enzima prenil-transferase gera o geranyl pirofosfato que é o precursor dos monoterpenos (C₁₀). Estes compostos também podem sofrer rearranjos, bem como ciclizações na própria estrutura originando novos tipos de esqueletos (Figura 6).

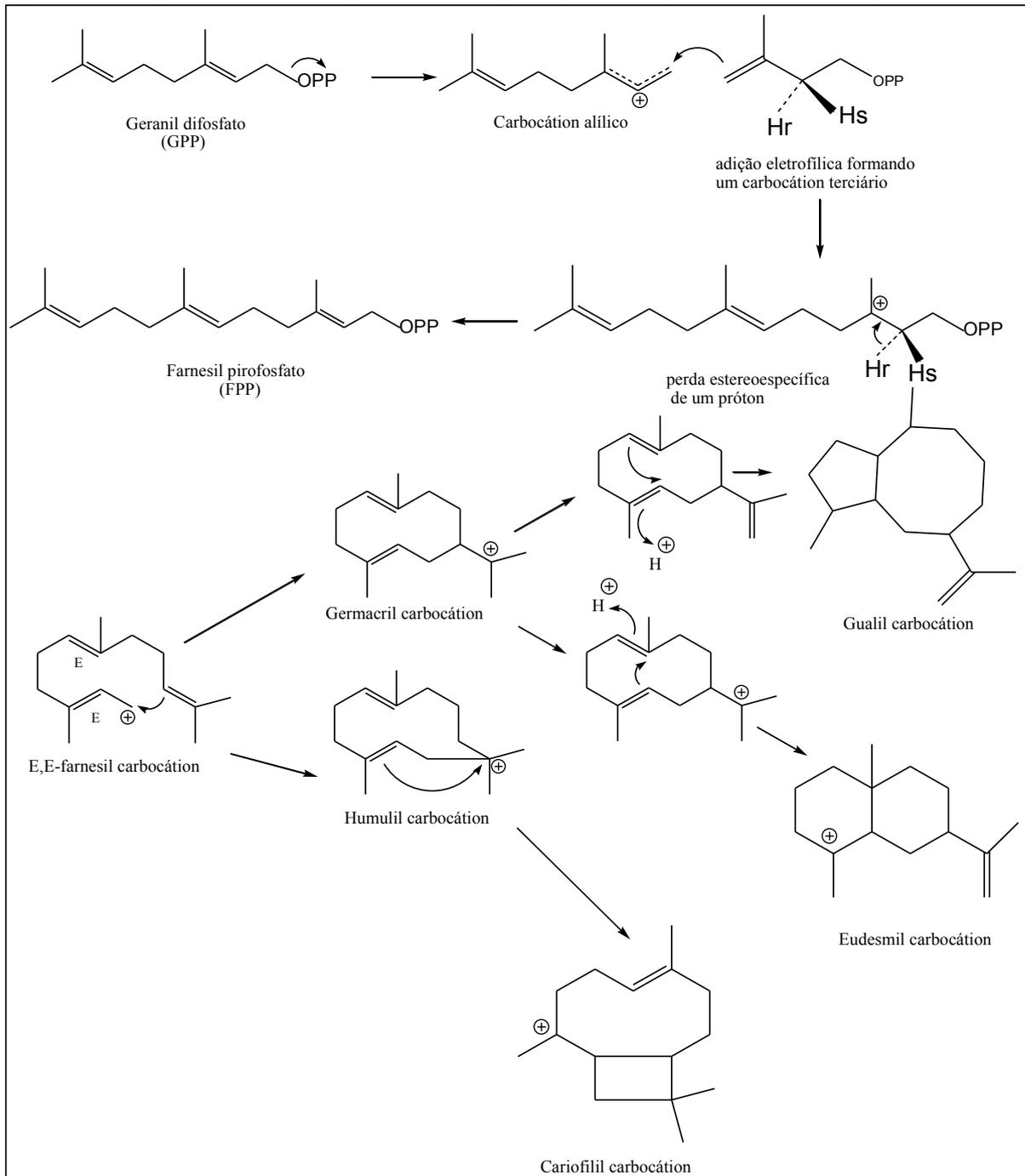
Figura 6. Esquema de formação de monoterpenos a partir do geranyl difosfato.



Fonte: Dewick, 2002.

A condensação com novas unidades de IPP origina as cadeias de farnesil difosfato (C15) originando sesquiterpenos, que podem se ciclar originando diversos tipos de carbocátion para formar novos esqueletos (Figura 7) (DEWICK, 2002).

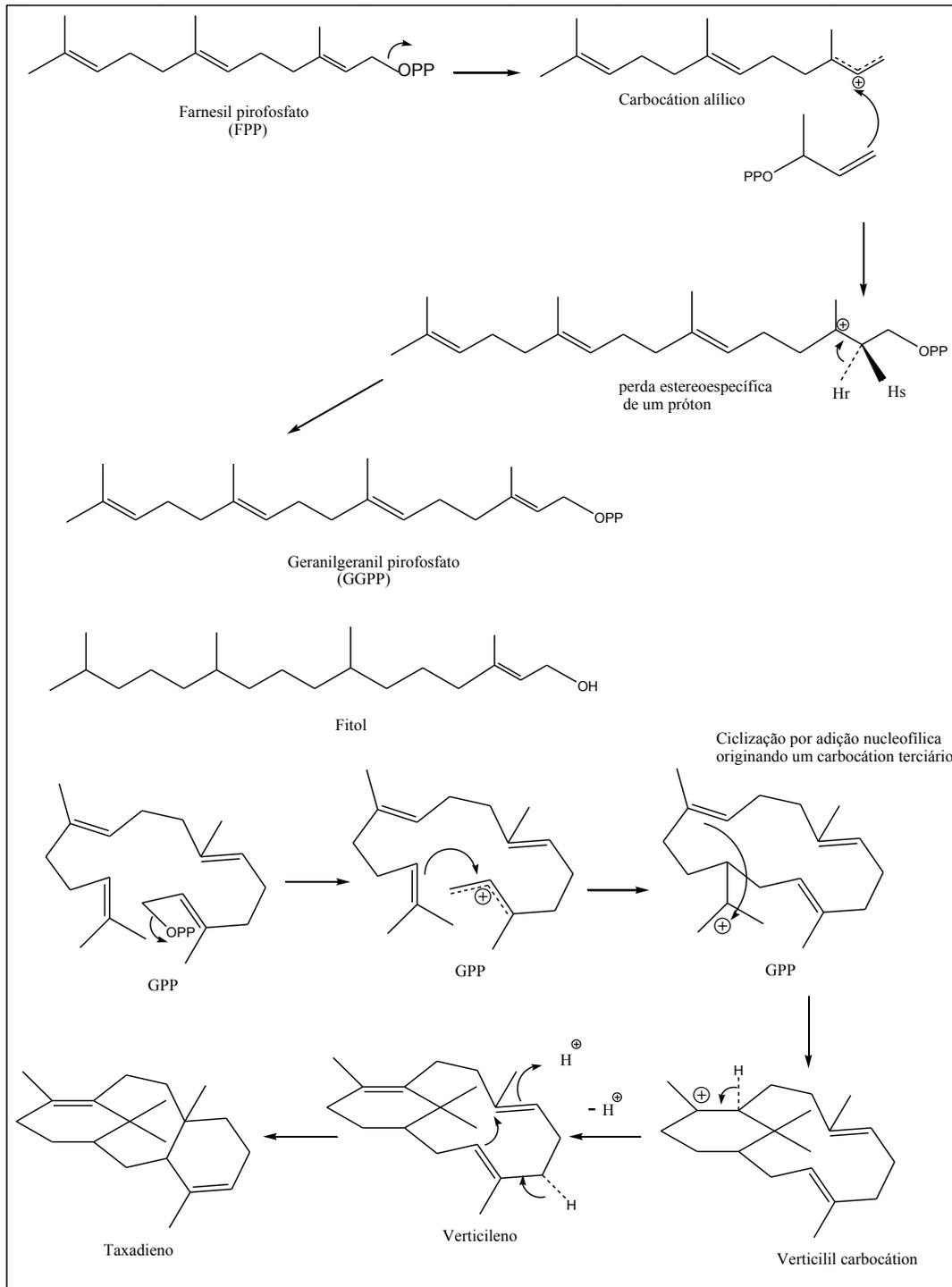
Figura 7. Esquema de formação dos sesquiterpenos a partir do farnesil pirofosfato.



Fonte: Dewick, 2002.

Para a formação dos diterpenos (C₂₀) é necessário que ocorra a condensação do geranil pirofosfato com uma unidade de DMAPP originando o farnesil pirofosfato (Figura 8). (DEWICK, 2002).

Figura 8. Esquema de formação de diterpenos a partir do farnesil pirofosfato.



Fonte: Dewick, 2002.

1.3 Atividades biológicas de óleos essenciais

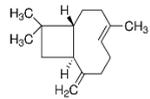
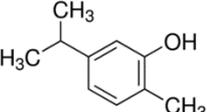
Os óleos essenciais possuem diversos tipos de atividades biológicas tais como analgésica, anti-inflamatória, fungicida (ALI et al., 2015), antimicrobiana, inseticida e antioxidante (PANDEY; SINGH, 2017) e larvicida frente ao *Aedes aegypti* (DIAS; MORAES, 2014).

De acordo com Carson, Mee e Riley (2002) os óleos essenciais demonstraram atividade antimicrobiana em bactérias patogênicas, provocando danos estruturais e funcionais resultando no rompimento da estrutura celular levando a morte.

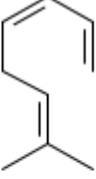
Os óleos essenciais que possuem atividade antioxidante (compostos fenólicos) podem ser utilizados na indústria alimentar como conservantes para aumentar a vida útil dos alimentos (MIHAL; POPA, 2013).

Na Tabela 1 se encontram alguns exemplos de atividades biológicas de óleos essenciais de diferentes famílias relatadas na literatura. Nesta, também é mostrado o constituinte volátil majoritário presente no óleo essencial das folhas da espécie.

Tabela 1. Atividades biológicas de óleos essenciais e seus constituintes majoritários. (continua)

Espécie	Família	Atividade	Constituinte majoritário	Referência
<i>Myrcia silvatica</i>	Myrtaceae	Larvicida <i>Artemia salina</i>	 (β-cariofileno)	ROSA et al., 2016.
<i>Campomanesia adamantium</i>	Myrtaceae	Antibacteriana <i>Streptococcus mutans</i> , <i>Streptococcus Mitis</i> , <i>Streptococcus sanguinis</i>	 (Espatuleno)	OLIVEIRA et al., 2016.
<i>Lippia origanoides</i>	Verbenaceae	Antibacteriana <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Salmonella Choleraesuis</i>	 (Carvacrol)	ALMEIDA et al., 2016.

(conclusão)

<i>Espécie</i>	Família	Atividade	Constituinte majoritário	Referência
<i>Bepharocalyx salicifolius</i>	Myrtaceae	Antibacteriana <i>S. aureus</i> <i>E. coli</i>	 (1,8-cineol)	LIMBERGER, 2001.
<i>Ferulado carduchorum</i>	Apiaceae	Fungicida <i>Candida albicans</i>	 (Z-(β)-ocimeno)	GOLFAKHRABADI et al., 2015.

Fonte: O autor.

O desenvolvimento da resistência microbiana aos medicamentos existentes é um problema global. Sendo assim, a avaliação de produtos naturais para o controle de agentes patogênicos pode servir de potencial alternativa para o controle antimicrobiano (SILVA et al., 2010).

2.0 Características da *Eugenia calycina* e do gênero *Eugenia*

Eugenia calycina Cambess. (Figura 9) é uma planta arbustiva, popularmente conhecida como pitanga-vermelha ou pitanga-do-cerrado, que pertence à família Myrtaceae a qual compreende 100 gêneros e 3.500 espécies, encontradas nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. No Brasil, *E. calycina* já foi listada nas áreas de Cerrado (campo sujo) dos Estados de Goiás, Minas Gerais e Distrito Federal e transição cerrado-vereda (RIBEIRO; RODRIGUES, 2006).

Figura 9. Fotografia da planta e do fruto de *E. calycina*.



Fonte: O autor.

De acordo com Forzza et al. (2010) o gênero *Eugenia* possui 356 espécies, sendo que 274 são endêmicas, sendo localizadas em áreas florestais.

Os gêneros que mais se destacam com relação ao número de espécies são *Piper*, *Solanum*, *Psychotria* e *Eugenia* (FRODIN, 2004). O gênero *Eugenia* é um dos mais importantes da família Myrtaceae e é originário do sudeste da África (MERWE; WYK; BOTHA, 2005).

Em um levantamento realizado na Estação Ecológica do Panga em Uberlândia, Minas Gerais, foram identificadas 36 espécies da família Myrtaceae, sendo que os gêneros mais numerosos foram *Eugenia* e *Myrcia*, com 12 e 9 representantes, respectivamente (ARANTES; MONTEIRO, 2002).

Outras espécies como *Eugenia egensis* DC., *Eugenia florida* DC., *Eugenia hyemalis* Cambess., *Eugenia klappenbachiana* Mattos & D. Legrand, *Eugenia moraviana* O. Berg, *Eugenia pyriformis* Cambess., *Eugenia ramboi* D. Legrand, *Eugenia repanda* O. Berg., *Eugenia sulcata* Spring. ex Mart. e *Eugenia uniflora* L foram encontradas nos estados de Mato Grosso do Sul e Paraná apresentando uma vegetação ripária, com floração e frutificação nos meses de setembro e novembro (ROMAGNOLO; SOUZA, 2006).

De acordo com Romagnolo e Souza (2006), o gênero *Eugenia* possui indivíduos na forma de arbusto e de árvore e as flores difundidas em racemos, além dos estames numerosos e dos frutos carnosos que exibem coloração alaranjada, amarelada ou vermelha quando maduros. De acordo com Arantes e Monteiro (2002) a espécie *E. calycina* pode chegar a medir 1,5 m de altura.

2.1 Compostos identificados no óleo essencial do gênero *Eugenia*

Os óleos essenciais das espécies de *Eugenia* são caracterizados por uma grande diversidade química. Mais de 300 compostos foram encontrados nesta espécie com predominância de sesquiterpenos cíclicos, seguido de uma fração minoritária de monoterpenos. Algumas espécies também podem produzir compostos aromáticos. O sesquiterpeno β -cariofileno e o monoterpeno α -pineno são os mais abundantes (STEFANELLO; PASCOAL; SALVADOR, 2011).

Na Tabela 2 se encontram alguns exemplos de espécies de *Eugenia* com seus respectivos rendimentos de óleo essencial, bem como os compostos majoritários presentes.

Em um estudo realizado com as folhas da espécie de *Eugenia uruguayensis*, mostrou que dentre os 60 compostos identificados, o óleo essencial era composto fundamentalmente de limoneno, 1,8-cineol, α -pineno e óxido de cariofileno (LORENZO; MONDELLO; COTRONEL, 1997).

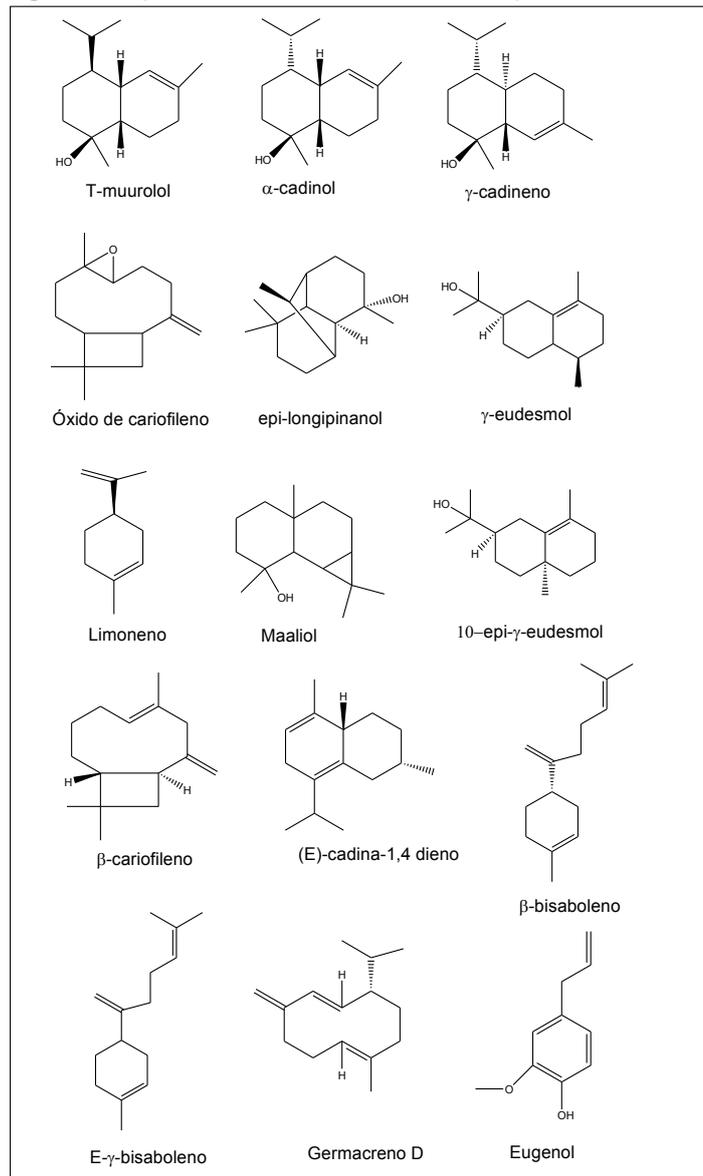
Além disso, o óleo essencial de *Eugenia punctifolia* mostrou alguns constituintes voláteis como os monoterpenos linalol, isoborneol, terpinen-4-ol, α -terpineol e os sesquiterpenos elemol e α -cadinol listados pela primeira vez nesta espécie (OLIVEIRA; DIAS; CÂMARA, 2005) e o de *Eugenia ptyasema*, o diterpeno fitol como majoritário (TENFEN et al., 2015). A Figura 10 mostra as estruturas de alguns compostos terpênicos identificados nas espécies *Eugenia*.

Tabela 2. Rendimentos (%) de extração de óleos essenciais de espécies de *Eugenia* e seus constituintes majoritários.

Espécie de Eugenia	Parte da planta	Rendimento (%)	Compostos majoritários	Referência
<i>E. uniflora</i>	Folhas	0,1%	curzereno, germacreno B, viridiflorol e χ -muuroleno	LAGO et al., 2011
<i>E. banderensis</i>	Folhas	0,01%	τ -muurolol, α -cadinol, χ -cadineno e óxido de cariofileno	BELLO et al., 1995
<i>E. langsdorfii</i>	Folhas	0,05%	epi-longipinanol, χ -eudesmol, limoneno e maaliol.	MORAES et al., 2012
	Frutos	0,06%	10-epi- χ -eudesmol, óxido de cariofileno e χ -eudesmol.	
<i>E. egensis</i>	Partes aéreas	2,5%	β -cariofileno, (E)-cadina-1,4-dieno	SILVA et al., 2017
<i>E. flavescens</i>		1,0%	β -bisaboleno, (E)- χ -bisaboleno	
<i>E. patrisii</i>		0,7%	germacreno D e δ -cadineno	
<i>E. polystachia</i>		1,0%	germacreno D e ishwarano	
<i>E. caryophyllata</i>	Fruta	7,05%	eugenol e acetato de eugenila	SOHILAIT, J. H., 2015
	Folhas	3,21%	eugenol e β -cariofileno	
	Galhos	3,58%	eugenol	

Fonte: O autor.

Figura 10. Alguns terpenos identificados em espécies de *Eugenia*.



Fonte: O autor.

No trabalho realizado por Cole, Haber e Setzer (2007) os perfis da composição do óleo essencial das folhas de sete espécies do gênero *Eugenia* (*Eugenia austinsmithii*, *Eugenia cartagensis*, *Eugenia haberi*, *Eugenia monteverdensis*, *Eugenia zuchowskiae*, *Eugenia sp. A aff. haberi*, e *Eugenia sp. B aff. oerstediana*) foram comparados, sendo mostrada a presença majoritária de α -copaeno, β -cariofileno, α -humuleno, χ -cadineno, *trans*-nerolidol e torreyol.

Recentemente foi publicada a identificação de vários constituintes do óleo essencial das folhas de *Eugenia uniflora* como os sesquiterpenos germacreno B, χ -elemeno, β -elemeno, germacreno D, χ -muuroleno e β -cariofileno (MESQUITA et al., 2017).

A caracterização do óleo essencial da espécie *Eugenia stitipata* mostrou em abundância o germacreno D, seguido de β -pineno e α -pineno (FRANCO; SHIBAMOTO, 2000). O α -cadinol está presente em maior quantidade no óleo essencial de *Commiphora kua*, sendo que o mesmo exibiu atividade fungicida moderada frente a *Cladosporium cucumericum* (ALI et al., 2008).

2.2. Atividades biológicas do gênero Eugenia

O gênero *Eugenia* é conhecido por suas inúmeras propriedades terapêuticas utilizadas na medicina popular como hipotensivo, antigota, diurético, antimicrobiano e hipoglicemiante (TENFEN et al., 2015).

O óleo essencial das folhas de *Eugenia dysenterica* exibiu atividade antifúngica contra 22 variedades do gênero *Cryptococcus* (COSTA et al., 2000) e antidiarreica (GALHEIGO et al., 2015).

O óleo de *Eugenia caryophyllata* exibiu atividade antimicrobiana frente a *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Escheria coli* (NUÑES; AQUINO, 2012), atividade anticonvulsante em camundongos machos (POURGHOLAMI et al., 1999), atividade antioxidante ($IC_{50} = 0,2 \mu\text{g mL}^{-1}$) quando comparado com o padrão sintético hidróxitolueno dibutilado (BHT) ($IC_{50} = 11,5 \mu\text{g mL}^{-1}$), atividade antifúngica contra 53 fungos patogênicos (CHAIEB et al., 2007) e efeito ovicida e adulticida frente a *Pediculus captis*. (YANG et al., 2003).

A espécie *Eugenia hiemalis* apresentou atividade antimicoplásmica com CIM inferior a $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ contra as bactérias *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum*, *M. hominis* e *M. pneumoniae* (ZATELLI et al., 2015).

Outras 3 espécies de *Eugenia* apresentaram alta citotoxicidade em células HCT-116 (câncer de cólon), com CC_{50} de $10,3 \mu\text{g mL}^{-1}$ (*E. polystachya*), $13,9 \mu\text{g mL}^{-1}$ (*E. flavescens*) e $16,4 \mu\text{g mL}^{-1}$ (*E. patrisii*) (SILVA et al., 2017). Na espécie *Eugenia uniflora* foi observada atividade fungicida contra *Candida lipolytica* e *Candida guilhermondii*, com CIM de 97,7 e $109,4 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente e atividade antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes* (VICTORIA et al., 2012).

Eugenia brasiliensis e *Eugenia umbelliflora* apresentaram atividade antimicrobiana com CIM de 119,2 e $156,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ frente a *S. aureus* (MAGINA et al., 2009).

Adicionalmente, estudos realizados com o óleo essencial e frações do óleo da espécie *Eugenia calycina* mostraram atividade contra bactérias da cavidade oral com CIM's entre 50 e 400 µg mL⁻¹ (SOUSA et al., 2015).

2.3 Doenças relacionadas ao *Aedes aegypti*

A dengue é uma doença que afeta os países subdesenvolvidos, uma vez que quando o abastecimento de água é precário, há necessidade de armazená-la em garrafas, latas e baldes com água potável facilitando a proliferação de criadouros do *Aedes aegypti*. Vários fatores influenciam na disseminação destes criadouros como por exemplo a carência de saneamento básico, bem como nos meios de transporte (TAUIL., 2001).

O vírus da dengue (para todos os tipos de sorotipo) e o da febre amarela, são denominados Flavivírus, pertencentes à família Flaviviridae e estão presentes nas espécies *A. albopictus* e *A. aegypti* (FIGUEIREDO et al., 1990).

Na literatura são descritos quatro tipos de sorotipos da dengue (DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4), o que eleva o risco de aparecimento de formas clínicas mais graves (PESSOA; FONTES; GABURO, 2005). De acordo com Barth (2000) os quatro sorotipos podem causar desde a forma clássica da doença quanto formas mais graves como a DEN-2 ou dengue hemorrágica.

Na literatura é dito que o sorotipo se refere a grupos de micro-organismos afins, isto é, causadores de uma mesma doença, sendo que cada um deles é determinado pela presença de um diferente antígeno. Por exemplo, se mais de um micro-organismo é responsável por causar a dengue, e eles podem ser detectados e distinguidos por métodos imunológicos, eles podem ser identificados como sorotipo 1, sorotipo 2 e assim por diante. No caso da dengue, existem 4 tipos identificados, chamados DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4. Cada sorotipo representa um conjunto de tipos de vírus que causam a mesma resposta imune no organismo. Assim, são reconhecidos 4 tipos semelhantes de vírus que causam o mesmo conjunto de sintomas que caracterizam a dengue". (O que Sorotipo, 2017)

Durante meados de 1980 e 1990 a transmissão epidêmica da dengue e da dengue hemorrágica foi intensificada nas Américas (GUBLER , 1998).

Inicialmente, o quadro clínico da dengue hemorrágica se assemelha com o da dengue clássica com o surgimento de pequenas erupções cutâneas. No terceiro dia ocorre o extravasamento de plasma provocando coagulação e inchaço, além do

sangramento de diversos órgãos como pulmão, cérebro e esôfago (LUPI; CARNEIRO; COELHO, 2007).

Uma outra doença causada pelo *Aedes aegypti* é a febre amarela que de acordo com Soper (1967), chegou de Havana ao Rio de Janeiro em 1928, e depois se espalhou para o restante do país. Os sintomas podem variar entre uma febre alta e cansaço, e, na forma mais grave, lesão hepática e renal, icterícia (olhos e pele amarelados) e hemorragia (GARDNER AND RYMAN, 2010).

O vírus da chikungunya também é transmitido para os seres humanos através da picada do *Aedes aegypti* (DUPONT-ROUZEYROL et al., 2012) ou do *Aedes albopictus*, e é caracterizada por uma síndrome febril, que afeta principalmente as extremidades corpóreas, bem como o aparecimento de erupções cutâneas (SCHWARTZ; ALBERT, 2010). A chikungunya é especificamente uma doença tropical que já fez mais de 1.400.000 vítimas desde seu aparecimento em 2006 (PIALOUX et al., 2007).

Além da dengue, febre amarela e da chikungunya, existe também o *Zika* vírus, que foi confirmado recentemente no Brasil e que é transmitido por mosquitos do gênero *Aedes*. Foi detectada a presença do RNA do *Zika* vírus em recém-nascidos com microcefalia (BOGOCH et al., 2016). Os sintomas mais comuns do *Zika* vírus são paralisia nas extremidades dos membros inferiores, mialgia difusa e paralisia facial bilateral (OEHLER et al., 2014).

Neste contexto pode-se observar que as doenças causadas por estes mosquitos são de preocupação global. Sendo assim faz-se necessário o uso de larvicidas provenientes de produtos naturais, que não tragam prejuízos ao ser humano, no combate a estes mosquitos.

2.4 Descrição do *Aedes aegypti*

A dengue é uma doença causada por arbovírus através dos mosquitos *Aedes* (*Stegomyia*), que possui forte impacto na saúde pública (MARCONDES, XIMENES, 2016).

Os *Aedes* do subgênero *Stegomyia* põe seus ovos fora da água, nas paredes internas e úmidas dos recipientes, em criadouros naturais (buracos em árvore, bromélias, internódios de bambu) e artificiais (representados por uma enorme variedade). A viabilidade dos ovos é mantida por um longo tempo, mesmo em épocas

secas e as fêmeas são hematófagas e se alimentam durante o dia (CONSOLI, OLIVEIRA, 1994).

O *Aedes aegypti* mostra algumas exigências com relação à qualidade da água, preferindo aquelas sem altos índices de poluição (LOPES et al.,1993). Mas estes mosquitos também têm a capacidade de se desenvolver em ambientes com elevados graus de poluição como em esgoto doméstico bruto, onde há alta concentração de material orgânico e praticamente zero de oxigênio dissolvido (BESERRA et al., 2009).

Somente as fêmeas de *Aedes aegypti* se alimentam de sangue para realizarem a oviposição. Quando se deseja capturar os ovos de *A. aegypti*, pode-se utilizar uma armadilha chamada de ovitrampa ou um papel filtro (numa gaiola de mosquitos) (GOMES; SCIAVICO; EIRAS, 2006).

Os ovos de mosquitos (Figura 11) têm aspecto alongado, com simetria bilateral envoltos por uma casca composta de 3 camadas: a vitelina interna (envolvendo o núcleo), o citoplasma e o vitelo (endocório endurecido e grosso) e o exocório (fino e transparente) protegendo a camada exterior. O embrião depende da conservação estrutura da casca para proteção mecânica, bem como passagem de gases respiratórios e resistência à perda de água (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994).

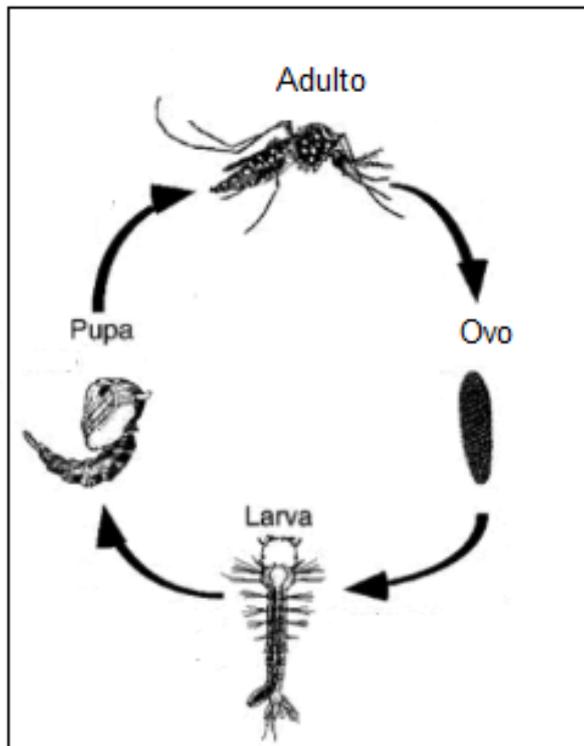
O tempo de amadurecimento do mosquito adulto depende de fatores ambientais como a temperatura, umidade e nutrição (CLEMONS et al.,2010). Na Tabela 3 e na Figura 11 são mostrados o ciclo de vida desde o estágio larval até a fase adulta deste mosquito.

Tabela 3. Estágios de vida do *A. aegypti*.

Estádio	Dias
Ovo – 1º estágio	1-2
2º estágio	3
3º estágio	4
4º estágio	7-8 (machos); 8-9 (fêmeas)
Pupa	7-9
Adulto	9 (machos); 10 (fêmeas)

Fonte: CLEMONS et al., 2010.

Figura 11. Esquema representativo dos estágios de vida do *A. aegypti*.



Fonte: Adaptado de (MUKTAR; TAMERAT e SHEWAFERA, 2016).

Os ovos de *Aedes* (Figura 12) são de cor branca pálida, mas gradualmente se tornam pretos e possuem a forma de charuto. A larva do mosquito possui natação livre, se movimentando na forma de um “looping” distinto e se alimenta de matéria orgânica. Estas possuem um tubo sifão no oitavo abdominal e estão quase sempre suspensas verticalmente na água. As pupas são estruturas em forma de vírgulas que não se alimentam e geralmente ficam sob a superfície da água, mas se perturbadas vão para o fundo. Os adultos descansam um tempo na pupa para permitir que seu exoesqueleto e as asas se expandam e se endureçam e apresenta listras brancas nas costas e nas pernas. As fêmeas vivem um período de 3 semanas e os machos vivem um período mais curto (BISEN; HAGHUVANSHI, 2013).

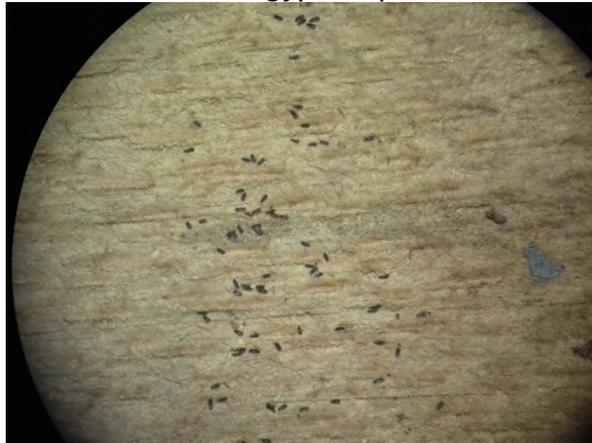
A substância isoleucina, encontrada no sangue humano, é a responsável pelo amadurecimento dos ovos de *Aedes aegypti* (HARRINGTON; EDMAN; SCOTT, 2001)

No período de 24 horas após emergirem os ovos, os mosquitos podem se acasalar, que pode ser durante o voo (majoritariamente), ou sob uma superfície. Uma inseminação é suficiente para fecundar todos os ovos que a fêmea venha a produzir durante sua vida. As fêmeas se alimentam de seiva e de sangue, enquanto os machos

somente de carboidratos extraídos dos vegetais. Em geral, a fêmea coloca os ovos após se alimentar com sangue (FUNASA, 2001).

Após a fecundação de seus ovos, a fêmea é atraída por recipientes escuros ou sombreados, com superfície áspera, para o depósito dos ovos. Água limpa é preferível ao invés de água suja ou poluída por matéria orgânica. Quando machos e fêmeas não estão se acasalando e não estão procurando alimento, permanecem em locais escuros e quietos (FUNASA, 2001).

Figura 12. Fotografia dos ovos de *A. aegypti* depositados em uma placa de madeira.



Fonte: O autor.

A presença destas doenças é devido ao maior número de criadouros que são descartados pela sociedade e a crescente resistência dos mosquitos aos inseticidas comerciais. Embora a febre amarela esteja controlada com o uso de vacinas, a mesma não existe para a dengue e demais doenças. Portanto a única maneira de combater esta enfermidade é o combate ao *Aedes aegypti* (CICCIA; COUSSIO; MONGELLI, 2000).

A população deve se sensibilizar sobre a mudança de comportamento que objetivem o controle do vetor. Neste sentido, existe a necessidade de maiores investimentos para o combate deste mosquito, para reduzir o uso de inseticidas e garantir a continuidade destas ações.

Sendo assim, o estudo de larvicidas naturais é uma alternativa para combater os focos do mosquito, eliminando dessa forma futuras doenças causadas por essas pragas.

3.0 Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo geral identificar os constituintes voláteis do óleo essencial das folhas de *Eugenia calycina* (Cambess), determinar a atividade larvicida frente ao *Aedes aegypti* e verificar a citotoxicidade deste óleo frente as cepas HeLa e Vero.

3.1 Objetivos específicos

- Obter o óleo essencial das folhas de *Eugenia calycina* (Cambess);
- Identificar a composição química do óleo essencial por CG-EM;
- Isolar substâncias do óleo essencial através de métodos cromatográficos;
- Identificar as substâncias isoladas por métodos espectroscópicos e espectrométricos;
- Avaliar o potencial larvicida do óleo essencial frente as larvas de *Aedes aegypti*;
- Determinar a atividade citotóxica do óleo essencial frente as linhagens Vero e HeLa.

4.0 Procedimento experimental

4.1 Materiais

Para as cromatografias em coluna utilizou-se sílica gel 60G (Vetec) como fase estacionária com dimensões de 30,0 cm de altura e 3,0 cm de diâmetro. Nas análises em cromatografia em camada delgada (CCD) foram utilizadas cromatoplasmas de alumina impregnada com sílica (Macherey-Nagel) e reveladas com solução alcoólica de anidrido acético/ácido sulfúrico (Reagente de Lieberman-Burchard). Para os ensaios biológicos foram utilizadas micropipetas automáticas, eppendorf e pipetas plásticas de Pasteur.

4.2 Equipamentos

Para a análise dos óleos essenciais foi utilizado um cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas (Shimadzu, QP2010), e uma coluna do tipo DB-5 (30 m de comprimento, 0,25 mm de largura e 0,25 µm de espessura - película Agilent J & W GC Collums). Adicionalmente, foi monitorado o perfil cromatográfico de algumas frações através de cromatografia gasosa acoplada a detector por ionização de chama

(CG-DIC) (Shimadzu, GC2014), contendo uma coluna tipo Supelco- SPB5 (30m x 0,25mm x 0,25 μ m). Os espectros de RMN foram obtidos em espectrômetro (Bruker, AscendTM 400 Avance III HD (9,4 Tesla), utilizando-se clorofórmio deuterado na dissolução das amostras e tetrametilsilano (TMS) como padrão interno. Os compostos isolados foram analisados por ressonância magnética nuclear (RMN) uni- (^1H e ^{13}C) e por correlação (COSY, HSQC e HMBC). As análises foram realizadas nas frequências de 400 e 100 MHz para hidrogênio e carbono, respectivamente. As análises de cromatografia a gás acoplada a espectrômetro de massas foram realizadas na Faculdade de Engenharia Química (FEQ) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

4.3 Material vegetal

4.3.1 Coleta e identificação

Foram coletadas folhas da espécie *Eugenia calycina* na Estação Ecológica do Panga (19°10'52"-19°11'1"S; 48°23'26"-48°23'44"W), da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) no mês de março (2016) (período chuvoso), e transportados para o laboratório do Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais (NuPPeN) da UFU.

A planta foi identificada por um especialista, onde uma amostra da espécime foi depositada no Herbário Uberlandense, da Universidade Federal de Uberlândia (MG), sob excicata de número 55.587. As autorizações específicas exigidas para essas atividades foram autorizadas pelo Dr. Jimi Naoki Nakajima, diretor do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Uberlândia, que é a autoridade responsável pela Reserva Ecológica do Panga (SOUSA et al., 2015).

4.3.2 Obtenção dos óleos essenciais

A umidade das folhas frescas foi determinada pelo método gravimétrico através de uma balança de luz infravermelha. A análise foi realizada com cerca de 1,0 g de material vegetal sob temperatura de 105 ± 5 °C, até que o teor de umidade permanecesse constante.

A extração do óleo essencial foi realizada em um aparelho de Clevenger (Figura 13), por hidrodestilação, sob refluxo de 4 horas. Foram utilizadas cerca de 120 g de folhas frescas trituradas com 1,0 L de água destilada em balão de fundo redondo com capacidade de 2,0 L.

Figura 13. Fotografia do aparelho de Clevenger usado na extração do óleo essencial de *E. calycina*



Fonte: O autor.

A extração foi realizada em triplicata e ao término de cada extração, o óleo essencial foi extraído com 15,0 mL de diclorometano PA (3 x 5,0 mL). O solvente foi removido por evaporação em uma chapa aquecedora a 35°C. O rendimento foi calculado de acordo com a Equação 1.

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{\text{massa de óleo obtida (g)} \times 100}{\text{Material de partida descontando a Umidade (g)}}$$

Equação 1

Os óleos essenciais foram armazenados em frasco de vidro de 15 mL (Figura 14) vedados e conservados em ambiente refrigerado na ausência de luz.

Figura 14. Fotografia do óleo essencial obtido da *E. calycina*



Fonte: O autor.

4.3.3 Análise dos óleos essenciais

A identificação das substâncias foi realizada através de um cromatógrafo a gás acoplado a espectrometria de massas (Shimadzu QP2010), operando por impacto de elétrons (70 eV). Foi utilizado hélio como gás de arraste. A análise foi realizada pelo método proposto por Adams (2007), no qual foi utilizado fluxo de 1 mL min⁻¹; temperatura do detector e injetor de 220 e 240°C, respectivamente; modo split de injeção 1:20; temperatura do forno com a programação de 60 a 246°C com taxa de 3°C min⁻¹. A identificação foi baseada em índices aritméticos (IA) calculados e comparados ao da NIST Standard Reference Data e Adams (2007).

Essa identificação foi realizada de acordo com o seguinte procedimento. Inicialmente os espectros de massas obtidos na análise foram comparados com os de bibliotecas presentes no software LabSolution-GCMS Solution (Nist08, Wiley139, Wiley229, ShimDemo e Shim2205). A comparação foi realizada entre os padrões de fragmentação mostrados pela biblioteca do software e do composto analisado. O equipamento mostra um índice de similaridade, resultante da comparação entre os espectros dos compostos sugeridos pelas bibliotecas. Nessa análise, para a identificação dos compostos foi considerado apenas aqueles índices de similaridade com valores superiores à 90%.

Em seguida foi realizado o cálculo de um parâmetro chamado de índice aritmético (IA) que correlaciona o tempo de retenção dos compostos analisados aos de alcanos. Nesta equação são considerados os tempos de retenção do alcano anterior ($Tr(Pz)$) e posterior ($Tr(Pz+1)$) ao tempo de retenção dos compostos analisados ($Tr(x)$) e o número de carbono do alcano ($C(Pz)$) com tempo de retenção anterior ao analisado. A Tabela 4 mostra o tempo de retenção dos alcanos utilizados para o cálculo do índice aritmético (IA).

Tabela 4. Tempos de retenção dos alcanos utilizados para o cálculo do índice aritmético na análise por GC-EM.

Número de carbonos	Tempo de retenção (min)	Número de carbonos	Tempo de retenção (min)
C8	3,34	C19	43,74
C9	5,15	C20	47,05
C10	7,95	C21	50,21
C11	11,66	C22	53,23
C12	15,89	C23	56,13
C13	20,30	C24	58,91
C14	24,63	C25	61,59
C15	28,83	C26	64,39
C16	32,82	C27	67,75
C17	36,62	C28	69,55
C18	40,27	C29	71,78
		C30	74,16

Fonte: O autor.

O IA foi calculado através da Equação 2, utilizando o tempo de retenção do composto analisado e dos padrões de alcanos (C8-C30) previamente injetados utilizando a mesma metodologia.

$$IA(x) = 100 C(P_z) + 100 \left[\frac{(T_R(x) - T_R(P_z))}{(T_R(P_{z+1}) - T_R(P_z))} \right] \quad \text{Equação 2}$$

O IA calculado é comparado com o de compostos isolados tabelados por Adams (2007). Além disso, o IA calculado, também foi comparado com a NIST (2014), nas mesmas condições utilizadas para a análise em CG-EM.

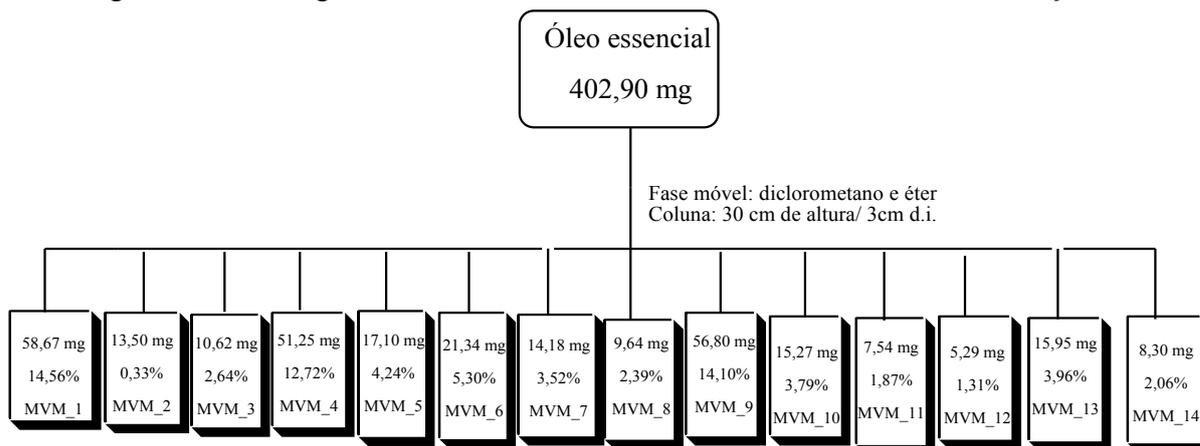
4.3.4 Fracionamento do óleo essencial de *Eugenia calycina*

O óleo essencial foi fracionado em coluna de vidro de 30 cm de altura e 3 cm de diâmetro. Cerca de 25 g de sílica gel 60 G (0,063 – 0,2 mm) MESH ATSU, foi utilizada como fase estacionária. Utilizou-se como eluente o diclorometano e em seguida foi feito um gradiente com éter etílico, alterando a polaridade, até 100% de éter etílico.

Foram utilizados aproximadamente 400 mg do óleo essencial de *E. calycina* (Figura 15) onde foram coletadas 100 frações de 15,0 mL e as mesmas foram reunidas de acordo com o perfil cromatográfico observado em cromatografia de camada delgada (CCD) em 14 frações (Tabela 5). Adicionalmente, foi monitorado o perfil cromatográfico de algumas frações através de cromatografia gasosa acoplada a

detector por ionização de chama (CG-DIC, Shimadzu, GC2014) contendo uma coluna tipo Supelco-SPB5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m). As condições cromatográficas, como temperatura do injetor, fluxo de gás de arraste e rampa de aquecimento, foram as mesmas do GC-EM, entretanto para esta análise foi utilizado nitrogênio como gás de arraste.

Figura 15. Fluxograma de fracionamento do óleo essencial de *E. calycina*.



Fonte: O autor.

Tabela 5. Códigos das frações utilizadas neste trabalho.

Código	Fração
MVM_1	6-7
MVM_2	9
MVM_3	16-18
MVM_4	23-28
MVM_5	29-35
MVM_6	37-39
MVM_7	40-42
MVM_8	43-47
MVM_9	49-60
MVM_10	61-64
MVM_11	65-69
MVM_12	70-72
MVM_13	75-78
MVM_14	80-86

Fonte: O autor.

As frações MVM_4 e MVM_10, bem como a junção das frações MVM_11 e MVM_12, após a injeção no GC-DIC (Shimadzu, GC2014), foi observada a presença de apenas um composto isolado que por sua vez foi analisado por ressonância magnética nuclear (Bruker, AscendTM 400 Avance III HD (9,4 Tesla).

4.3.5 Reagente de prospecção fitoquímica utilizado

Para a detecção de terpenos e esteroides foi utilizado o reagente de Liebermann-Burchard (SOUSA et al., 2015) onde 5,0 mL de anidrido acético e 5,0 mL de ácido sulfúrico concentrado foram adicionados cuidadosamente a 50,0 mL de etanol absoluto, sob banho de gelo. A placa CCD foi observada em câmara luz UV (365 nm) e posteriormente borrifada com o revelador e aquecida a 100 °C por 5 min.

4.4 Ensaio larvicida frente ao *Aedes aegypti*

4.4.1 Coleta dos ovos

A coleta dos ovos foi feita no Insetário da DIVAL (Divisão de Vigilância Ambiental) em Brasília (DF). A cepa Rockefeller (Figura 16) presente nas gaiolas de mosquitos foi alimentada diariamente com uma solução de açúcar cristal a 10% em água de clorada. Para a oviposição foi colocada uma placa de metal sobre a gaiola, e um papel filme previamente aquecido com sangue de carneiro desfibrinado fornecido pelo fabricante New Prov. As fêmeas de *Aedes aegypti* se alimentaram com o mesmo e após um período de 3 dias ocorreu a oviposição. A mesma foi feita em um papel filtro umedecido que fica dentro da gaiola onde os ovos são depositados.

Figura 16. Fotografia do insetário da DIVAL com cepa Rockefeller.



Fonte: O autor.

A contagem dos ovos para o experimento foi feita em um microscópio (Nikon, SMZ800N) acoplado a um epi-iluminador (Nikon, NI-150) e com o auxílio de um contador (Figura 17).

Figura 17. Fotografia do processo de contagem dos ovos de *Aedes aegypti* através de microscópio.

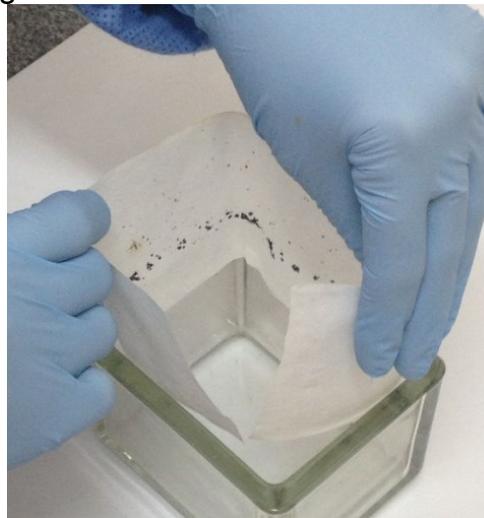


Fonte: O autor.

4.4.2 Análise larvicida

Após a contagem dos ovos, o papel filtro foi colocado em volta de uma cuba de vidro e depois preenchido com água de clorada (Figura 18).

Figura 18. Fotografia da cuba de vidro com os ovos de *A. aegypti*.



Fonte: O autor.

A cuba com os ovos foi colocada em uma dessecadora acoplada a uma bomba à vácuo (DIA-PUMP, BF.6172) por duas horas (Figura 19). Esse processo é necessário para que a quantidade de oxigênio disponível diminua no meio resultando em uma eclosão uniforme e sincronizada.

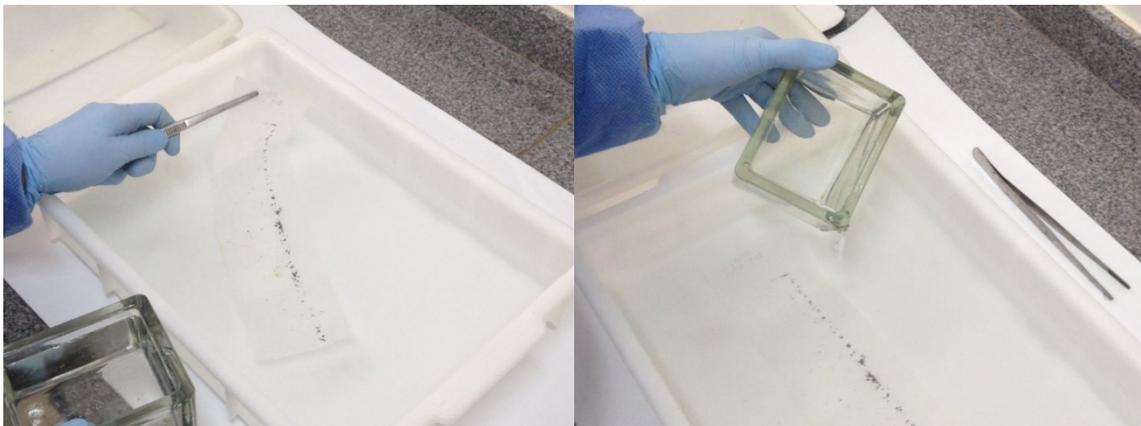
Figura 19. Fotografia do sistema de dessecação dos ovos de *A. aegypti*.



Fonte: O autor.

Após este período, o papel de filtro que estava na cuba e a água com as larvas são transferidas para uma bandeja com três litros de água declorada (Figura 20).

Figura 20. Fotografia das larvas sendo transferidas para bandeja com água declorada.



Fonte: O autor.

As mesmas são alimentadas com ração de gato previamente macerada e transferidas para uma incubadora (ELETRO lab, EL212) com controle de foto-período. As larvas são alimentadas a cada 48 h e são utilizadas quatro gramas de ração para cada 2.500 larvas (Figura 21).

Figura 21. Fotografia das larvas sendo alimentadas com ração.



Fonte: O autor.

Foi preparada uma solução do óleo essencial na concentração de $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ e solução dos compostos isolados na concentração de $25 \mu\text{g mL}^{-1}$. As soluções foram preparadas em água de clorada contendo 1,25 % de dimetilsulfóxido (DMSO). Para o cálculo do CL_{50} foram realizadas diluições seriadas. Para o ensaio foram utilizados copos descartáveis de 50,0 mL com larvas do terceiro estágio (10 larvas/ copo), onde adicionou-se 20,0 mL das soluções do óleo essencial e/ou compostos isolados. Os testes foram realizados em quadruplicata e paralelamente foi conduzido o teste em branco (DMSO 1,25 % e água de clorada), como ilustrado na Figura 22.

Figura 22. Fotografia do ensaio larvicida em copos descartáveis contendo larvas de terceiro estágio.



Fonte: O autor.

A mortalidade das larvas foi avaliada após 24, 48 e 72h de exposição e foi indicada pela ausência de movimento quando em contato com a pipeta plástica de Pasteur. Foi gerado um gráfico de dose-resposta para avaliar o CL_{50} do óleo.

4.4.3 Atividade citotóxica

A análise citotóxica foi realizada no Laboratório de Tripanosomatídeos em Uberlândia (MG), de acordo com o procedimento de MARTINS et al., 2015.

4.4.3.1 Preparo do meio de cultura

O meio *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) foi preparado de acordo com as instruções do fabricante. O meio foi suplementado com 10 % de soro fetal bovino (SFB), L-glutamina (2 mM), D-glicose (4.500 mg L⁻¹), bicarbonato de sódio (2.000 mg L⁻¹), HEPES (2.380 mg L⁻¹), piruvato de sódio (1.100 mg L⁻¹), penicilina (60 mg L⁻¹), gentamicina (40 mg L⁻¹) e estreptomicina (10 mg L⁻¹).

4.4.3.2 Cultura de células

Para a análise de citotoxicidade do óleo essencial de *E. calycina* foram utilizadas as células HeLa ATCC CCL2 (linhagem humana derivada a partir de células obtidas de um câncer cervical) e Vero ATCC CCL81 (fibroblasto de rim de macaco verde da África). O cultivo das células foi realizado em uma garrafa de cultivo no meio DMEM suplementado com soro fetal bovino (10 %), a 37 °C com atmosfera úmida de 5 % de CO₂.

4.4.3.3 Preparo das amostras e teste de viabilidade celular

Inicialmente o meio de cultura foi retirado, e, em seguida foi lavado com solução salina de PBS. Em seguida foi colocado 1 mL de tripsina, e, a garrafa de cultivo foi posta na estufa a 37 °C por 5 minutos, para a retirada das mesmas. As células foram recolhidas (2 mL de meio) e contadas em uma câmara de Neubauer. A contagem de células foi necessária para realizar o plaqueamento, sendo que o ensaio foi feito em placa de 96 poços, e, cada poço continha 5 x 10⁴ células, através da equação:

$$\text{N}^{\circ} \text{ células} = \frac{\text{Somatória de células na câmara de Neubauer}}{4} \times 10^4 \times \text{F. diluição} \times \text{n}^{\circ} \quad \text{Equação 3}$$

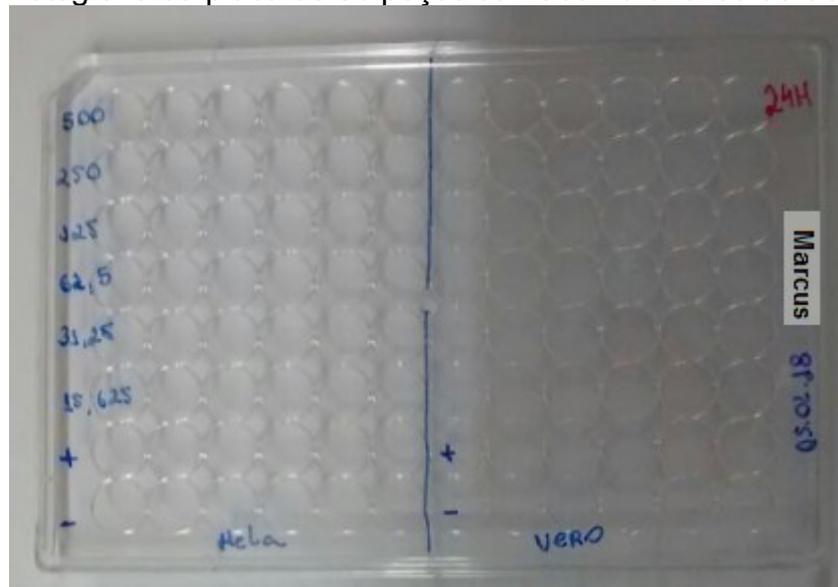
mLs

Após o plaqueamento, as células foram incubadas (durante a noite), para que estas aderissem ao fundo do poço. Os seus respectivos meios de cultura foram retirados para serem colocadas as soluções com concentrações de 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,625 µg mL⁻¹, dissolvidos em DMSO 1,25 % com meio de cultura

DMEM, sem tratamento (como controle positivo ou de vida) e uma solução 30 % de DMSO (controle negativo ou de morte). Para o cálculo das diluições seriadas partiu-se de uma solução mãe de $625 \mu\text{g mL}^{-1}$, e de $10 \mu\text{g}$ do óleo essencial. Foi realizado também o cálculo do volume de solução do óleo essencial, bem como o volume de meio de cultura colocado em cada poço, que possui volume final de $100 \mu\text{L}$.

Para as células HeLa foram utilizados $4 \mu\text{L}$ de rezazurina, e para as células Vero $6 \mu\text{L}$, as quais foram padronizadas previamente. Estes volumes de rezazurina em contato as células garantem a metabolização da substância em pelo menos 16h. Com o método de incubação com rezazurina foi possível avaliar a citotoxicidade das substâncias presentes no óleo essencial após 24 e 48 horas. A Figura 23 mostra a placa de 96 poços na qual foram realizadas as análises de citotoxicidade. Todos os ensaios foram realizados em sextuplicatas, e, as leituras absorvâncias da placa de 96 poços foram obtidas em um espectrofotômetro de microplacas.

Figura 23. Fotografia da placa de 96 poços utilizada na análise de citotoxicidade.



Fonte: O autor.

4.4.3.4 Análise estatística

Todos os resultados das análises químicas de citotoxicidade foram obtidos a partir da média das seis repetições ($n = 6$) com o seu respectivo desvio padrão, e, com a média das absorvâncias foi construído o gráfico para o cálculo do IC_{50} .

5.0 Resultados e discussão

5.1 Óleos essenciais

O rendimento do óleo essencial das folhas de *Eugenia calycina* foi de $1,05 \pm 0,10\%$, sendo maior que outras plantas do mesmo gênero e família (Tabela 6).

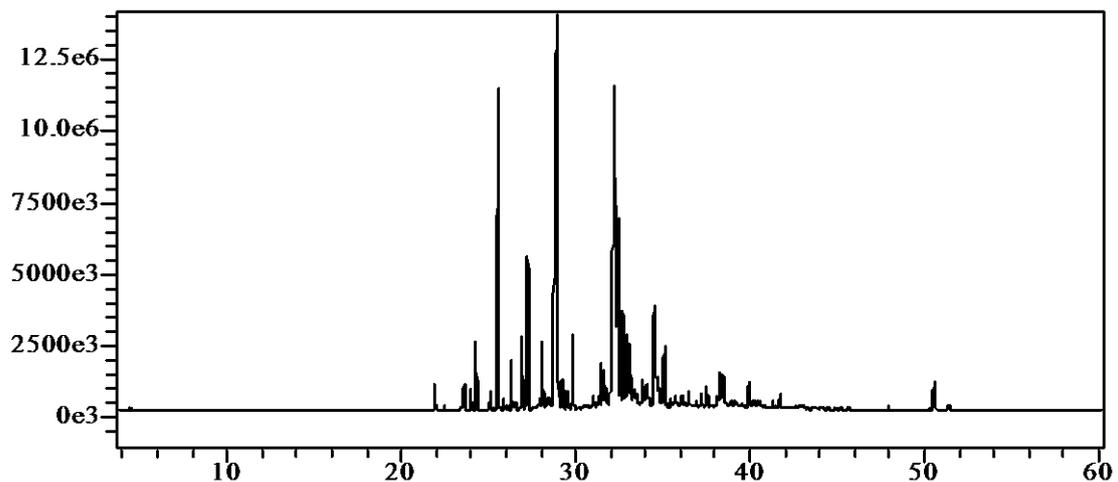
Tabela 6. Rendimento (%) de óleo essencial em espécies de Myrtaceae.

Espécies	Rendimento (%)	Referência
<i>Eugenia racemulosa</i>	0,33	SENNA et al., 2011.
<i>Melaleuca thymifolia</i>	0,01	SILVA et al., 2010.
<i>Psidium myrsinitis</i>	0,13	CASTELO; MENEZZI; RESCK, 2010.
<i>Myrcia splendens</i>	0,11	SCALVENZI et al., 2017.
<i>Eugenia lutescens</i>	0,25	RIBEIRO et al., 2016.
<i>Eugenia langsdorffii</i>	0,40	RIBEIRO et al., 2016.
<i>Eugenia klotzschiana</i>	0,07	CARNEIRO et al. 2017.
<i>Eugenia dysenterica</i>	0,15	COSTA et al., 2000.
<i>Eugenia banderensis</i>	0,01	BELLO et al., 1995.
<i>Eugenia brasiliensis</i>	0,17	MORENO et al., 2007.
<i>Campomanesia guaviroba</i>	0,02	PASCOAL et al., 2011.
<i>Eucalyptus curtisii</i>	0,22	LEE et al., 2004.
<i>Melaleuca lanceolata</i>	0,29	LEE et al., 2004.

Fonte: O autor.

Através da técnica de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) foi possível identificar 24 compostos presentes no óleo essencial de *Eugenia calycina*. No cromatograma do óleo essencial obtido por CG-DIC, mostrado na Figura 24, é possível verificar que os constituintes do óleo apresentam tempo de retenção entre 20,9 e 51,0 min.

Figura 24. Perfil cromatográfico de CG-DIC do óleo essencial de *E. calycina*.



Fonte: O autor.

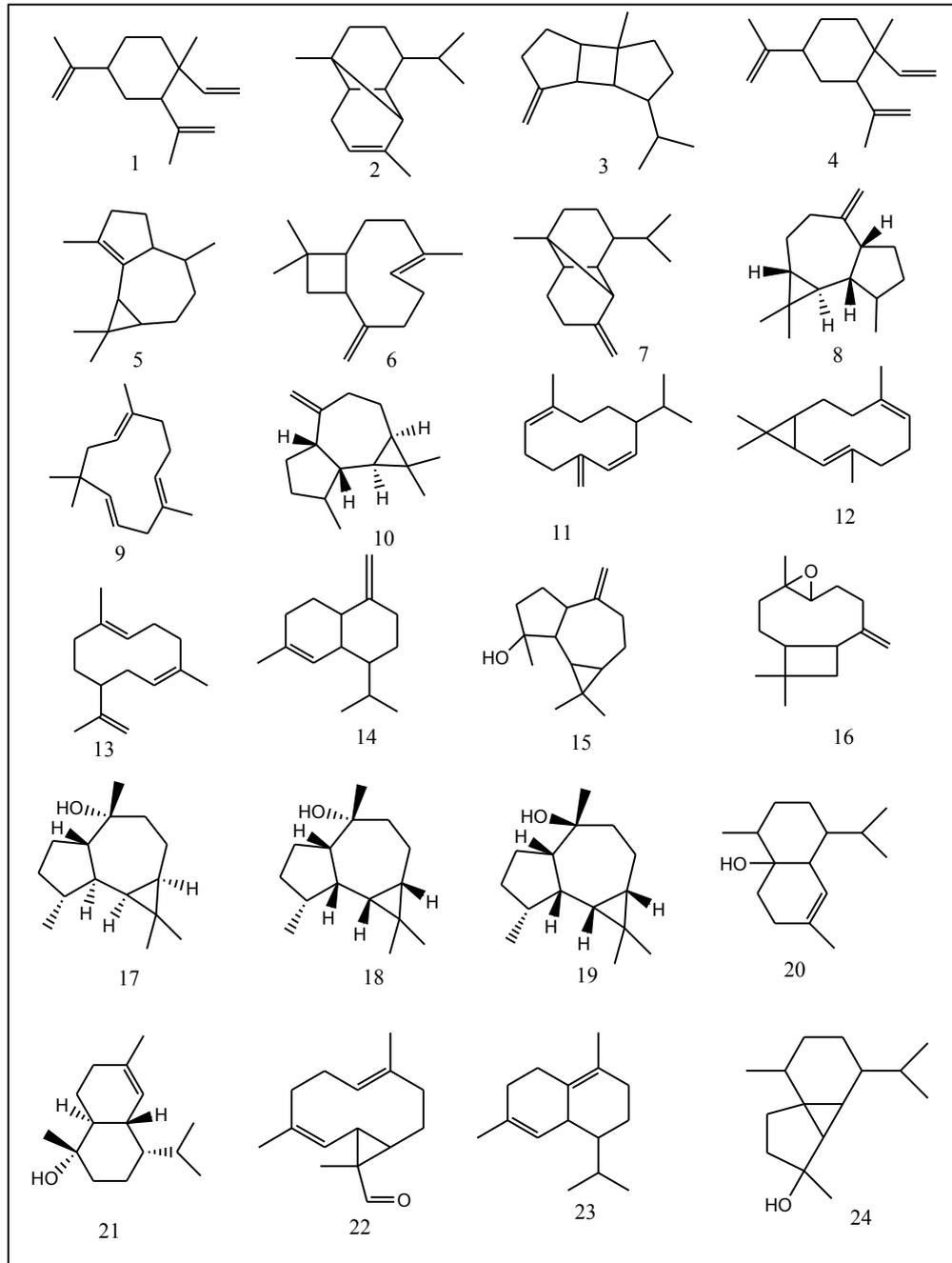
O óleo essencial de *E. calycina* apresentou como constituintes majoritários os sesquiterpenos biciclogermacreno (13,22%), espatulenol (15,98%) e β -cariofileno (6,96%). A Tabela 7 mostra os constituintes identificados por CG-EM na espécie *E. calycina* e na Figura 25 são apresentadas as estruturas destes compostos.

Tabela 7. Composição do óleo essencial de *E. calycina* identificada por CG-EM.

Compostos	Tempo de retenção (min)	IA (teórico)	IA (calculado)	% TIC
δ -Elemeno (1)	21,90	1335	1357	0,45
α -Copaeno (2)	23,60	1374	1376	0,39
β -Burboneno (3)	23,98	1387	1385	0,33
β -Elemeno (4)	24,29	1389	1392	1,25
α -Gurjueno (5)	25,09	1409	1411	0,30
β -Cariofileno (6)	25,57	1417	1422	6,96
β -Copaeno (7)	25,89	1430	1430	0,23
Aromadendrano (8)	26,31	1439	1440	0,91
α -Humuleno (9)	26,93	1452	1455	0,91
Alo-aromadendrano (10)	27,25	1458	1463	2,64
Germacreno D (11)	28,09	1484	1482	0,58
Biciclogermacreno (12)	28,99	1500	1504	13,22
Germacreno A (13)	29,18	1508	1509	0,50
χ -Cadineno (14)	29,46	1513	1516	0,28
Cubebol (15)	29,55	1514	1518	0,35
δ -Cadineno (16)	29,82	1522	1525	0,71
Espatulenol (17)	32,24	1577	1586	15,98
Óxido de cariofileno (18)	32,32	1582	1588	2,51
Globulol (19)	32,43	1590	1590	5,35
Viridiflorol (20)	32,70	1592	1597	3,18
Ledol (21)	33,11	1602	1607	1,85
1- <i>epi</i> -Cubenol (22)	34,04	1627	1632	2,43
α -Cadinol (23)	34,60	1652	1647	1,80
Isobiciclogermacrenal (24)	38,09	1733	1740	0,91
Total				64,02

Fonte: O autor.

Figura 25. Estruturas das moléculas identificadas por CG-EM no óleo essencial de *E. calycina*.



Fonte: O autor.

O óleo essencial de *E. calycina* avaliado por Sousa et al. (2015), em meados de agosto, durante o período seco, exibiu todos os compostos identificados neste trabalho com exceção do β -copaeno e ledol. Neste estudo a coleta das folhas foi realizada no mês de março ao longo do tempo chuvoso, sendo identificados 24 sesquiterpênicos cíclicos.

Foi realizado um estudo sazonal com a espécie *Eugenia neonitida* e *Eugenia rotundifolia* onde foi identificada a presença do β -copaeno apenas no período chuvoso. Já o ledol que foi encontrado somente na primeira manifestou-se em ambos os períodos (DEFAVERI et al., 2011). Este último também foi encontrado no óleo essencial da espécie *E. uniflora* (LAGO et al., 2011) na mesma proporção (1,8%) que o encontrado na espécie *E. calycina* avaliada neste trabalho.

A intensidade da luz pode promover a ativação de enzimas fotossensíveis envolvidas na via do ácido mevalônico, modificando a composição do óleo essencial (SOUZA et al., 2011). Além disso, outros fatores como o índice pluviométrico e a temperatura do horário de coleta, que não atuam isoladamente, influenciam na concentração destes metabólitos (GOBBO-NETO e LOPES, 2007).

O óleo essencial das folhas de *Eugenia dysenterica* apresentou como majoritários o β -cariofileno, α -humuleno, e óxido de cariofileno, com rendimento de 0,15%, e apresentou forte atividade antifúngica contra o gênero *Cryptococcus* (COSTA, 2000). Os mesmos constituintes foram majoritários em *E. puniceifolia* com adição de linalol e α -terpineol (OLIVEIRA; DIAS; CÂMARA, 2005).

Sousa et al. (2015) identificou 39 compostos voláteis no óleo essencial de *E. calycina* e verificou forte atividade antimicrobiana deste óleo frente a *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella nigrescens*.

Estudos recentes do óleo essencial das folhas e frutos de *Cardiophyllum calophyllum* indicaram como constituintes majoritários os sesquiterpenos germacreno B, germacreno D e espatulenol, respectivamente (XAVIER et al., 2016).

Recentemente, no óleo essencial das flores de *Eugenia klotzschiana* foram identificados os sesquiterpenos β -cariofileno, biciclogermacreno e espatulenol e este óleo exibiu atividade tripanocida contra as formas tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi* (CARNEIRO et al., 2017).

Galheigo et al. (2015), reportou a presença dos monoterpenos *cis*- β -ocimeno e linalol, bem como os sesquiterpenos (*E*)-cariofileno, óxido de cariofileno e α -humuleno identificados na *Eugenia dysenterica*.

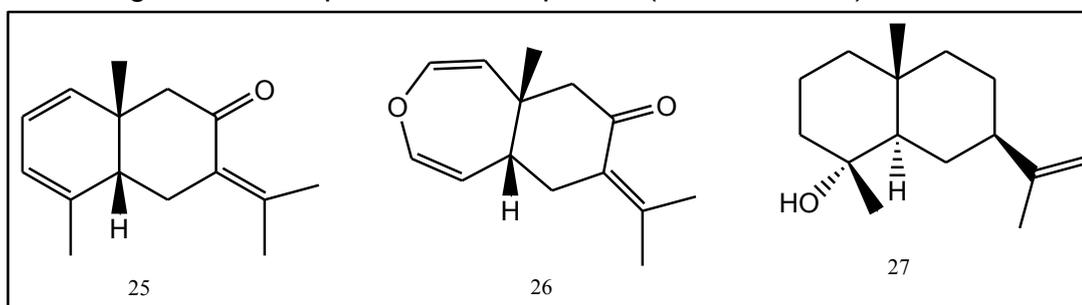
A composição química do óleo essencial das folhas de 5 espécies de *Eugenia* mostrou em *Eugenia umbelliflora* e *Eugenia uruguayensis* o α -pineno como majoritário. Na *Eugenia pluriflora* o (*E*)-nerolidol e na *Eugenia platysema* foram identificados como principais o alo-aromadendrano e o β -selineno. Na espécie *E. ramboi* foram

identificados o β -elemeno e biciclogermacreno com maior área relativa (APEL et al., 2002).

Em um estudo comparativo realizado com as *Eugenia schuechiana* e *Eugenia plicato-costata* mostrou o β -cariofileno e óxido de cariofileno como constituintes voláteis majoritários do óleo essencial das folhas, enquanto que os sesquiterpenos oxigenados com núcleo aromadendrano (viridifloreno, α -gurjueno, ledol e globulol) estão presentes nas *Eugenia rostrifolia* e *Eugenia involucrata*. Nas espécies *E. uniflora* e *Eugenia tinguayensis* foi encontrado o nerolidol (HENRIQUES, 1993). O mesmo foi observado para *E. racemulosa* que apresentou α -cadinol, (*E*)-cariofileno e espatulenol. (SENNA et al., 2011). Em outro óleo da mesma família, na *Myrcia sylvatica*, foi encontrado como majoritário o β -cariofileno (ROSA et al., 2016).

Outro tipo de esqueleto foi encontrado no óleo essencial das folhas da espécie *E. uniflora* onde foram identificados os constituintes selin-1,3,7(11)-trien-8-one (25), oxidoselina-1,3,7(11)-trien-8-one (26) e selin-11-em-4 α -ol (27) (Figura 26) (WEYERSTAHL et al., 1988).

Figura 26. Compostos com esqueleto (núcleo básico) selinano.



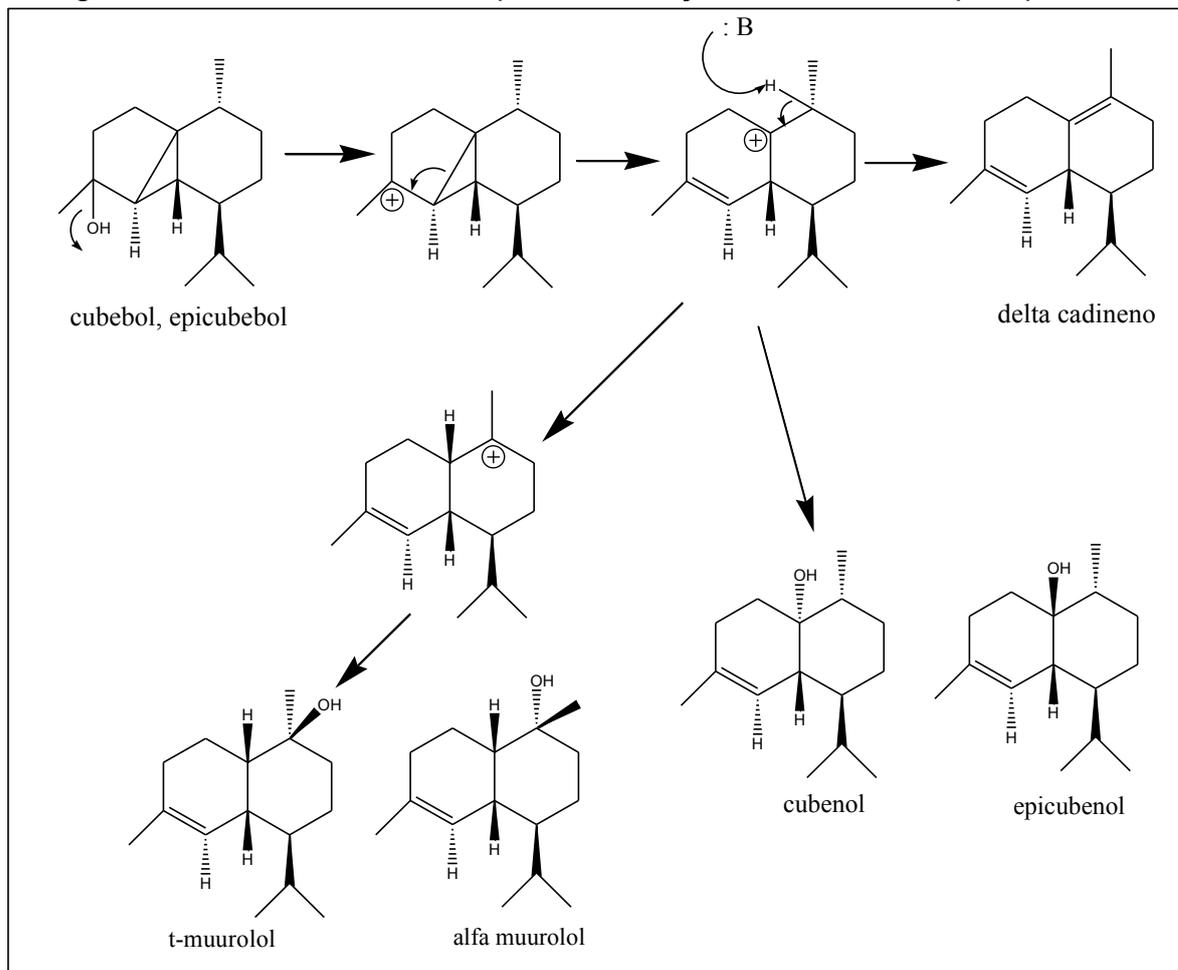
Fonte: Weyerstahl et al. (1988).

A espécie *Eugenia hiemallis* apresentou como majoritários os compostos espatulenol, χ -cadineno, biciclogermacreno e (*E*)-cariofileno (ZATELLI, 2015). Recentemente a espécie *Eugenia pitanga* apresentou atividade frente a *Leishmania amazonensis*. Nesta espécie os constituintes principais identificados foram o espatulenol, globulol e (2*E*,6*E*) farnesoato de metila (KAUFFMANN et al., 2017).

De acordo com Cornwell et al. (2000), os sesquiterpenos δ -cadineno, epi-cubenol e cubenol presentes nos óleos essenciais da família Myrtaceae são co-produtos da solvólise ácida dos álcoois sesquiterpênicos cubebol e epicubebol (Figura 27). Desta forma o cubebol perde uma hidroxila para formar um carbocátion terciário,

seguido de deslocalização eletrônica da ligação que unia os dois anéis de seis membros. Assim é formado novamente outro carbocátion terciário que é estabilizado pela retirada de um hidrogênio para dar origem ao delta-cadineno. Para a formação de cubenol houve ataque de uma molécula de hidroxila ao carbocátion terciário e para formar τ -muurolol e α -muurolol foi retirado um hidrogênio entre os anéis de seis membros, seguido de posterior ataque de um grupamento hidroxila.

Figura 27. Rotas biossintéticas para a formação de alcoóis sesquiterpênicos.



Fonte: Cornwell et al. (2000).

Desta maneira, foi observado que vários tipos de esqueletos sesquiterpênicos como o aromadendrano, eudesmano e o selinano estão presentes tanto em espécies de *Eugenia* quanto em outras plantas da mesma família. Alguns destes são detentores de importantes atividades biológicas no combate a leishmaniose e a doença de Chagas.

5.2 Fracionamento do óleo essencial das folhas de *E. calycina*

Com a finalidade de correlacionar a atividade larvicida do óleo essencial com os compostos presentes, este óleo foi fracionado em coluna cromatográfica, utilizando inicialmente diclorometano e posteriormente diclorometano e éter etílico em gradiente, em sílica gel como fase estacionária. Após a análise de CG-DIC foi verificada a presença de três compostos isolados que foram assim agrupados: F23-28 (MVM_4), F65-72 (MVM_11 e MVM_12) e F61-64 (MVM_10).

Um fator que deve ser levado em conta no decorrer da corrida cromatográfica é a força de eluição. A força de eluição do éter etílico em sílica é maior do que a força do diclorometano em sílica (GOCAN, 2004). Isso porque o éter etílico é capaz de fazer ligações de hidrogênio com os silanóis fazendo com que outros compostos que estavam aderidos ao mesmo interajam mais fracamente com a fase estacionária.

5.2.1 Identificação das substâncias isoladas do óleo essencial das folhas de *E. calycina*

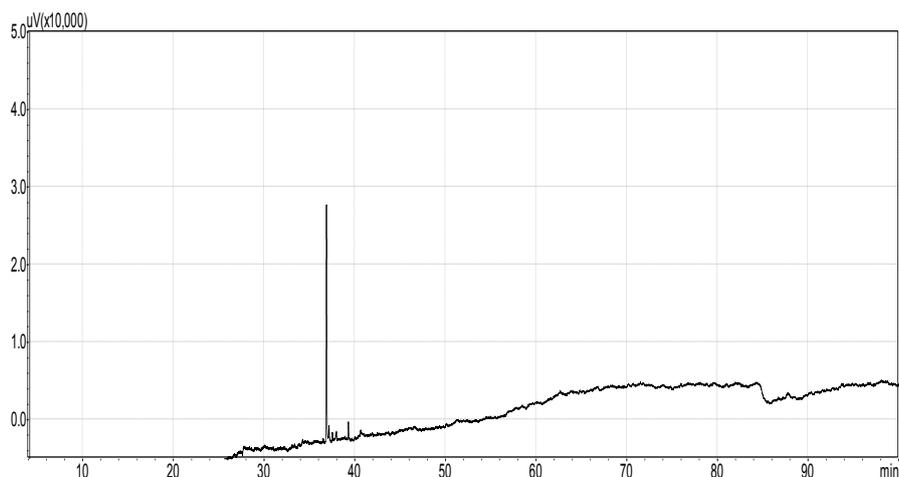
Afim de determinar os tipos de esqueletos, bem como a fórmula molecular dos compostos isolados presentes no óleo essencial de *E. calycina*, estes foram analisados por CG-DIC e por ressonância magnética nuclear (RMN) para que as estruturas fossem elucidadas. Para tal foram realizadas as análises de GC-DIC, RMN de ^1H e ^{13}C , DEPT 135 e HSQC.

O GC-DIC foi utilizado primeiramente para verificar se um composto isolado estava presente e posteriormente foram realizadas as análises de RMN para a elucidação estrutural.

5.2.1.1 Identificação do Epatulenol

Primeiramente a fração MVM_4 foi injetada CG-DIC para verificar o perfil cromatográfico da mesma. Foi identificado um pico intenso com tempo de retenção de 36,9 min (Figura 28).

Figura 28. Cromatograma de CG-DIC da fração MVM_4.



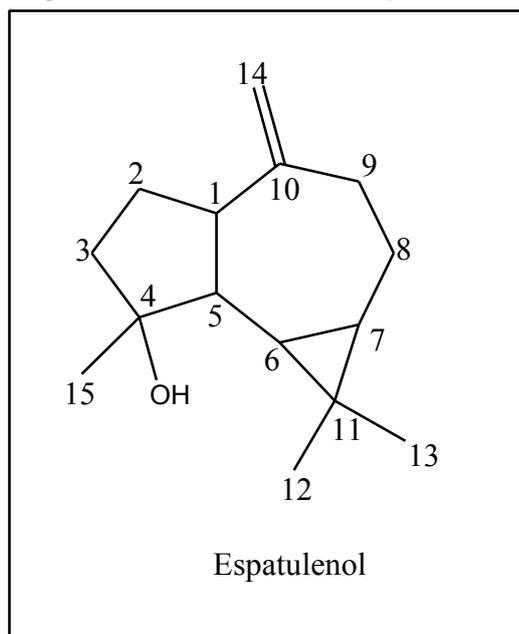
Fonte: O autor.

Em seguida, a substância da fração MVM_4 foi analisada por RMN de ^1H e RMN de ^{13}C . Os sinais dos espectros de RMN de ^1H e sua expansões (Apêndices A e B) bem como de RMN de ^{13}C (Apêndice C) foram compatíveis com a presença do sesquiterpeno conhecido como espatulenol (Figura 29) que possui esqueleto aromadendrano.

No espectro de RMN de ^1H (Apêndice A), sinais em δ 4,66 (*sl*) e 4,69 (*sl*) atribuídos aos hidrogênios olefínicos da dupla ligação exocíclica (H-14); δ 1,31 (*dd*; 2,2 e 10,7 Hz) e, δ 0,70 (*td*; 6,4, 9,4 e 11,3 Hz), referentes aos (H-5) e (H-7), respectivamente (Tabela 8). Os sinais das metilas foram observados em δ 1,04 (*s*) (H-13), δ 1,28 (*s*) (H-15) e δ 1,05 (*s*) (H-12). O espectro mostra também um duplo dubleto em δ 0,47 (*dd* 9,3 e 11,3 Hz) referente ao (H-6). A presença de regiões de difícil interpretação da multiplicidade, aparecem em δ 0,69 (H-8), δ 1,7 (H-3), δ 1,22 (H-2), δ 1,97 (H-1) e δ 2,23 (H-9), devido à presença de centros estereogênicos.

No espectro de RMN de ^{13}C (Apêndice C) verifica-se a presença de quinze carbonos distintos, o que sugere que a estrutura se trata de um sesquiterpeno. Analisando o espectro do DEPT 135 (Apêndice D) e em seguida o RMN de ^{13}C verifica-se a presença de três carbonos quaternários com sinais em δ 81,0 (C-4), δ 153,5 (C-10), e δ 20,3 (C-11) (Tabela 8). Nestes espectros são mostradas algumas regiões blindadas em δ 16,3 (H-12), δ 28,7 (H-13) e δ 26,1 (C-15) e outras desblindadas em δ 53,4 (C-1) e δ 54,3 (C-5).

Figura 29. Estrutura do espatulenol.



Fonte: O autor.

O Apêndice E mostra o espectro de HSQC do espatulenol isolado e suas ampliações são mostradas nos Apêndices F, G e H, respectivamente. O espectro de HSQC correlaciona carbono e hidrogênio, que estão ligados, facilitando a identificação neste tipo de análise em 2D.

A substância da fração MVM_4 foi injetada no CG-EM, após as respectivas análises elementares de RMN, e, foi o único composto isolado que foi identificado pela biblioteca do equipamento.

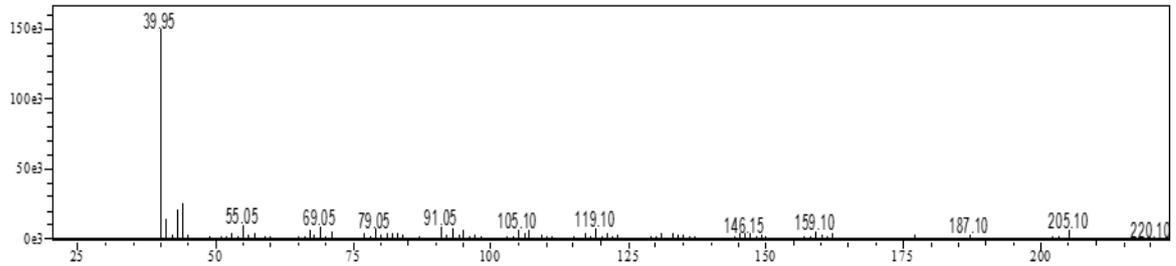
Tabela 8. Atribuição dos deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C no espectro de RMN do espatulenol e comparação com a literatura.

Nº	Espatulenol				(CAMARGO et al., 2013)	
	RMN ^1H (400 MHz; CDCl_3)	RMN ^{13}C (100 MHz; CDCl_3)	DEPT 135	HSQC	RMN ^1H (300 MHz; CDCl_3)*	RMN ^{13}C (75 MHz; CDCl_3)*
1	2,17-2,26 (<i>m</i>)	53,4	CH	2,17-2,26		53,3
2	1,74-1,80 (<i>m</i>)	26,7	CH2	1,75-1,79		26,7
3	1,61-1,66 (<i>m</i>)	41,7	CH2	1,60-,65		41,6
4	-	81,0	C	-		80,8
5	1,31 (dd; 2,2 e 10,7 Hz)	54,3	CH	1,30-1,33		54,2
6	0,47 (dd; 9,3 e 11,0 Hz)	29,9	CH	0,43-0,49		29,8
7	0,70 (td; 6,4, 9,4 e 11,3 Hz)	27,5	CH	0,68-0,73	0,44 (t; 10,4 Hz)	27,0
8	0,69-0,74 (<i>m</i>)	24,8	CH2	0,70-0,75	0,69 (<i>m</i>)	25,0
9	2,16-2,24 (<i>m</i>)	38,9	CH2	2,17-2,23		38,8
10	-	153,5	C	-		153,2
11	-	20,3	C	-		20,5
12	1,05 (<i>s</i>)	16,3	CH3	1,04	1,02 (<i>s</i>)	16,2
13	1,04 (<i>s</i>)	28,7	CH3	1,04	1,03 (<i>s</i>)	28,6
14a	4.66 (<i>sl</i>)	106,3	CH2	4,66	4.64 (<i>sl</i>)	106,2
14b	4.69 (<i>sl</i>)	106,3	CH2	4,99	4,64 (<i>sl</i>)	106,2
15	1,28 (<i>s</i>)	26,1	CH3	1,28	1,25 (<i>s</i>)	25,6

Fonte: O autor.

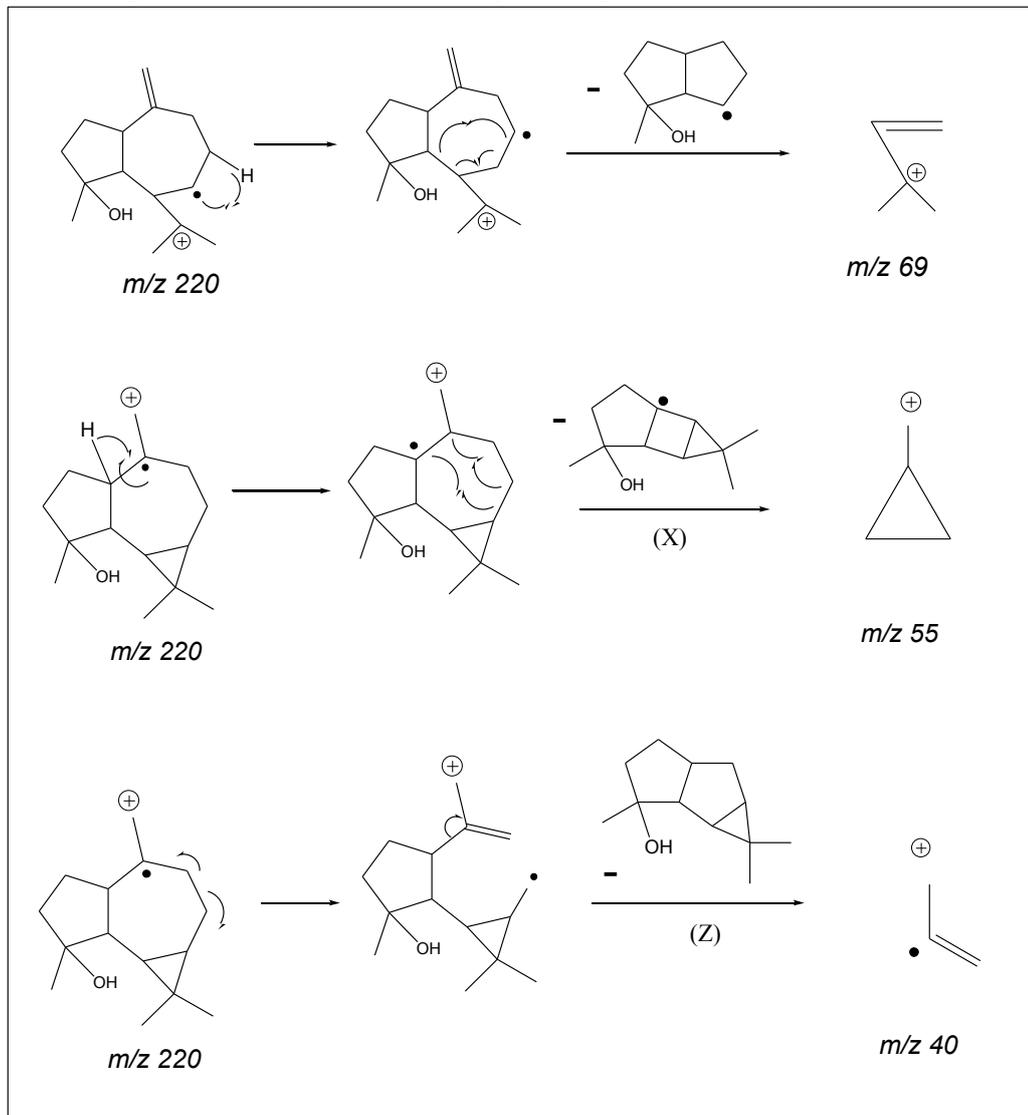
O espectro de massas do espatulenol está mostrado na Figura 30 e as propostas de suas fragmentações na Figura 31.

Figura 30. Espectro de CG-EM do espatulenol.



Fonte: O autor.

Figura 31. Propostas de fragmentações para o espatulenol.



Fonte: O autor.

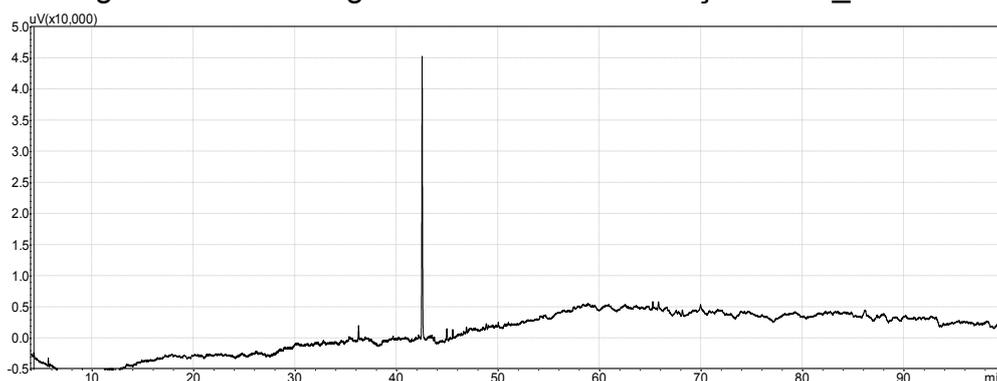
O espectro de massas do espatulenol apresenta picos referentes as seguintes fragmentações:

- m/z 97 [M-123] referente a perda de um radical 2-(but-3-enil)-1,1-dimetilciclopropano pelo íon molecular 220;
- m/z 55 [M-165] referente a perda de X pelo íon molecular 220;
- m/z 40 [M-180] referente a perda de Z pelo íon molecular 220;

5.2.1.2 Identificação do $4\beta,10\alpha$ -aromadendranodiol

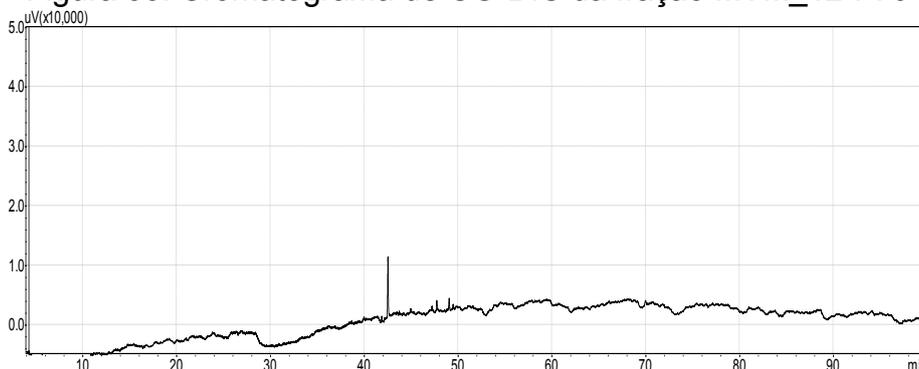
A partir do perfil cromatográfico apresentado no CG-DIC, as frações MVM_11-F65-69 e MVM_12-F70-72 foram reunidas. O tempo de retenção de ambas no equipamento foi de 40,5 min (Figuras 32 e 33).

Figura 32. Cromatograma de CG-DIC da fração MVM_11-F65-69.



Fonte: O autor.

Figura 33. Cromatograma de CG-DIC da fração MVM_12-F70-72.

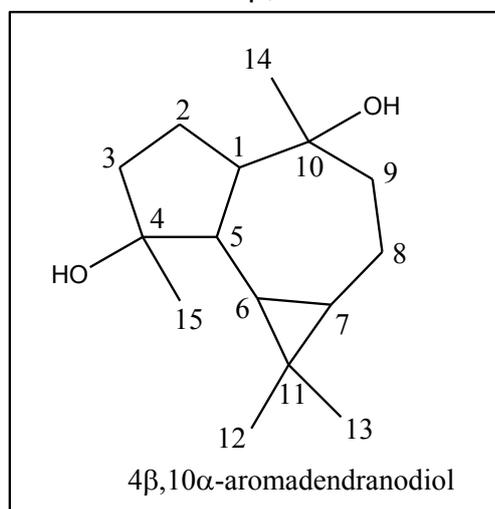


Fonte: O autor.

Em seguida, a substância presente nessas frações foi analisada por RMN de ^1H e RMN de ^{13}C . Os sinais dos espectros de RMN de ^1H (Apêndice I) e suas ampliações (Apêndice J), bem como o RMN de ^{13}C (Apêndice K) foram compatíveis

com a presença do sesquiterpeno conhecido como 4 β ,10 α -aromadendranodiol (Figura 34) que exhibe esqueleto aromadendrano semelhante ao espatulenol.

Figura 34. Estrutura do 4 β ,10 α -aromadendranodiol.



Fonte: O autor.

Para este composto foram observados no espectro de RMN de ^1H sinais em δ 0,41 (*dd*; 9,5 e 10,8 Hz) atribuídos aos hidrogênios vizinhos ao anel tricíclico (H-6) (Tabela 9). Os sinais das metilas foram observados em δ 1,16 (*s*) (H-15), δ 1,24 (*s*) (H-14) e δ 1,02 (*s*) correspondente aos hidrogênios (H-12) e (H-13), respectivamente (Tabela 9). A presença de regiões de difícil interpretação da multiplicidade, aparecem na região próxima de δ 0,63 (H-8) e, entre δ 1,24 (H-2), δ 1,26 (H-5), δ 1,64 (H-3), δ 1,65 (H-9) e δ 1,84 (H-1) devido à presença de centros estereogênicos.

No espectro de RMN de ^{13}C do 4 β ,10 α -aromadendranodiol verifica-se a presença de quinze carbonos distintos relativos a presença de uma estrutura sesquiterpênica (Tabela 9). Após a análise do DEPT 135 (Apêndice L), confirma-se no RMN de ^{13}C três carbonos quaternários situados em δ 80,6 (C-4), δ 75,3 (C-10), e em δ 19,8 (C-11). No espectro do DEPT 135 aparece um contaminante em δ 29,6 que é um sinal de um CH_2 de graxa (GOTTLIEB; KOTLAYAR; NUDELMAN, 1997).

O Apêndice M mostra o espectro de HSQC do 4 β ,10 α -aromadendranodiol, e suas ampliações são mostradas nos Apêndices N e O. O HSQC facilitou a correlação na identificação das metilas através da integração dos sinais do espectro de ^1H . Diante disso, carbono e hidrogênio foram analisados, e comparados com o espectro de HSQC e DEPT 135 do espatulenol, visto que apresentou o mesmo tipo esqueleto.

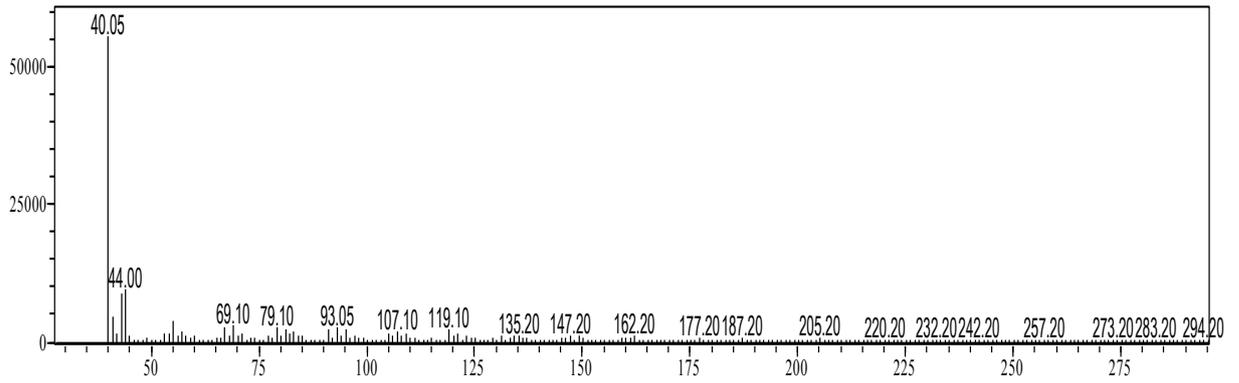
A substância 2 foi injetada no CG-EM mas o composto não foi identificado na biblioteca do equipamento.

Tabela 9. Atribuição dos deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C no espectro de RMN do 4 β ,10 α -aromadendranodiol e comparação com a literatura.

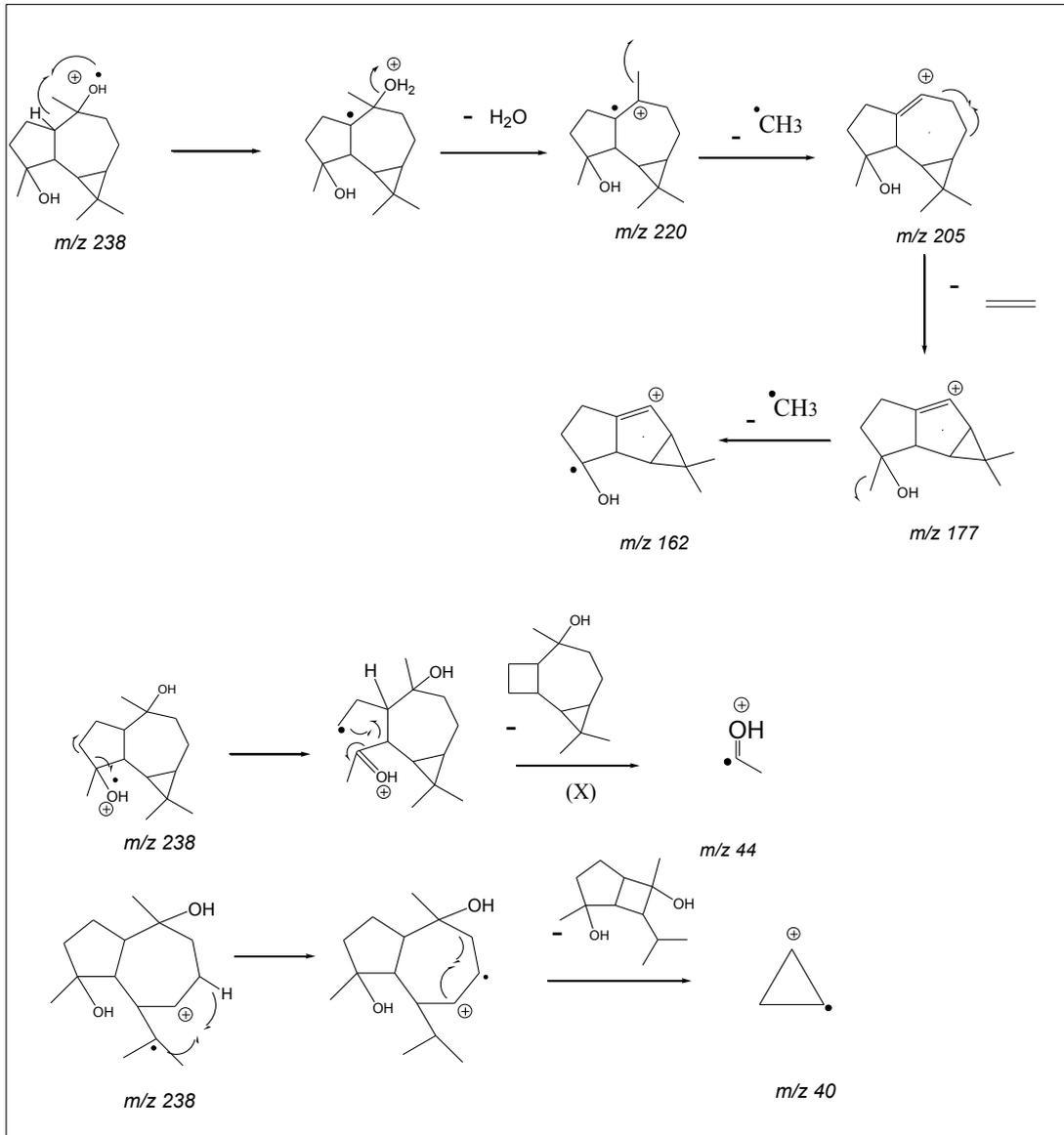
Nº	4 β ,10 α -aromadendranodiol				(LAGO; ROQUE, 2009)	
	RMN ^1H (400 MHz; CDCl_3)	RMN ^{13}C (100 MHz; CDCl_3)	HSQC	DEPT135	RMN ^1H (300 MHz; CDCl_3)*	RMN ^{13}C (75 MHz; CDCl_3)*
1	1,83-1,86 (<i>m</i>)	56,6	1,85-1,91	CH		56,5
2	1,72-1,75 (<i>m</i>)	24,0	1,71-1,76	CH2		23,8
3	1,62-1,67 (<i>m</i>)	41,4	1,60-1,7	CH2		41,2
4	-	80,6	-	C		80,4
5	1,27-1,32 (<i>m</i>)	48,7	1,24-1,26	CH		48,5
6	0,41 (<i>dd</i> ; 9,5 e 10,8 Hz)	28,5	0,40-0,49	CH	0,42 (<i>dd</i> ; 10,9 e 9,4 Hz)	28,4
7	0,59-0,66 (<i>m</i>)	26,9	0,58-0,64	CH	0,64 (<i>m</i>)	26,7
8	0,59-0,66 (<i>m</i>)	20,4	0,58-0,64	CH2		20,1
9	1,55-1,60 (<i>m</i>)	44,5	1,57-1,59	CH2		44,5
10	-	75,3	-	C		75,1
11	-	19,8	-	C		19,6
12	1,02 (<i>s</i>)	28,9	1,02	CH3	1,03 (<i>s</i>)	28,7
13	1,02 (<i>s</i>)	16,7	1,02	CH3	1,03 (<i>s</i>)	16,5
14	1,16 (<i>s</i>)	20,6	1,16	CH3	1,17 (<i>s</i>)	20,4
15	1,24 (<i>s</i>)	24,7	1,24	CH3	1,25 (<i>s</i>)	24,5

Fonte: O autor.

O espectro de massas do 4 β ,10 α -aromadendranodiol é mostrado na Figura 35 e as propostas de suas fragmentações na Figura 36.

Figura 35. Espectro de CG-EM do 4 β ,10 α -aromadendranodiol.

Fonte: O autor.

Figura 36. Propostas de fragmentações para o 4 β ,10 α -aromadendranodiol.

Fonte: O autor.

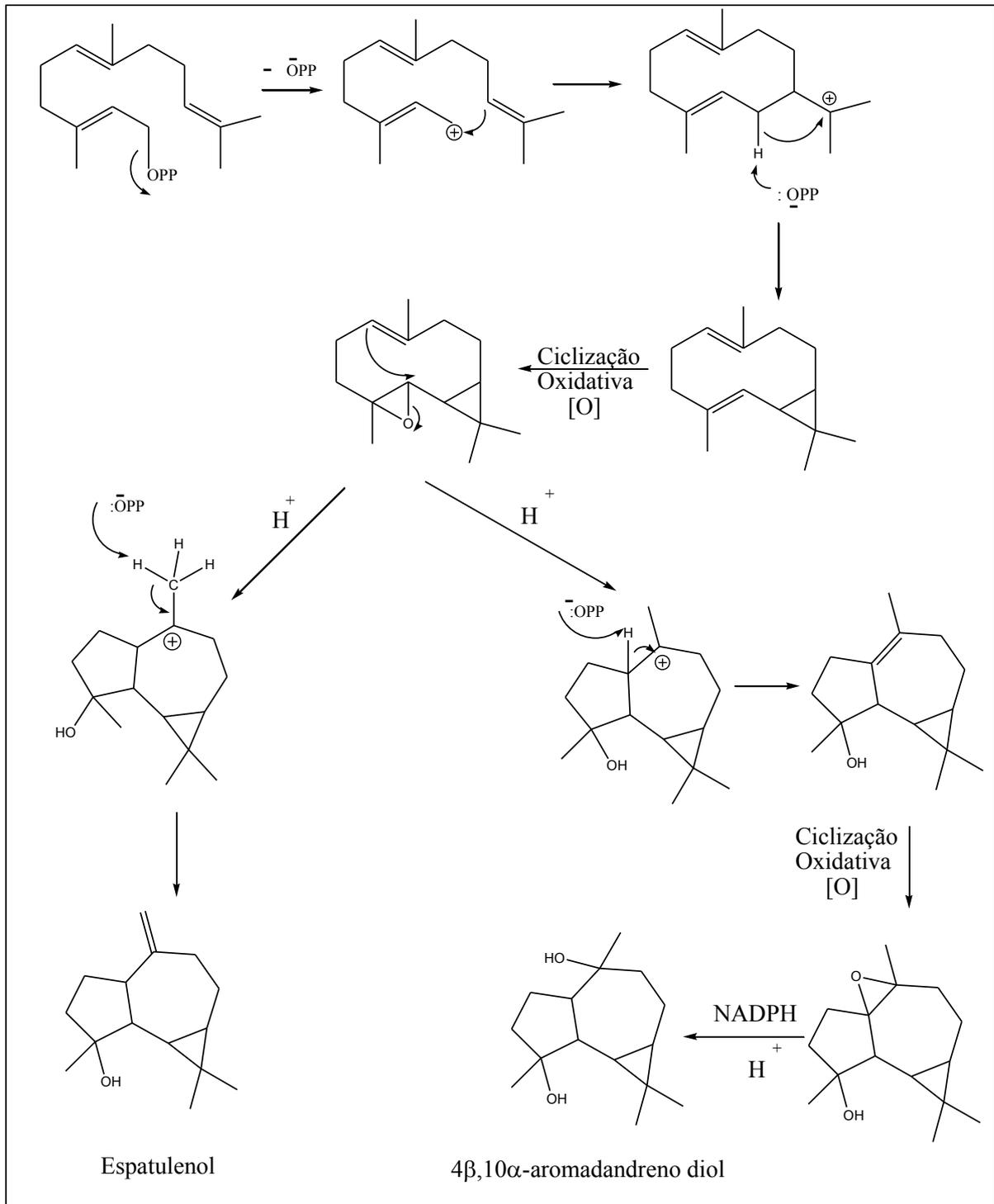
O espectro de massas do 4 β ,10 α -aromadendranodiol apresenta picos referentes as seguintes fragmentações:

- m/z 220 [M-18] referente a perda de água pelo íon molecular 238;
- m/z 205 [M-18-15] referente a perda de um radical metílico pelo íon molecular 220;
- m/z 177 [M-18-15-28] referente a perda de um eteno pelo íon molecular 205;
- m/z 162 [M-18-15-28-15] referente a perda de outro radical metílico pelo íon molecular 177;
- m/z 44 [M-194] referente a perda de X pelo íon molecular 238;

m/z 40 [M-198] referente a perda de 7-isopropil-2,6-dimetilbicyclo[3.2.0]heptano-2,6-diol pelo íon molecular 238;

A maioria dos compostos sesquiterpênicos, nas reações enzimáticas, é derivado do FPP que sofrem ciclizações e rearranjos para a formação destes compostos (GUSEN; WUNBERG; GOOT, 1995). Sendo assim, foi proposta a rota biossintética para a formação do espatulenol e do 4 β ,10 α -aromadendranodiol (Figura 37).

Figura 37. Propostas de rotas biossintéticas para formação do espatulenol e 4 β ,10 α -aromadendranodiol.



Fonte: O autor.

5.2.1.3 Identificação de 1 β -11,dihidróxi-5-eudesmeno

Inicialmente a fração MVM_10 foi injetada no GC-DIC e exibiu um pico com tempo de retenção igual a 46,9 min (Figura 38).

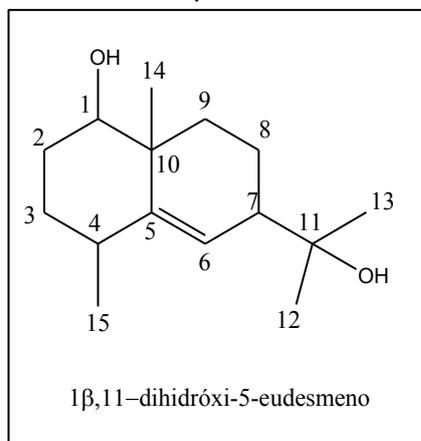
Figura 38. Cromatograma de CG-DIC da fração MVM_10.



Fonte: O autor.

Em seguida, a fração MVM_10 foi analisada por RMN de ^1H e RMN de ^{13}C . Os sinais dos espectros de RMN de ^1H e suas ampliações (Apêndice P) e de RMN de ^{13}C (Apêndice Q) foram compatíveis com a presença de um sesquiterpeno conhecido como 1 β ,11-dihidróxi-5-eudesmeno (Figura 39), que possui esqueleto do tipo eudesmano.

Figura 39. Estrutura do 1 β ,11-dihidróxi-5-eudesmeno.



Fonte: O autor.

Na Tabela 10 são apresentados os sinais do espectro de RMN de ^1H sinais em δ 5,56 (*d*; 3,2 Hz) atribuídos ao hidrogênio (H-6) da dupla ligação endocíclica e em δ 3,30 (*dd*; 4,3 e 11,5 Hz) referente ao (H-1). Os sinais das metilas foram observados em δ 1,19 (*s*) (H-13), δ 1,18 (*s*) (H-12), δ 1,14 (*d*; 3,2 Hz) (H-15) e δ 1,08 (*s*) (H-14). O espectro mostra também regiões congestionadas de difícil interpretação da multiplicidade, os quais aparecem entre δ 1,55 (H-3) e δ 2,03 (H-7), devido à presença de centros estereogênicos.

Os sinais apresentados no RMN de ^{13}C (Tabela 10) do 1 β ,11-dihidróxi-5-eudesmeno verifica-se a presença de quinze carbonos distintos, os quais confirmam a presença de um esqueleto sesquiterpênico. Pela análise do DEPT 135 (Apêndice R), e pelo RMN de ^{13}C foi verificada a presença de 3 carbonos quaternários situados em δ 149,2 (C-5), δ 73,9 (C-11) e δ 40,3 (C-10). Há também um carbono carbinólico (C-1) situado em δ 78,7 situado no anel β e em δ 73,9 (C-11) o carbono quaternário do anel hexacíclico insaturado.

O espectro de HSQC (Apêndice S) ajudou na elucidação estrutural pois foi feita a correlação do carbono com o hidrogênio vizinho, para a proposição da molécula. As expansões do espectro de HSQC encontram-se nos Apêndices T e U.

A fração MVM_10 foi injetada no CG-EM mas o 1 β ,11-dihidróxi-5-eudesmeno não foi identificado nas bibliotecas do equipamento.

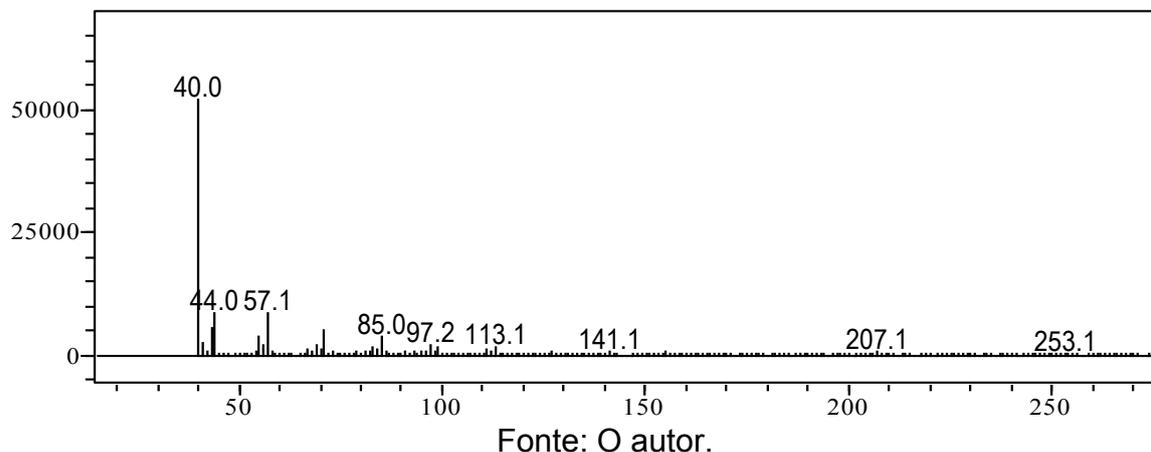
Tabela 10. Atribuição dos deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C no espectro de RMN do $1\beta,11$ -dihidróxi-5-eudesmeno em comparação com a literatura.

Nº	$1\beta,11$ -dihidróxi-5-eudesmeno				(BLAS; ZAPP; BECKER, 2004)	
	RMN ^1H (400 MHz; CDCl_3)	RMN ^{13}C (100 MHz; CDCl_3)	HSQC	DEPT135	RMN ^1H (400 MHz; CDCl_3)*	RMN ^{13}C (100 MHz; CDCl_3)*
1	3,30 (<i>dd</i> ; 4,3 e 11,5 Hz)	78,7	3,29- 3,32	CH	3,30 (<i>dd</i> ; 4,0 e 11,5 Hz)	78,3
2	1,80 (<i>m</i> ;2a) e 1,61 (<i>m</i> ;2b)	26,7	1,61- 1,79	CH2	1,80 (<i>m</i> ;2a) e 1,65 (<i>m</i> ;2b)	26,5
3	1,55-1,59 (<i>m</i>)	31,1	1,53- 1,58	CH2	1,55 (<i>m</i>)	30,8
4	2,42-2,46 (<i>m</i>)	38,8	2,41- 2,46	CH	2,42 (<i>m</i>)	38,6
5	-	149,2	-	C	-	148,9
6	5,56 (<i>d</i> ; 3,2 Hz)	123,9	5,55- 5,57	CH	5,55 (<i>d</i> ; 3,0 Hz)	123,4
7	2,02-2,06(<i>m</i>)	45,8	2,02- 2,06	CH	2,02 (<i>m</i>)	45,5
8	1,64-1,66 (<i>m</i> ;8a) e 1,55- 1,58(<i>m</i> ;8b)	20,4	1,66- 1,57	CH2	1,65 (<i>m</i> ;8a) e 1,58 (<i>m</i> ;8b)	20,1
9	1,66-1,68 (<i>m</i> ;9a) e 1,54-1,57 (<i>m</i> ;9b)	35,1	1,66- 1,54	CH2	1,65 (<i>m</i> ;9a) e 1,51 (<i>m</i> ;9b)	34,8
10	-	40,3	-	C	-	40,0
11	-	73,9	-	C	-	73,3
12	1,18 (<i>s</i>)	27,4	1,18	CH3	1,18 (<i>s</i>)	27,1
13	1,19 (<i>s</i>)	28,3	1,19	CH3	1,18 (<i>s</i>)	27,9
14	1,08 (<i>s</i>)	20,9	1,08	CH3	1,07 (<i>s</i>)	20,6
15	1,14 (<i>d</i> ; 8,2 Hz)	22,5	1,14	CH3	1,13 (<i>d</i> ; 7,9 Hz)	22,2

Fonte: O autor

Na Figura 40 estão representadas o espectro de massas da substância 3 e suas respectivas fragmentações na Figura 41.

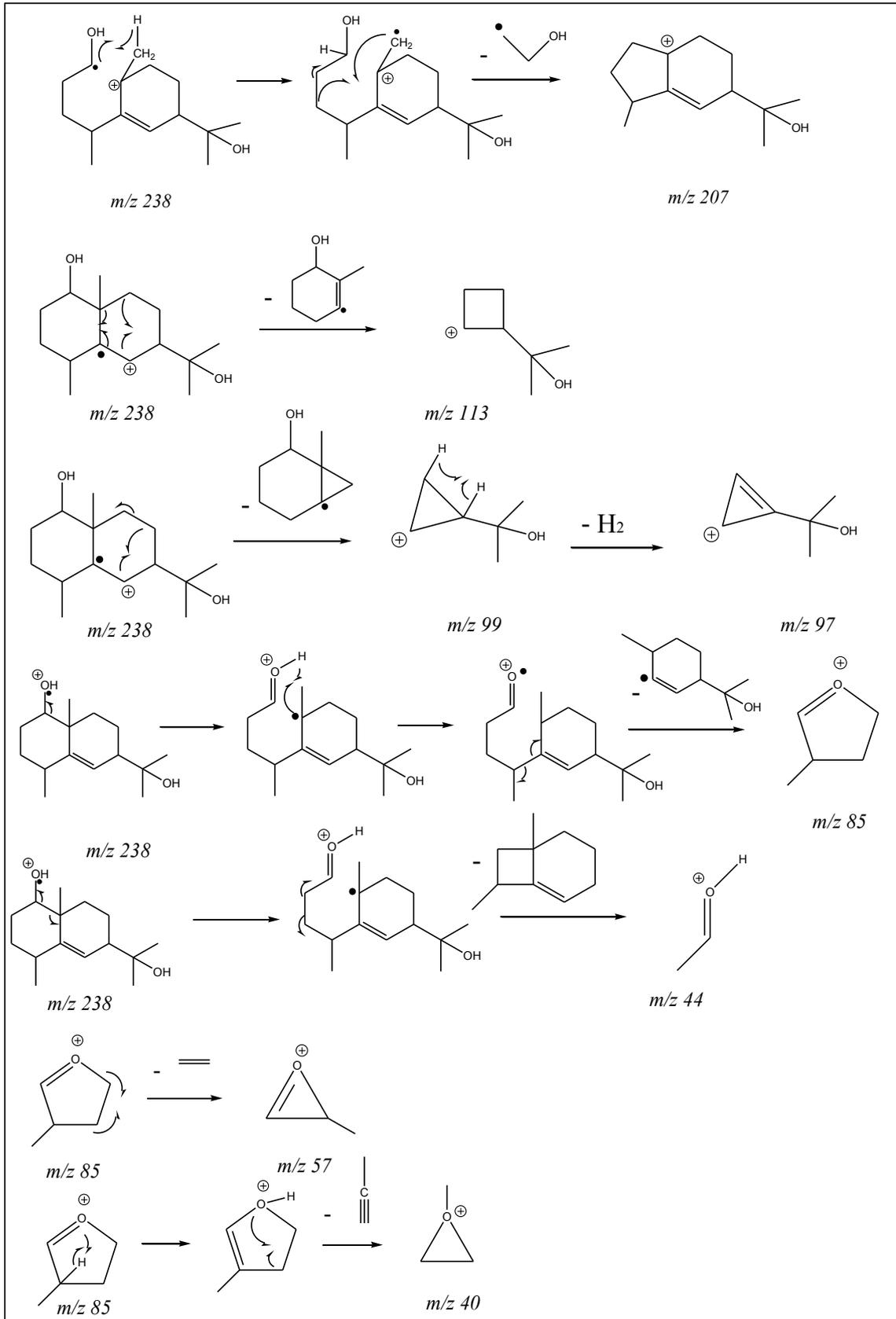
Figura 40. Espectro de CG-EM do 1 β ,11-dihidr3xi-5-eudesmeno.



O espectro de massas do 1 β ,11-dihidr3xi-5-eudesmeno apresenta picos referentes as seguintes fragmentações:

- m/z 207 [M-31] referente a perda de um radical metan3lico pelo 3on molecular m/z 238;
- m/z 113 [M-125] referente a perda de um radical 2-metil-ciclohex-2-enol pelo 3on molecular m/z 238;
- m/z 97 [M-141] referente a perda de um radical 1-metilbiciclo[4.1.0]heptan-2-ol pelo 3on molecular m/z 238, seguido de perda de uma mol3cula de hidrog3nio;
- m/z 85 [M-153] referente a perda de um radical 2-4(metilciclohex-2-enil)propano-2-ol pelo 3on molecular 238;
- m/z 44 [M-194] referente a perda de 6,8-dimetilbiciclo[4..20]oct-1-eno pelo 3on molecular m/z 238;
- m/z 40 [M-45] referente a perda de prop-1-ino pelo 3on molecular m/z 85;
- m/z 57 [M-28] referente a perda de eteno pelo 3on molecular m/z 85.

Figura 41. Propostas de fragmentações para o 1 β ,11-dihidróxi-5-eudesmeno.



Fonte: O autor.

De acordo com Cramer e Tran (2014), a biossíntese destes compostos têm como precursor o biciclogermacreno que é formado a partir do difosfato de geranila. Inicialmente ocorre uma desfosforilação no difosfato de geranila seguido de isomerização para a estabilização do carbocátion primário. Com a ajuda de uma base retira-se um hidrogênio β em relação ao carbocátion para formar o anel tricíclico, gerando o biciclogermacreno. Para a formação do espatulenol ocorre uma ciclização oxidativa e a retirada de um hidrogênio α em relação ao carbocátion, para produzir a dupla exocíclica.

Para a formação do $4\beta,10\alpha$ -aromadandrenodiol ocorrem duas ciclizações oxidativas, no qual no último passo um hidreto, fornecido pelo NADPH, possibilita a abertura do anel epoxidado para formação do diol (DEWICK, 2002).

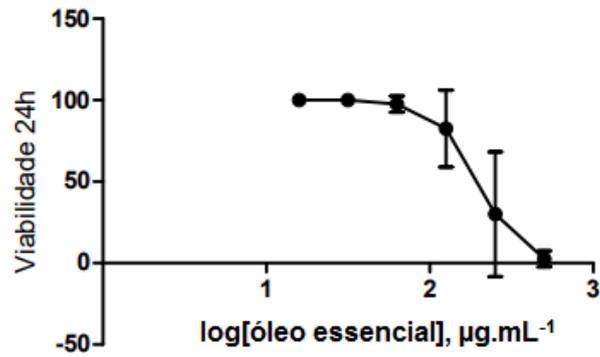
5.3 Atividade larvicida do óleo essencial de *E. calycina* frente ao *Aedes aegypti*

O óleo essencial foi avaliado quanto à atividade contra as larvas do 3º estágio de *Aedes aegypti*, sendo o resultado dado em “Concentração Letal 50” (CL₅₀), que é a concentração letal para matar 50% das larvas.

Inicialmente, o óleo essencial de *E. calycina* foi testado na concentração de 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ com as larvas de *Aedes aegypti* para verificar o efeito larvicida do mesmo e os compostos isolados foram testados com concentração de 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Estes valores de concentração foram padronizados pelo Laboratório de Farmacognosia da Universidade de Brasília (UnB) (RODRIGUES et al., 2006).

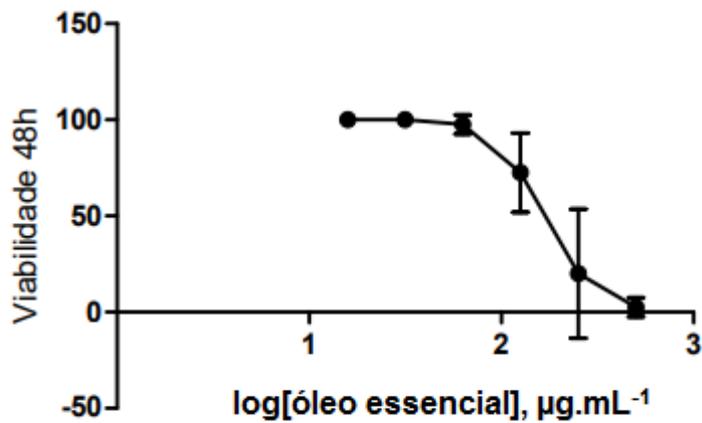
Foi verificado para o óleo essencial que, em 24 horas, houve mortalidade de 90% das larvas de 3º estágio de *Aedes aegypti*. Sendo assim, foi realizada a diluição seriada do mesmo. O cálculo do CL₅₀ foi obtido com a média dos resultados, sendo gerado uma curva de regressão não linear no programa Graph Pad Prism®, expresso em viabilidade (horas) versus concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$). A solução de DMSO em água declorada, bem como o controle com água declorada não tiveram nenhum efeito sobre as larvas. As Figuras 42, 43 e 44 mostram os gráficos do óleo essencial avaliado em 24, 48 e 72 horas, e, a Tabela 11 expressa as equações a partir das quais estes gráficos foram gerados, onde y é a viabilidade e x é igual ao log CL₅₀.

Figura 42. Gráfico para o cálculo do CL₅₀ após 24 horas de exposição.



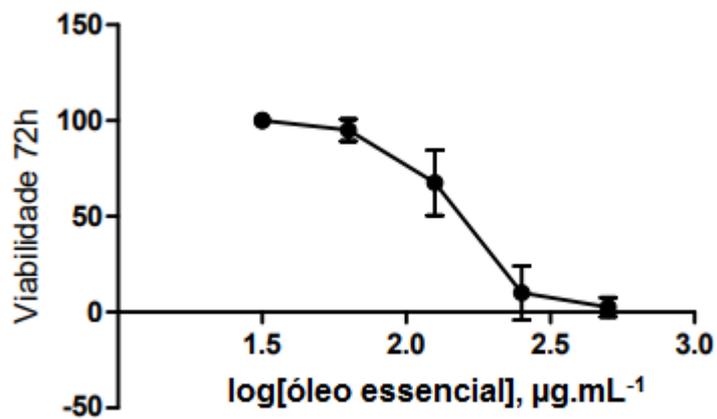
Fonte: O autor.

Figura 43. Gráfico para o cálculo do CL₅₀ após 48 horas de exposição.



Fonte: O autor.

Figura 44. Gráfico para o cálculo do CL₅₀ após 72 horas de exposição.



Fonte: O autor.

Tabela 11. Equações realizadas para o cálculo do CL₅₀.

Tempo de exposição (h)	Equação	R ²	CL ₅₀ (µg mL ⁻¹)
24	$y = -1,714 + \frac{101,634}{1 + 10^{(2,3-x).(-3,411)}}$	0,8506	199,3 ± 1,2
48	$y = 0,3785 + \frac{100,0215}{1 + 10^{(2,221-x).(-3,442)}}$	0,8872	166,4 ± 1,1
72	$y = 1,593 + \frac{97,637}{1 + 10^{(2,171-x).(-4,349)}}$	0,9608	148,3 ± 1,1

Fonte: O autor.

Os valores obtidos de CL₅₀ para a exposição das larvas em 24, 48 e 72h foram de 199,3 ± 1,1, 166,4 ± 1,2 e 148,3 ± 1,1 µg mL⁻¹ respectivamente. Na Tabela 12 são apresentados alguns valores de CL₅₀ de espécies da família Myrtaceae para 24 horas de exposição.

De acordo com Komalamisra et al. (2005), os valores de CL₅₀ menores que 50 µg mL⁻¹ são considerados extremamente ativos, entre 50 e 100 µg mL⁻¹ possuem atividade moderada e entre 100 e 750 µg mL⁻¹, uma atividade fraca.

Tabela 12. Concentração letal (CL₅₀) frente a larvas de *Aedes aegypti* de óleos essenciais da família Myrtaceae para 24 horas de exposição.

Espécie	CL ₅₀ (µg mL ⁻¹)	Referência
<i>Eugenia brojoensis</i>	215	SILVA et al., 2015
<i>Myrcia erythroxylon</i>	>1000	DIAS et al., 2015
<i>Psidium myrsinites</i>	292	DIAS et al., 2015
<i>Eugenia pihaiensis</i>	230	DIAS et al., 2015
<i>Myrcia ovata</i>	192	LIMA et al., 2011
<i>Eucalyptus urophylla</i>	96	CHENG et al., 2009 ^a .
<i>Eucalyptus camadulensis</i>	31	CHENG et al., 2009 ^a .
<i>Eugenia triquetra</i>	65	MORA et al., 2010
<i>Psidium rotandum</i>	164	AGUILERA et al., 2003
<i>Eugenia melanadenia</i>	220	AGUILERA et al., 2003

Fonte: O autor.

A espécie *Eugenia calycina* apresentou um CL₅₀ de 199,3 µg mL⁻¹, o que é comparável com outras espécies *Eugenia* como *E. brojoensis*, *E. pihaiensis*, *E. melanadenia*. Existem outras espécies pertencentes à família Myrtaceae como *M. ovata*, *P. rotandum* e *P. myrsinites* que apresentaram valores semelhantes de CL₅₀ para 24 horas de exposição.

Nestas espécies os constituintes voláteis majoritários encontrados são sesquiterpenos cíclicos oxigenados e não oxigenados. Por outro lado, as espécies *E. triquetra*, *E. camadulensis* e *E. urophylla* apresentaram atividade larvicida moderada,

superiores aos de *E. calycina*. Isto se deve a presença majoritária de compostos monoterpênicos como linalol, limoneno, α -pineno, β -pineno e *p*-ocimeno (SILVA et al., 2015; DIAS et al., 2015; MORA et al., 2010).

De acordo com Cheng et al. (2009) os valores apresentados na Tabela 12 são atribuídos aos compostos monoterpênicos, que são detentores da atividade larvicida.

Recentemente estes compostos foram encontrados em cinco cultivares da espécie *Psidium guajava* e apresentaram CL_{50} entre 39,48 a 69,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (MENDES et al., 2017).

O óleo essencial das folhas das espécies *Myrcia erythroxylon* apresentou CL_{50} $>1000 \mu\text{g mL}^{-1}$, e foi considerado inativo, para 24 horas de exposição (DIAS et al., 2015). Dessa forma, para o mesmo tempo de exposição, o óleo de *Psidium myrsinites* apresentou atividade larvicida efetiva com CL_{50} de 292 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (DIAS et al., 2015).

Em um estudo comparativo entre as espécies *Cymbopogon flexuosus* e *Tagetes erecta* foi verificado que o CL_{50} avaliado em 12, 24 e 48 horas frente as larvas de *Aedes aegypti* foi de 153,8; 58,7 e 24,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 81,7; 48,9 e 17,7 $\mu\text{g mL}^{-1}$ respectivamente (BHATT,2013).

Na literatura existem poucos estudos de óleos essenciais com relação a análise larvicida frente ao *Aedes aegypti* avaliadas em 48 e 72 horas tanto da família Myrtaceae, quanto no gênero *Eugenia*, o que dificulta a comparação dos valores.

Para a espécie *E. calycina* aqui estudada os melhores valores obtidos para o óleo essencial foram, após 48 e 72 horas de exposição, CL_{50} de 166,5 e 148,7 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Isto significa dizer que quanto maior o tempo de exposição das larvas de *A. aegypti* ao óleo essencial, menor quantidade do mesmo é necessária. Sendo assim o CL_{50} também será menor.

Os compostos isolados (espatulenol, 4 β ,10 α -aromadendrano diol e 1 β ,11-dihidróxi-5-eudesmeno) e os comerciais (óxido de cariofileno e β -cariofileno) também foram testados na concentração de 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$, mas foram inativos. Os mesmos então foram testados novamente na concentração de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, mas permaneceram inativos nas mesmas. Sendo assim, para os compostos isolados não foi realizado o cálculo do CL_{50} . A Tabela 13 exhibe os valores do CL_{50} para compostos isolados de óleos essenciais de espécies da família Myrtaceae, bem como de outras famílias também.

Tabela 13. Concentração letal (CL₅₀) frente a larvas de *A. aegypti* de compostos isolados para 24 horas de exposição.

Espécie	Composto	CL ₅₀ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Referência
<i>Eugenia caryophyllata</i>	eugenol	3,6	MEDEIROS et al., 2013.
<i>Psidium guajava</i>	1,8-cineol	47,9	LIMA et al., 2011.
<i>Plectranthus amboinicus</i>	carvacrol	58,9	LIMA et al., 2011.
<i>Eucalyptus urophylla</i>	α -terpineol	14,7	CHENG et al., 2009.
	α -felandreno	16,6	
<i>Eucalyptus camaldulensis</i>	limoneno	18,1	CHENG et al., 2009.
	<i>p</i> -cimeno	19,2	
	terpinoleno	28,4	
<i>Eucalyptus camaldulensis</i>	χ -terpineno	30,7	CHENG et al., 2009.
	α -terpineol	14,7	
	β -eudesmol	1,19	
	β -pineno	27,69	
<i>Clausena anisata</i>	sabineno	21,20	GOVINDARAJAN, M., 2010.
	germacreno-D	18,76	
	Estragol	12,70	
	linalol	38,64	
	β -cariofileno	93,65	PERUMALSAMY; KIM; AHN, 2009.
	camfeno	70,46	
	eucarvona	117,93	
<i>Asarum heterotropoides</i>	fecheno	72,17	
	metileugenol	53,30	
	myristicina	76,99	
	pentadecano	97,58	
	α -felandreno	13,84	
	3,4,5-trimetóxitolueno	74,76	
<i>Asarum heterotropoides</i>	verbenona	96,02	PERUMALSAMY; KIM; AHN, 2009.
	safrol	8,22	
	borneol	91,56	
<i>Laurencia dendroidea</i>	(-)-elato	10,0	SALVADOR-NETO et al., 2016.
	(+)-obtusol	10,7	
<i>Chloroxylon swietenia</i>	geigereno	43,4	KIRAN et al., 2006.
	prejeijereno	28,3	
	α -pineno	>50	CHENG et al., 2009.
	β -mirceno	27,9	
<i>Clauseana excavata</i>	3-careno	25,3	
	α -cariofileno	>50	
	óxido de cariofileno	>50	CHENG et al., 2009 ^b .
	α -terpineno	28,1	
<i>Cryptomera japonica</i>	terpinen-4-ol	>100	CHENG et al., 2009 ^c .
	16-kaureno	57,0	
	elemol	>100	

Os constituintes voláteis apresentados são, em sua maioria, sesquiterpenos oxigenados e não oxigenados que são detentores da atividade larvicida. Alguns monoterpenos, como o limoneno e o β -mirceno possuem atividade larvicida superior a alguns sesquiterpenos, e, exercem funções de proteção as plantas que o produzem (VIEGAS, 2003). Alguns inseticidas botânicos podem ter ação no sistema neuroendócrino das larvas onde ocorre a de troca de muda (ecdise), interferindo na respiração celular, e, na síntese de ATP também, levando a morte (MENEZES, 2005).

De acordo com a Tabela 13, observa-se que a maioria dos compostos isolados monoterpênicos possuem um menor valor de CL₅₀ e uma maior atividade larvicida, se comparados com os constituintes sesquiterpênicos.

Os compostos isolados de *E. calycina* e os padrões comerciais fornecidos estudados não exibiram atividade larvicida. Logo, pode-se concluir que é o efeito sinérgico dos compostos do óleo essencial que é detentor de tal atividade.

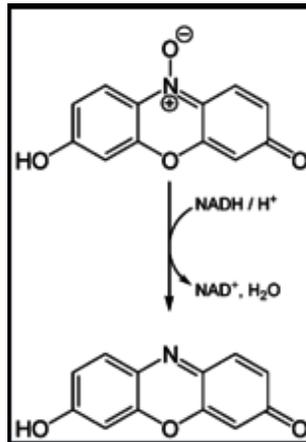
5.4 Avaliação da atividade citotóxica

Nos sistemas de cultura de célula *in vitro* os compostos citotóxicos interferem nas ligações celulares resultando em uma alteração significativa de sua morfologia afetando negativamente a taxa de crescimento celular e causando a sua morte (HORVÁTH, 1980)

Os testes para a determinação da concentração, utilizando indicadores de oxidação-redução, são rápidos e são importantes para se determinar a taxa de resistência aos fármacos (RIBEIRO et al., 2004)

Neste trabalho, o indicador colorimétrico conhecido como resasurina foi empregado. Esta espécie azul não-fluorescente é reduzida a um corante rosa fluorescente (resofurina) através da perda de uma molécula de oxigênio que é consumida no metabolismo celular (O'BRIEN et al., 2000). A redução deste composto está representada na Figura 45.

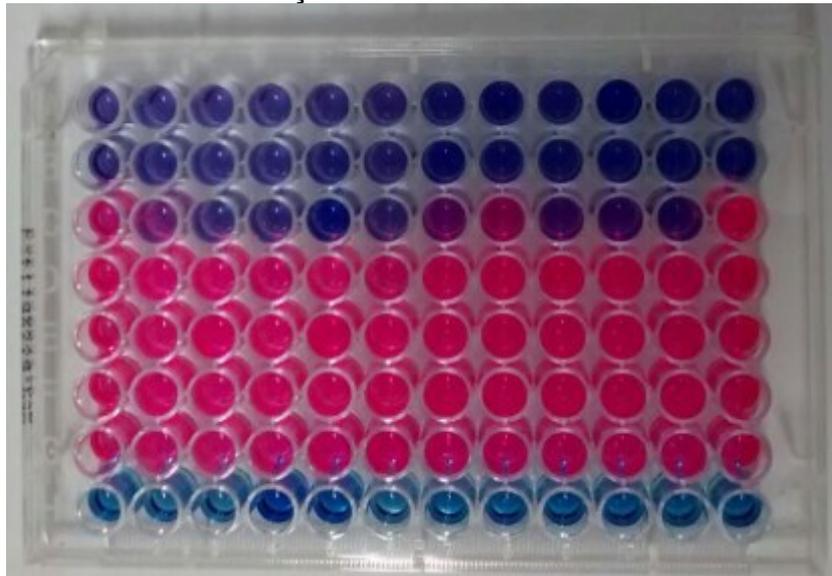
Figura 45. Reação de conversão da resasurina em resofurina



Fonte: Adaptado de Silva et al.,2016.

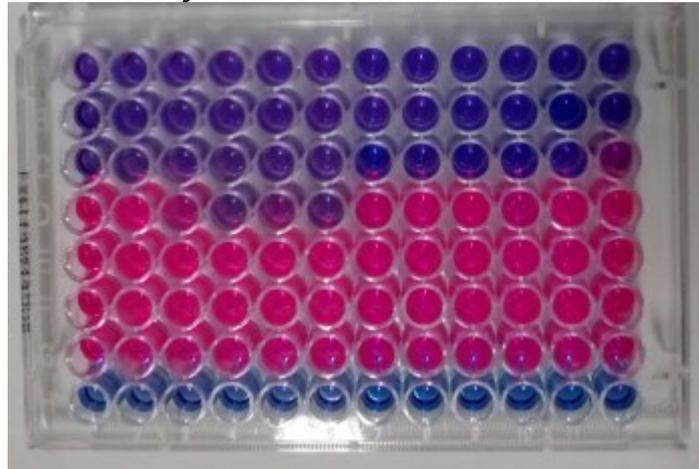
Nas Figuras 46 e 47 estão representadas as placas de 96 poços utilizadas no experimento, no qual foram avaliados para os tempos de 24 e 48 horas.

Figura 46. Placa de 96 poços utilizada na análise de citotoxicidade após 24 horas de incubação com o óleo essencial



Fonte: O autor.

Figura 47. Placa de 96 poços utilizada na análise de citotoxicidade após 48 horas de incubação com o óleo essencial



Fonte: O autor.

Os resultados de CC_{50} da atividade citotóxica das amostras de óleo essencial da *E. calycina* foram obtidos a partir da análise dos gráficos de viabilidade celular avaliados em 24 e 48 horas respectivamente (Tabela 14).

Tabela 14. Resultados da concentração citotóxica (CC_{50}) em 24 e 48 horas frente as células HeLa e Vero e da concentração letal (CL_{50}) contra larvas de *A. aegypti* do óleo essencial das folhas de *E. calycina* avaliada.

CC_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$) 24 h	CL_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$) 24 h	CC_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$) 48 h	CL_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$) 48 h
240,3 ± 39,2 (HeLa)	199,3 ± 1,2	266,8 ± 46,5 (HeLa)	166,4 ± 1,1
167,2 ± 24,5 (Vero)		312,1 ± 42,5 (Vero)	

Fonte: O autor

Analisando a Tabela 14 verifica-se que o óleo foi mais tóxico para as células Vero (em 24h) enquanto que em 48h foi mais tóxico para as células HeLa; para ambas as células se verificou que CC_{50} aumenta com o tempo de exposição. No estudo de Sousa et al. (2015) com o óleo de *E. calycina* foi observado CC_{50} de $137,4 \pm 9,6 \mu\text{g mL}^{-1}$, após 24 h de exposição de células HeLa (usando revelador MTT). O óleo atual apresentou menor citotoxicidade, fato que pode ser explicado pela diferença de proporção da composição do óleo explicada pela data de coleta diferente, bem como pelo tipo de revelador utilizado.

Comparando esses resultados com OE de outras espécies, a *Eugenia uniflora* exibiu CE_{50} de $172,4 \mu\text{g mL}^{-1}$ frente as células Vero, após 24 horas de incubação (AZEREDO et al., 2014).

Em um estudo recente as espécies *E. flavescens*, *E. patrisii* e *E. polystachya* apresentaram potencial tóxico perante células HCT-116 (câncer de cólon de útero), com CE_{50} inferiores a $17 \mu\text{g mL}^{-1}$ (SILVA et al., 2017).

As espécies *M. piperita*, *M. spicata*, *M. pulegium*, *M. longifolia*, *M. aquatica* apresentaram atividade tóxica frente as células HeLa e Vero com CC_{50} inferior a $42,7 \mu\text{g mL}^{-1}$ após 24 horas de incubação (RAHIMIFARD et al., 2010).

Os compostos isolados α -pineno e (-)-limoneno apresentaram CC_{50} de 86,8 e $154,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ respectivamente, e, 1,8-cineol, linalol, terpinen-4-ol, β -cariofileno, (+)-limoneno e β -mirceno com valores superiores a $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ frente as células Vero. Para as células HeLa estes compostos mostraram potencial tóxico com CC_{50} entre $22,1$ e $31,6 \mu\text{g mL}^{-1}$ (YÁNEZ-RUEDA et al., 2009). Em outro trabalho o β -cariofileno e o α -humuleno apresentaram CC_{50} entre $80,3$ e $109,7 \mu\text{g mL}^{-1}$ para a linhagem Vero, e, para a HeLa de $19,8$ a $29,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ (SILVA; FIGUEIREDO; YANO, 2007).

Com os valores de CL_{50} obtidos no ensaio larvicida e os valores de CC_{50} , foi possível calcular o índice de seletividade (IS) (Tabela 15) utilizando a seguinte equação: $IS = \log (CC_{50}/CL_{50})$. O valor de IS mostra se o óleo é seletivo para inibir o crescimento de uma célula saudável ou o crescimento dos microrganismos. Valores de IS positivos e próximos a 2 possuem potencial para ser estudados já que esses valores demonstram maior seletividade para microrganismos, enquanto valores negativos apresentam maior citotoxicidade (CASE et al., 2006).

Tabela 15. Índice de seletividade do óleo essencial das folhas de *E. calycina* avaliada em 24 e 48 horas.

IS	IS
24 h	48 h
0,08	0,20
(HeLa)	(HeLa)
- 0,08	0,27
(Vero)	(Vero)

Fonte: O autor

Comparando a concentração citotóxica com a atividade larvicida, pode-se verificar que, de maneira geral, a CC_{50} apresenta valor superior ao LC_{50} , mostrando que o OE de *E. calycina* se apresenta mais ativos contra as larvas de *A. aegypti* do

que citotóxicos para células HeLa e Vero. Isso pode ser observado na Tabela 15 onde o índice de seletividade indicou que os óleos são mais ativos contra as larvas que tóxicos para células HeLa e Vero avaliadas em 48h, uma vez que são positivos. Isso mostra a potencialidade deste óleo essencial ser utilizado como um larvicida.

6.0 Conclusões

O óleo essencial das folhas de *E. calycina* apresentou rendimento superior a ao de outras plantas da mesma família, sendo composto essencialmente de sesquiterpenos cíclicos. O fracionamento do óleo essencial permitiu o isolamento de três sesquiterpenos oxigenados conhecidos como espatulenol, 4 β ,10 α -aromadendrano diol e 1 β ,11-dihidróxi-5-eudesmeno, sendo que os dois últimos são compostos inéditos na espécie *E. calycina*.

Dentre os compostos identificados encontram-se quatro compostos que possuem reconhecida atividade larvicida: β -cariofileno, aromadendrano, germacreno-D e óxido cariofileno.

Além disso, o óleo essencial apresentou uma atividade efetiva frente as larvas de 3º estágio de *Aedes aegypti*, mas, com os compostos isolados, não foi observado atividade a 25 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

O CL₅₀ das concentrações do óleo essencial frente as larvas de *Aedes aegypti* apresentou o melhor valor de 148,7 $\mu\text{g mL}^{-1}$, avaliado para 72 horas de exposição. A partir deste experimento conclui-se que quanto maior é o tempo de exposição ao óleo essencial, menor quantidade deste será necessária, diminuindo o valor do CL₅₀. Além disso, verificou-se que a concentração citotóxica para células Vero e HeLa são superiores ao CL₅₀, mostrando baixa citotoxicidade para as células testadas em relação a CL₅₀. Isso pode ser observado pelo índice de seletividade (IS) foi positivo em 48h de exposição do óleo contra as células Vero e HeLa, mostrando que é mais ativo que citotóxico.

Assim, esses resultados evidenciam o potencial o uso do óleo da espécie *E. calycina* como larvicida frente ao mosquito *Aedes aegypti*, além disso mostra que o efeito larvicida do óleo pode ser explicado pelo efeito sinérgico entre os seus constituintes.

Referências

- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy**. ed. Carol Stream: Allured Bussiness Media, 2007. 804 p.
Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2015.05.007>
- AGUILERA et al. Efecto letal de Myrtaceas cubanas sobre *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Revista Cubana de Medicina Tropical**, v. 55, n. 2, p. 100-104, 2003.
- ALI, B. et al. Essential oils used in aromatherapy: a systemic review. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 5, n. 8, p. 601-611, 2015.
Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2015.05.007>
- ALI, N. A. A. et al. Essential oil composition from oleogum resin of soqotraen *Commiphora kua*. **Records of Natural Products**, v. 2, n. 3, p. 70-75, 2008.
- ALMEIDA, A. C. et al. Atividade antisséptica do óleo essencial de *Lippia origanoides* Cham. (alecrim-pimenta) na presença de leite bovino. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, n. 9, p. 905-911, 2016. Disponível em:
<https://doi.org/10.1590/s0100-736x2016000900018>
- APEL, M. A. et al. Chemical composition of the essential oils from southern Brazilian *Eugenia* species. Part III. **Journal of Essential Oil Research**, v. 14, n. 4, p. 259-262, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10412905.2002.9699847>
- ARANTES, A. A., MONTEIRO, R. A família Myrtaceae na Estação Ecológica do Panga, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil. **Lundiana**, v. 3, n. 2, p. 111-127, 2002.
- AZEREDO, C. M. O. et al. In vitro biological evaluation of eight different essential oils against *Trypanosoma cruzi*, with emphasis on *Cinnamomum verum* essential oil. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, n. 309, p. 1-8, 2014.
Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1472-6882-14-309>

BELLO, A. et al. Major components of the leaf oil of *Eugenia banderensis* Urb. **Journal of Essential Oil Research**, v. 7, n. 6, p. 687-698, 1995.

Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10412905.1995.9700535>

BESERRA, E. B. et al. Ciclo de vida de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera, Culicidae) em águas com diferentes características. **Iheringia, Série. Zoologia**, v.99, n.3, p. 281-285, 2009.

Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0073-47212009000300008>

BHATT, B. J. Comparative analysis of larvicidal activity of essential oils of *Cymbopogon flexuosus* (Lemon grass) and *Tagetes erecta* (Marigold) against *Aedes aegypti* larvae. **European Journal of Experimental Biology**, v. 3, n. 5, p. 422-427, 2013.

BARTH, O. M. **Atlas of dengue viruses morphology and morphogenesis**. Rio de Janeiro, RJ: [Instituto Fiocruz], 2000.

Disponível em:

<http://www.fiocruz.br/ioc/media/2010%20Atlas%20completo%20rede.pdf>. Acesso em: 13 nov. 2017.

BLAS, B.; ZAPP, J.; BECKER, H. Ent-clerodane diterpenes and other constituents from the liverwort *Adelanthus lindenbergianus* (Lehm.) Mitt. **Phytochemistry**, v. 65, n. 1, p. 127-137, 2004.

Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(03\)00387-X](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(03)00387-X)

BOGOCH et al. Anticipating the international spread of Zika virus from Brazil. **The Lancet**, v. 387, n. 10016, p. 335–336, 2016.

Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00080-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00080-5)

BISEN, P. S.; RAGHUVANSHI, R. **Emerging epidemics: management and control**. John Wiley & Sons, 2013.

Disponível em: <https://doi.org/10.1002/9781118393277>

BUSS, E.A.; PARK-BROWN, S.G. Natural products for insect pest management. **Institute of Food and Agricultural Sciences**. Gainesville: University of Florida/IFAS, 2002.

CAMARGO, M. J. et al. Sesquiterpenos de *Ocotea lancifolia* (Lauraceae). **Quimica Nova**, v. 36, n. 7, p. 1008-1013, 2013.

Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422013000700015>

CARNEIRO, N. S. et al. Óleo essencial das flores de *Eugenia klotzschiana* (Myrtaceae): composição química e atividades tripanocida e citotóxica in vitro. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 3, p. 1381-1392, 2017.

Disponível em: <https://doi.org/10.21577/1984-6835.20170080>

CASE, R. J. et al. Ethnopharmacological evaluation of the informant consensus model on anti-tuberculosis claims among the Manus. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 106, n. 1, p. 82-89, 2006.

Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.12.005>

CARSON, C. F.; MEE, B. J.; RILEY, T. V. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 46, n. 6, p. 1914–1920, 2002.

Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AAC.46.6.1914-1920.2002>

CASTELO, A. V. M.; MENEZZI, C H. S. D.; RESCK, I. S. Rendimento e análises espectroscópicas (RMN ¹H, ¹³C; IV) da composição química dos óleos essenciais de quatro plantas do cerrado. **Cerne**, v. 16, n. 4, p. 573-584, 2010.

Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0104-77602010000400017>

CHAIEB, K. et al. Antioxidant properties of the essential oil of *Eugenia caryophyllata* and its antifungal activity against a large number of clinical *Candida* species. **Mycoses**, v. 50, n. 5, p. 403–406, 2007.

Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2007.01391.x>

CHENG et al^a. Chemical compositions and larvicidal activities of leaf essential oils from two *Eucalyptus* species. **Bioresource Technology**, v.100, n. 1, p. 452-456, 2009.

Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.02.038>

CHENG et al^b. Insecticidal activities of leaf and twig essential oils from *Clausena excavata* against *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* larvae. **Pest Management Science**, v. 65, n. 3, p. 339-343, 2009.

Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ps.1693>

CHENG et al^c. Variations in insecticidal activity and chemical compositions of leaf essential oils from *Cryptomeria japonica* at different ages. **Bioresource Technology**, +v. 100, n. 1, p. 465-470, 2009.

Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.11.060>

CICCIA, G.; COUSSIO, J.; MONGELLI, E. Insecticidal activity against *Aedes aegypti* larvae of some medicinal South American plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 72, n. 1-2, p. 185-189, 2000.

Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(00\)00241-5](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(00)00241-5)

CLEMONS, A. et al. *Aedes aegypti* culturing and egg collection. **Cold Spring Harbor Protocols**, Oct 29, 2010.

Disponível em: <https://doi.org/10.1101/pdb.prot5507>

COLE, R. A., HABER, W. A., SETZER, W. N. Chemical composition of essential oils of seven species of *Eugenia* from Monteverde, Costa Rica. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, n. 12, p. 877-886, 2007.

Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bse.2007.06.013>

CONSOLI, R. A. G. B.; OLIVEIRA, R. L. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. Rio de Janeiro (RJ). Editora FIOCRUZ, 1994.

Disponível em: <https://doi.org/10.7476/9788575412909>

CORNWELL et al. Origin of (+)-d-cadinene and the cubenols in the essential oils of the Myrtaceae. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 2000, n. 15, p. 352-361, 2000.

Disponível em: [https://doi.org/10.1002/1099-1026\(200009/10\)15:5<352::AID-FFJ925>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/1099-1026(200009/10)15:5<352::AID-FFJ925>3.0.CO;2-R)

COSTA, T. R. et al. Antifungal activity of volatile constituents of *Eugenia dysenterica* leaf oil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 72, n. 1-2, p. 111–117, 2000.

Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(00\)00214-2](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(00)00214-2)

CRAMER, N.; TRAN, D. N. Biomimetic synthesis of (+)-Ledene, (+)-Viridiflorol, (-)-Palustrol, (+)-Spathulenol, and Psiguadial A, C, and D via the platform terpene (+)-Bicyclogermacrene. **European Journal of Chemistry**, v. 20, n. 34, p. 1-7, 2014.

DEFAVIERI et al. Chemical and Biological Evaluation of Essential Oils from Two Species of Myrtaceae — *Eugenia uniflora* L. and *Plinia trunciflora* (O. Berg) Kausel. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 8, p. 1531-1538, 2011.

Dewick, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 2nd. New York: John Wiley & Sons, 2002.

DIAS, C. N. et al. Chemical composition and larvicidal activity of essential oils extracted from Brazilian legal Amazon plants against *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, 8 pages, 2015.

DIAS, C. N.; MORAES, D. F. C. Essential oils and their compounds as *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) larvicides: review. **Parasitology research**, v. 113, n.2, p. 565-592, 2014.

Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3687-6>

DIAS, D. A.; URBAN, S.; ROESSNER, U. A historical overview of natural products in drug discovery. **Metabolites**, v. 16, n. 2, p. 303-36, 2012.

Disponível em: <https://doi.org/10.3390/metabo2020303>

DUPONT-ROUZEYROL, M. et al. Chikungunya virus and the mosquito vector *Aedes aegypti* in New Caledonia (South Pacific region). **Vector-borne and Zoonotic Diseases**, v. 12, n. 12, p. 1036-1041, 2012.

Disponível em: <https://doi.org/10.1089/vbz.2011.0937>

FIGUEIREDO, L. T. M. Uso de células de *Aedes albopictus* C6/36 na propagação e classificação de arbovirus das famílias Togaviridae, Flaviviridae, Bunyaviridae e Rhabdoviridae. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 23, n. 1, p. 13-18, 1990.

Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0037-86821990000100003>

FORZZA, R. C. et al. **Catálogo de plantas e fungos do Brasil**, Rio de Janeiro (RJ), v. 1, p. 78-99, 2010.

FRANCO, M. R. B.; SHIBAMOTO, T. Volatile composition of some brazilian fruits: umbu-caja (*Spondias citherea*), camu-camu (*Myrciaria dubia*), araçá-boi (*Eugenia stipitata*), and cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 4, p. 1263-1265, 2000.

Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jf9900074>

FRODIN, G. D. History and concepts of big plant genera. Richmond, **Taxon**, v. 53, n. 3, p. 753-776, 2004.

Disponível em: <https://doi.org/10.2307/4135449>

FUNASA - Fundação Nacional de Saúde. **Dengue: instruções para pessoal de combate ao vetor: manual de normas técnicas**. Fundação Nacional de Saúde; 3ed.rev; abr.2001.

GARCEZ, W. S. et al. Substâncias de origem vegetal com atividade larvicida contra *Aedes aegypti*. **Revista Virtual de Química**, v.5, n. 3, p. 363-393, 2013.

GARDNER, C. L.; RYMAN, K. D. Yellow Fever: A Reemerging Threat. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 30, n. 1, p. 237-260, 2010.

Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cll.2010.01.001>

GALHEIGO, M. R. U. et al. Antidiarrhoeic effect of *Eugenia dysenterica* DC (Myrtaceae) leaf essential oil. **Natural Product Research**, v. 30, n. 10, p. 1182-1185, 2015.

Disponível em: <https://doi.org/10.1080/14786419.2015.1043633>

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, [S.l.], v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GOCAN, S. Eluotropic series of solvents for thin-layer chromatography. **Encyclopedia of chromatography**, 2004.

GOLFAKHRABADI, F. et al. Biological activities and composition of *Ferulago carduchorum* essential oil. **Journal of Arthropod-Borne Disease**, v. 9, n. 1, p. 104-115, 2015.

GOMES, A. S.; SCIAVICO, C. J. S.; EIRAS, A. E. Periodicidade de oviposição de fêmeas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) em laboratório e campo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 4, p. 327-332, 2006.

Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0037-86822006000400002>

GOTTLIEB, H. E.; KOTLAYAR, V.; NUDELMAN, A. NMR Chemical shifts of common laboratory solvents as trace impurities. **Journal of Organic Chemistry**, v. 62, n. 21, p. 7512-7515, 1997.

Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jo971176v>

GOVINDARAJAN, M. Chemical composition and larvicidal activity of leaf essential oil from *Clausena anisata* (Willd.) Hook. f. ex Benth (Rutaceae) against three mosquito species. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 3, n. 11, p. 874-877, 2010.

Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(10\)60210-6](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(10)60210-6)

GUBLER, D. J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 3, p. 480-496, 1998.

GUSEN, H. J. M.; WIJNBERG, J. B. P. A.; GROOT, A. Structure, occurrence, biosynthesis, biological activity, synthesis, and chemistry of aromadendrane sesquiterpenoids. **Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe**, v. 64, p. 149-193, 1995.

Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-3-7091-9337-2_3

HARRINGTON, L. C; EDMAN, J. D; SCOTT, T. W. et al. Why do female *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) feed preferentially and frequently on human blood? **Journal of medical entomology**, v. 38, n. 3, p. 411-422, 2001.

Disponível em: <https://doi.org/10.1603/0022-2585-38.3.411>

HENRIQUES, A. T. et al. Aromatic plants from Brazil. 11. The chemical composition of some *Eugenia* essential oils. **Journal of Essential Oil Research**, v. 5, n. 5, p. 501-505, 1993.

Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10412905.1993.9698270>

HORVÁTH, S. Cytotoxicity of drugs and diverse chemical agents to cell cultures. **Toxicology**, v. 16, n. 1, p. 59-66, 1980.

Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0300-483X\(80\)90110-9](https://doi.org/10.1016/0300-483X(80)90110-9)

KAUFFMANN, C. et al. Chemical composition and evaluation preliminary of antileishmanial activity in vitro of essential oil from leaves of *Eugenia pitanga*, a native species of southern of Brazil. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 20, n. 2, p. 559-569, 2017.

Disponível em: <https://doi.org/10.1080/0972060X.2017.1281767>

KIRAN, S. R. et al. Composition and larvicidal activity of leaves and stem essential oils of *Chloroxylon swietenia* DC against *Aedes aegypti* and *Anopheles stephensi*. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 18, p. 2481-2484, 2006.

Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.10.003>

KOMALAMISRA, N. et al. Screening for larvicidal activity in some thai plants against four mosquito vector species. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine Public Health**, v. 36, n. 6, p. 1412-1422, 2005.

LIMA, M. A. A. et al. Evaluation of larvicidal activity of the essential oils of plants species from Brazil against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 55, p. 11716-11720, 2011.

LAGO, J. H. G.; ROQUE, N. F. Estudo fitoquímico da madeira de *Guarea macrophylla* (Meliaceae). **Química Nova**, v. 32, n. 9, p. 2351-2354, 2009.
Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000900022>

LAGO, J. H. G. et al. Chemical and biological evaluation of essencials of two species Myrtaceae – *Eugenia uniflora* L. and *Plinia trunciflora* (O. Berg. Kausel). **Molecules**, v. 16, p. 9827-9837, 2011.
Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules16129827>

LEE, B-H. et al. Fumigant toxicity of essential oils from the Myrtaceae family and 1,8-cineole against 3 major stored-grain insects. **Journal of Stored Products Research**, v. 40, n. 5, p. 553-564, 2004.
Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2003.09.001>

LIMBERGER, R. P. Biological activities and essential oil composition of leaves of *Blepharocalyx salicifolius*. **Pharmaceutical Biology**, v. 39, n. 4, 308-311, 2001.
Disponível em: <https://doi.org/10.1076/phbi.39.4.308.5915>

LOPES, J. et al. An ecological study of the mosquito *Aedes (Stegomyia) aegypti* L. and associated culicifauna in an urban area of southern Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. 27, n. 5, p. 326-333, 1993.
Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0034-89101993000500002>

LORENZO, E. D. D.; MONDELLO, L.; COTRONEO, A. Uruguayan essential oils. Part VII. Composition of leaf oil of *Eugenia uruguayensis* Cambess. var.

uruguayensis (Myrtaceae). **Journal of Essential Oil Research**, v. 9, n. 3, p. 295-297, 1997.

Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10412905.1997.10554247>

LUPI, O.; CARNEIRO, C. G.; COELHO, I. C. B. Manifestações mucocutâneas da dengue. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 82, n. 4, p. 291-305, 2007.

Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0365-05962007000400002>

MAGINA, M. A. et al. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils of *Eugenia* species. **Journal of Natural Medicines**, v. 63, n. 3, p. 345-350, 2009.

Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11418-009-0329-5>

MARCONDES, C. B.; XIMENES, M. M. F. N. Zika virus in Brazil and the danger of infestation by *Aedes* (*Stegomyia*) mosquitoes. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, n. 1, p. 4-10, 2016.

Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0220-2015>

MARTINS, M. M. et al. Chemical composition, antimicrobial and antiprotozoal activity of essential oils from *Vernonia brasiliana* (Less) Druce (Asteraceae). **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 18, n. 3, p. 561-569, 2015.

Disponível em: <https://doi.org/10.1080/0972060X.2014.895683>

MEDEIROS, E. S. et al. Larvicidal activity of clove (*Eugenia caryophyllata*) extracts and eugenol against *Aedes aegypti* and *Anopheles darlingi*. **African Journal of Biotechnology**, v. 12, n. 8, p. 836-840, 2013.

MEDEIROS, J. D. **Guia de campo: vegetação do Cerrado 500 espécies** 532 p. ,2011.

MELO, S. A. B.; ULLER, A. M. C.; PESSOA, F. L. P. Modelagem e simulação da desterpenação do óleo da casca de laranja com CO₂ supercrítico em modo semi-contínuo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 17, n. 4, p. 457-480, 1997.

MENDES et al. Larvicidal effect of essential oils from Brazilian cultivars of guava on *Aedes aegypti* L. **Industrial Crops & Products**, v. 108, p. 684-689, 2017.

Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.07.034>

MENEZES, E. L. A. Inseticidas botânicos: seus princípios ativos, modo de ação e uso agrícola. **Seropédica: Embrapa Agrobiologia**, 2005. 58 p.

MERWE, M. M. V. D.; WYK, A. E. V.; BOTHA, A. M. Molecular phylogenetic analysis of *Eugenia* L. (Myrtaceae), with emphasis on southern African taxa. **Plant Systematics and Evolution**, v. 251, p. 21-34, n. 1, 2005.

MESQUITA, P. R. R. et al. Discrimination of *Eugenia uniflora* L. biotypes based on volatile compounds in leaves using HS-SPME/GC-MS and chemometric analysis. **Microchemical Journal**, v. 130, p. 79-87, 2017.

Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2016.08.005>

MIHAL, A. L.; POPA, M. E. Essential oils utilization in food industry - a literature review. **Scientific Bulletin. Series F. Biotechnologies**, v. XVII, 2013.

MORA, F. D. et al. *Eugenia triquetra* essential oil from Venezuelan Andes. **Natural Product Communication**, v. 5, n. 6, p. 965-965, 2010.

MORAES, M. M. et al. Essential oil composition of *Eugenia langsdorffii* O. Berg.: relationships between some terpenoids and toxicity against *Tetranychus urticae*. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 9, p. 1647-1656, 2012.

Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0103-50532012005000029>

MORENO, P. R. H. et al. ESSENTIAL OIL COMPOSITION OF FRUIT COLOUR VARIETIES OF *Eugenia brasiliensis* Lam. **Science Agriculture**, v. 64, n. 4, p. 428-432, 2007.

Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0103-90162007000400014>

MOVALIYA, S. K. Extraction of essential oil by Microwaveassisted extraction: A review. **Ijariie International Journal**, v.3, n. 2, p. 2395-4396, 2017.

MUKTAR, Y.; TAMERAT, N.; SHWAFERA, A. *Aedes aegypti* as a vector of flavivirus. **Journal of Tropical Diseases**, v. 4, n. 5, p. 1-7, 2016.

Disponível em: <https://doi.org/10.4172/2329-891X.1000223>

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 629-661, 2016.

Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b01055>

NUÑES, L.; AQUINO, M. D. Microbicide activity of clove essential oil (*Eugenia caryophyllata*). **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 1255-1260, 2012.

Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1517-83822012000400003>

O'BRIEN, J. et al. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, n. 17, p. 5421-5426, 2000.

Disponível em: <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01606.x>

O QUE É SOROTIPO? 2017. Disponível em:

<http://klick.com.br/bcoresp/bcoresp_mostra/0,6674,por-853-6599-h,00.html>.

Acesso em: 15 nov. 2017.

OEHLER, E. et al. Zika virus infection complicated by Guillain-Barre syndrome case report, French, Polynesia, December, 2013. **Euro Surveill**, v. 19, n. 9, p. 1-3, 2014.

Disponível em: <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES2014.19.9.20720>

OLIVEIRA, A. M. et al. Estudo fitoquímico e avaliação das atividades moluscicida e larvicida dos extratos da casca do caule e folha de *Eugenia malaccensis* L.

(Myrtaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 618-624, 2006. (Supl)

Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2006000500006>

OLIVEIRA, J. D. et al. Rendimento, composição química e atividades antimicrobiana e antioxidante do óleo essencial de folhas de *Campomanesia adamantium* submetidas a diferentes métodos de secagem. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, n. 2, p. 502-510, 2016.

Disponível em: https://doi.org/10.1590/1983-084X/15_206

OLIVEIRA, R. N.; DIAS, I. J. M.; CÂMARA, C. A. G. Estudo comparativo do óleo essencial de *Eugenia punicifolia* (HBK) DC. de diferentes localidades de Pernambuco. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 1, p. 39-43, 2005.

Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2005000100009>

ORIO.L. et al. Hydrodistillation and *in situ* microwave generated hydrodistillation of fresh and dried mint leaves: a comparison study. **Journal of Science of Food and Agriculture**, v. 92, n. 15, p. 3085-3090, 2012.

Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jsfa.5730>

OUZZAR, M. D. et al. Comparison of the performances of hydrodistillation and supercritical CO₂ extraction processes for essential oil extraction from Rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L.). **Chemical Engineering Transactions**, v. 43, p. 1129-1134, 2015.

PANDEY, A. K.; SINGH, P. The genus Artemisia: a 2012-2017 literature review on chemical composition, antimicrobial, insecticidal and antioxidant activities of essential oils. **Medicines (Basel)**, v. 4, n. 3, 2017.

PASCOAL, A. C. R. F. et al. Essential Oil from the Leaves of Campomanesia guaviroba (DC.) Kiaersk. (Myrtaceae): Chemical Composition, Antioxidant and Cytotoxic Activity. **Journal of Essential Oil Research**, v. 23, n. 5, p. 34-37, 2011.

Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10412905.2011.9700479>

PERUMALSAMY, H.; KIM, N-J.; AHN, Y-J. Larvicidal activity of compounds isolated from *Asarum heterotropoides* against *Culex pipiens pallens*, *Aedes aegypti*, and *Ochlerotatus togoi* (Diptera: Culicidae). **Journal of Medicinal Entomology**, v. 46, n. 6, p. 1420-1423, 2009.

Disponível em: <https://doi.org/10.1603/033.046.0624>

PESSOA, I.; FONTES, E.; GABURO, N. Dengue. **Jornal Brasileiro de Patologia Medicina Laboratorial**, v. 41, n. 5, p. 313-314, 2005.

Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1676-24442005000500005>

PIALOUX, G. et al. Chikungunya, an epidemic arbovirolosis. **Lancet Infectious Diseases**, v. 7, n. 5, p. 319-327, 2007.

Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(07\)70107-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(07)70107-X)

POURGHOLAMI, M. M. et al. Evaluation of the anticonvulsant activity of the essential oil of *Eugenia caryophyllata* in male mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 64, n. 2, p. 167-171, 1999.

QUEIROZ, J. G. Aspectos populares e científicos do uso de espécies de *Eugenia* como fitoterápico. **Etnofarmacologia**, v. 9, n. 2, 73-159, 2015.

RAHIMIFARD, N. et al. Cytotoxic effects of essential oils and extracts of some *Mentha* species on Vero, HeLa and Hep2 cell lines. **Journal of Medicinal Plants**, v. 3, n. 35, p. 88-92, 2010.

RIBEIRO, M. O. et al. Avaliação de testes rápidos em microplacas usando indicadores de viabilidade celular para determinação da susceptibilidade de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* à isoniazida e rifampicina. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 30, n. 4, p. 455-460, 2004.

Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1806-37132004000400011>

RIBEIRO, P. H. et al. Seasonal chemical compositions of the essential oils of two *Eugenia* species and their acaricidal properties. **Química Nova**, v. 39, n. 1, p. 38-43, 2016.

RIBEIRO, R. A.; RODRIGUES, F. M. Genética da conservação em espécies vegetais do cerrado. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 5, n. 3, p. 253-260, 2006.

RODRIGUES et al. Larvicidal activity of some Cerrado plant extracts against *Aedes aegypti*. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 22, n. 2, p. 314-317, 2006.

Disponível em: [https://doi.org/10.2987/8756-971X\(2006\)22\[314:LAOSCP\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.2987/8756-971X(2006)22[314:LAOSCP]2.0.CO;2)

ROMAGNOLO, M. B.; SOUZA, M. C. O gênero *Eugenia* L. (Myrtaceae) na planície de alagável do alto rio Paraná, estados de Mato Grosso do Sul e Paraná, Brasil.

Acta Botânica Brasílica, v. 20, n. 3, p. 529-548, 2006.

Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0102-33062006000300004>

ROSA et al. Composição química e toxicidade frente *Aedes aegypti* L. e *Artemia*

salina Leach do óleo essencial das folhas de *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. **Revista**

Brasileira de Plantas Medicinais, v. 18, n. 1, p. 19-26, 2016.

Disponível em: https://doi.org/10.1590/1983-084X/15_006

SALVADOR-NETO, O. et al., Larvicidal potential of the halogenated sesquiterpene (+)-obtusol, isolated from the alga *Laurencia dendroidea* J. Agardh

(*Ceramiales: Rhodomelaceae*), against the dengue vector mosquito *Aedes aegypti* (*Linnaeus*) (*Diptera: Culicidae*). **Marine Drugs**, v. 14, n. 2, p. 1-14, 2016.

Disponível em: <https://doi.org/10.3390/md14020020>

SANTOS et al. Descrição de sistema e de métodos de extração de óleos essenciais e determinação de umidade de biomassa em laboratório. **Comunicado técnico**

(**Embrapa**), 2004.

SCALVENZI, L. et al. *Myrcia splendens* (Sw.) DC. (syn. *M. fallax* (Rich.) DC.)

(Myrtaceae) Essential oil from amazonian Ecuador: a chemical characterization and bioactivity profile. **Molecules**, v. 22, n. 1163, p. 1-12, 2017.

Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules22071163>

SCHWARTZ, O.; ALBERT, M. L. Biology and pathogenesis of chikungunya virus.

Natural Reviews Microbiology, v. 8, n. 7, p. 491-500, 2010.

Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrmicro2368>

SENNA, L. M. et al. Composição volátil das folhas de *Eugenia racemulosa* O. Berg.

(Myrtaceae). **Revista Brasileira de Farmácia**, n. 92, n. 2, p. 51-54, 2011.

SILVA, A. G. et al. Chemical composition and larvicidal activity of the essential oil from *Eugenia brejoensis* Mazine (Myrtaceae). **Journal of Essencial Oil Bearing Plants**, v. 18, n. 6, p. 1441 - 1447, 2015.

Disponível em: <https://doi.org/10.1080/0972060X.2014.1000390>

SILVA, C. J. et al. Chemical composition and antibacterial activities from the essential oils of Myrtaceae species planted in Brazil. **Quimica Nova**, v. 33, n. 1, p. 104-108, 2010.

Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422010000100019>

SILVA, F. S. G. et al. Determination of metabolic viability and cell mass using a tandem resazurin/sulforhodamine b assay. **Current Protocols in Toxicology**, v. 68, p. 2.24.1-2.24.15, 2016.

SILVA, J. K. R. et al. Chemical composition of four essential oils of *Eugenia* from the Brazilian Amazon and their cytotoxic and antioxidant activity. **Medicines**, v. 4, n. 51, p. 1-10, 2017.

Disponível em: <https://doi.org/10.3390/medicines4030051>

SILVA, S. L.; FIGUEIREDO, P. M.; YANO, T. Cytotoxic evaluation of essential oil from *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. leaves. **Acta amazônica**, v. 37, n. 2, p. 281-286, 2007.

Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0044-59672007000200015>

SILVA, Y. L. et al. A triagem fitoquímica e avaliação de propriedades biológicas do extrato alcoólico das folhas de *Eugenia pyriformis* Cambess. (Myrtaceae). **Arquivo de Ciências da Saúde da Unipar**, v. 19, n. 3, p. 205-211, 2015.

SOHILAIT, H. J. Chemical composition of the essential oils in *Eugenia caryophyllata*, Thunb from Amboina Island. **Science Journal of Chemistry**, v. 3, n. 6, p. 95-99, 2015.

Disponível em: <https://doi.org/10.11648/j.sjc.20150306.13>

SOPER, F. L. *Aedes aegypti* and Yellow Fever. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 36, n. 4, p. 521-52, 1967.

SOUSA, R. M. F. et al. Chemical composition, cytotoxic, and antibacterial activity of the essential oil from *Eugenia calycina* Cambess. leaves against oral bacteria. **Industrial Crops and Products**, v. 65, p. 71-78, 2015.

Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.11.050>

SOUZA et al. Influência do horário de coleta, orientação geográfica e dossel na produção de óleo essencial de *Cordia verbenacea* DC. **Biotemas**, v. 24, n. 1, p. 9-14, 2011.

SOUZA-FILHO et al. Efeitos potencialmente alelopáticos dos óleos essenciais de *Piper hispidinervium* C. DC. e *Pogostemon heyneanus* Benth sobre plantas daninhas. **Acta Amazônica**, v. 39, n. 2, p. 389-396, 2009.

Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0044-59672009000200018>

STEFANELLO, M. E. A.; CERVI, A. C.; WISNIEWSKI JR. A. composição do óleo essencial de *Sinningia aggregata*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 15, n. 4, p. 331-333, 2005.

Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2005000400013>

STEFANELLO, M E. A.; PASCOAL, A. C. R. E.; SALVADOR, M. J. Essential oils from neotropical Myrtaceae: chemical diversity and biological properties. **Chemistry & Biodiversity**, v. 8, n. 1, p. 73-94, 2011.

Disponível em: <https://doi.org/10.1002/cbdv.201000098>

TAUIL, P. L. Urbanização de ecologia da dengue. **Caderno de Saúde Pública**, v.17, p. 99-102, 2001. (Supl)

Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0102-311X2001000700018>

TENFEN, A. et al. Chemical composition and evaluation of the antimicrobial activity of the essential oil from leaves of *Eugenia platysema*. **Natural Product Research**, v. 30, n. 17, p. 2007-2011, 2015.

Disponível em: <https://doi.org/10.1080/14786419.2015.1107056>

VICTORIA et al. Essential oil of the leaves of *Eugenia uniflora* L.: Antioxidant and antimicrobial properties. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 8, p. 2668-2674, 2012.

Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.05.002>

VIEGAS, C. V. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 390-400, 2003.

Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422003000300017>

VOLLHARDT, K. P. S.; NEIL, E. **Química Orgânica: Estrutura e Função**. 6. ed. Porto Alegre: Bookman, 2013.

WEYERSTAHL, P. et al. Volatile constituents of *Eugenia* leaf oil. **Planta Medica**, v. 54, n. 6, p. 546-549, 1988.

Disponível em: <https://doi.org/10.1055/s-2006-962544>

XAVIER, M. N. et al. Composição química do óleo volátil de *Cardiophyllum calophyllum* coletada em área de Cerrado. **Ciência Rural**, v. 46, n. 5, p. 937-942, 2016.

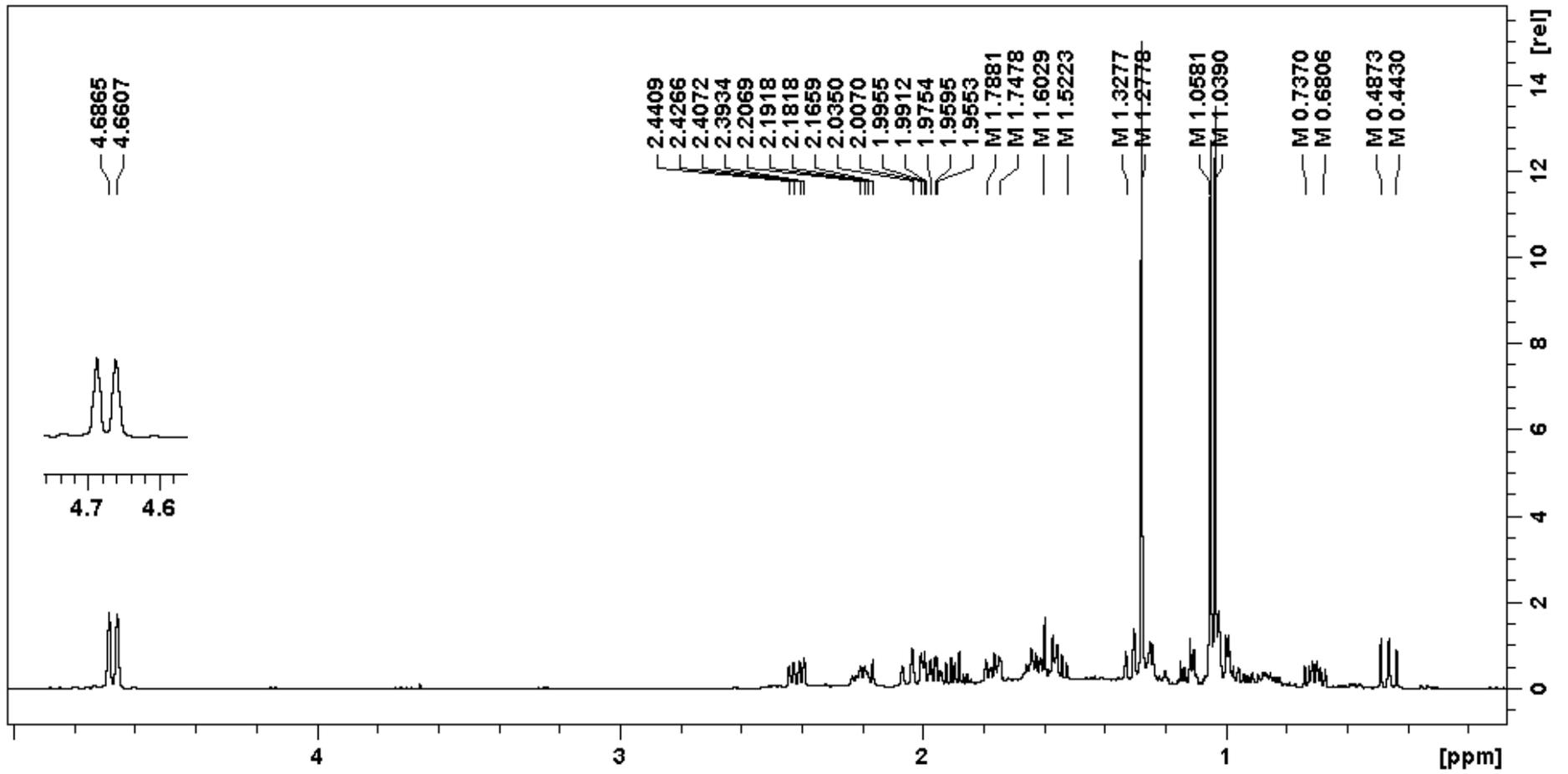
Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20150371>

YANG, Y. C. et al. Ovicidal and adulticidal effects of *Eugenia caryophyllata* bud and leaf oil compounds on *Pediculus capitis*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 17, p. 4884-4888, 2003.

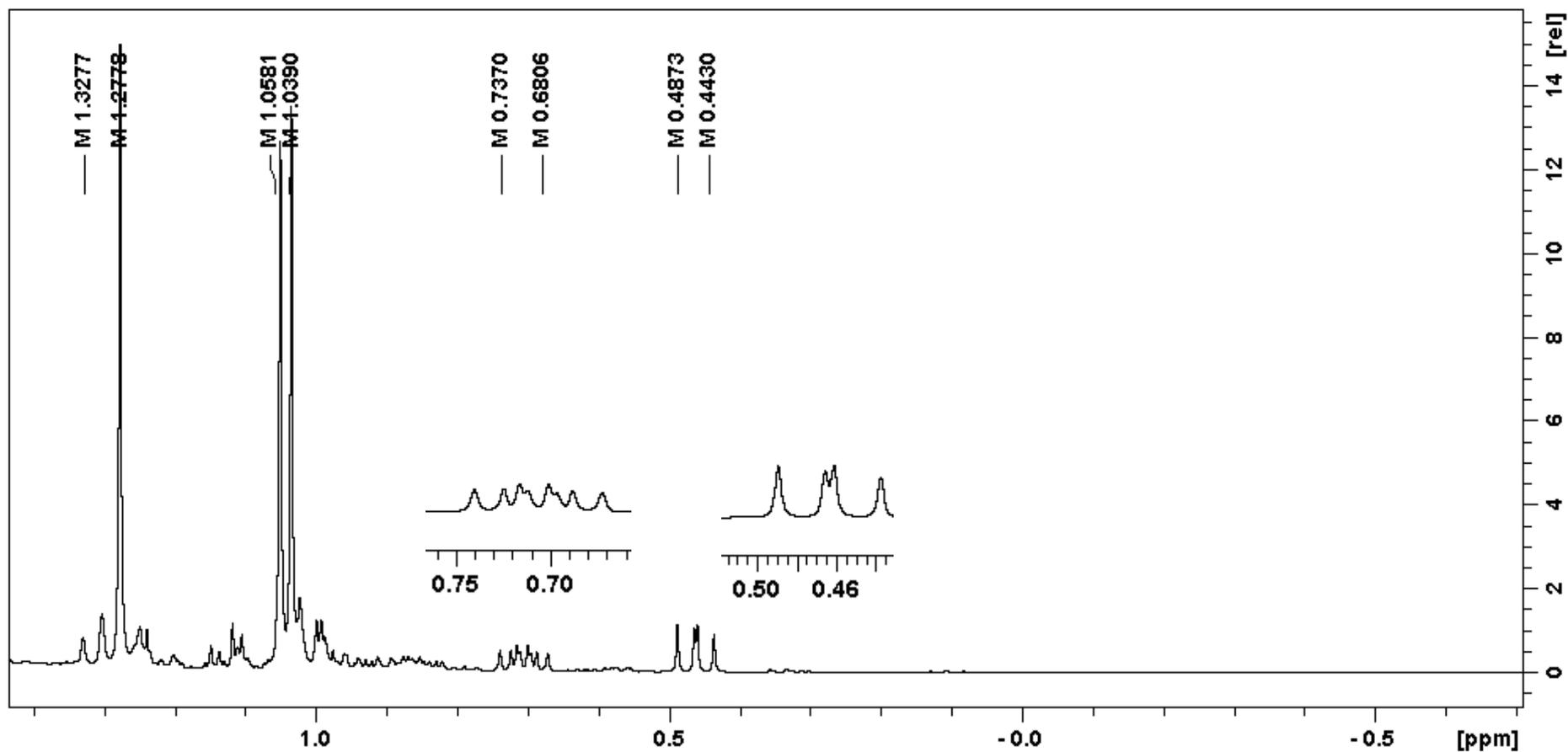
Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jf034225f>

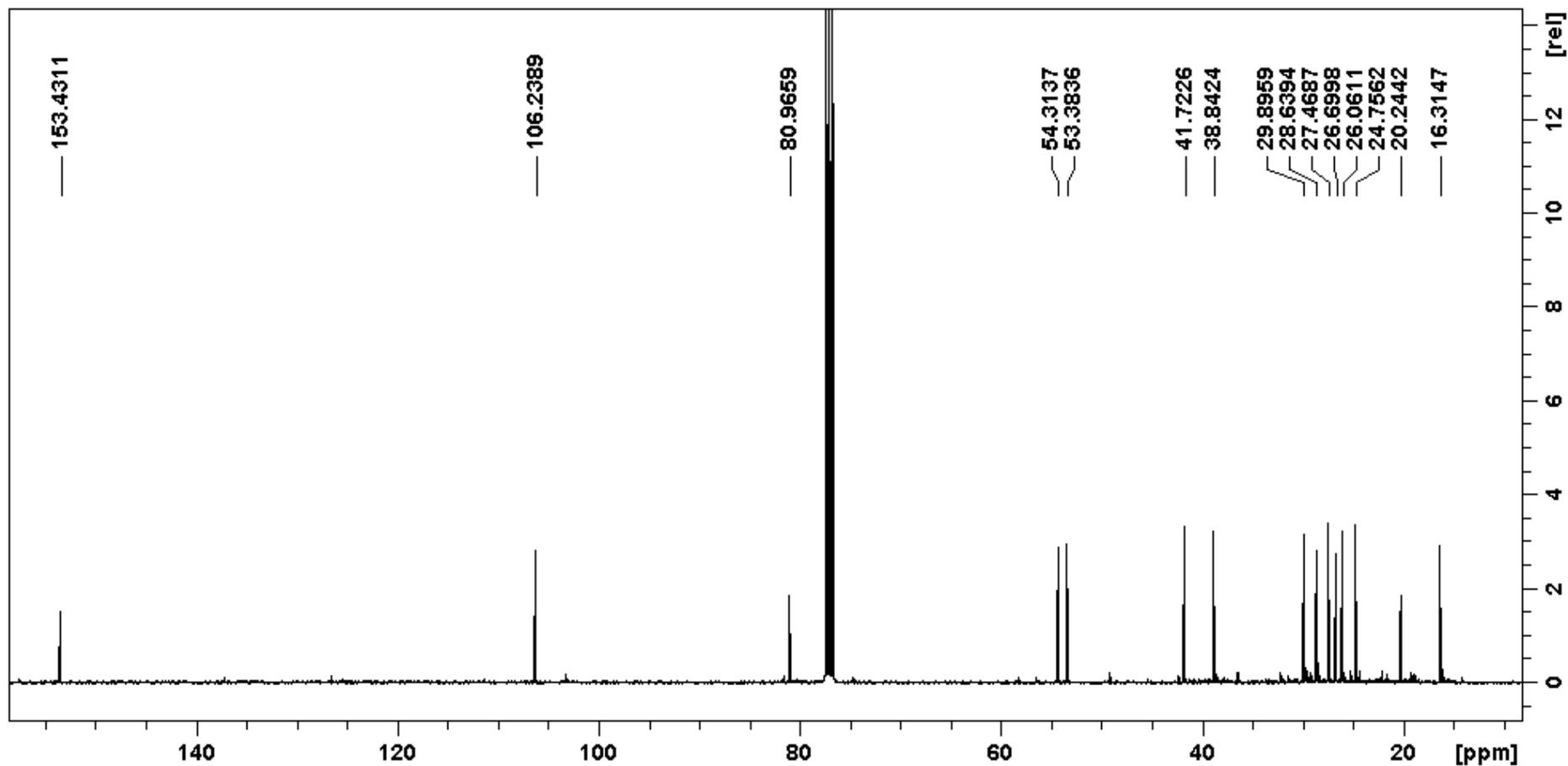
ZATELLI, G. A. et al. Antimycoplasmic activity and seasonal variation of essential oil of *Eugenia hiemalis* Cambess. (Myrtaceae). **Natural Product Research**, v. 30, n. 17, p. 1961-1964, 2015.

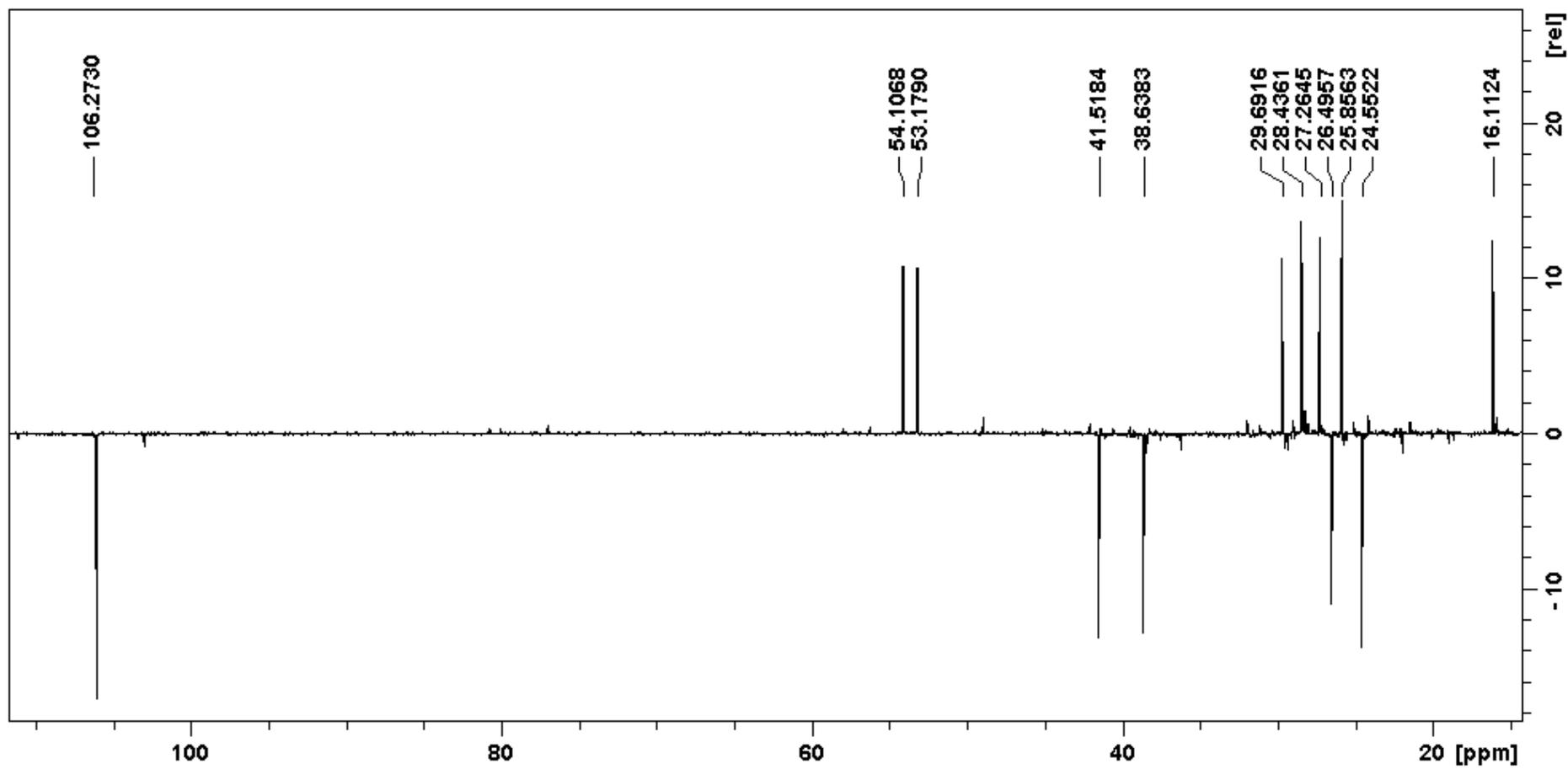
Disponível em: <https://doi.org/10.1080/14786419.2015.1091455>

Apêndice A. Espectro de RMN de ^1H do espatulenol (400 MHz; CDCl_3)

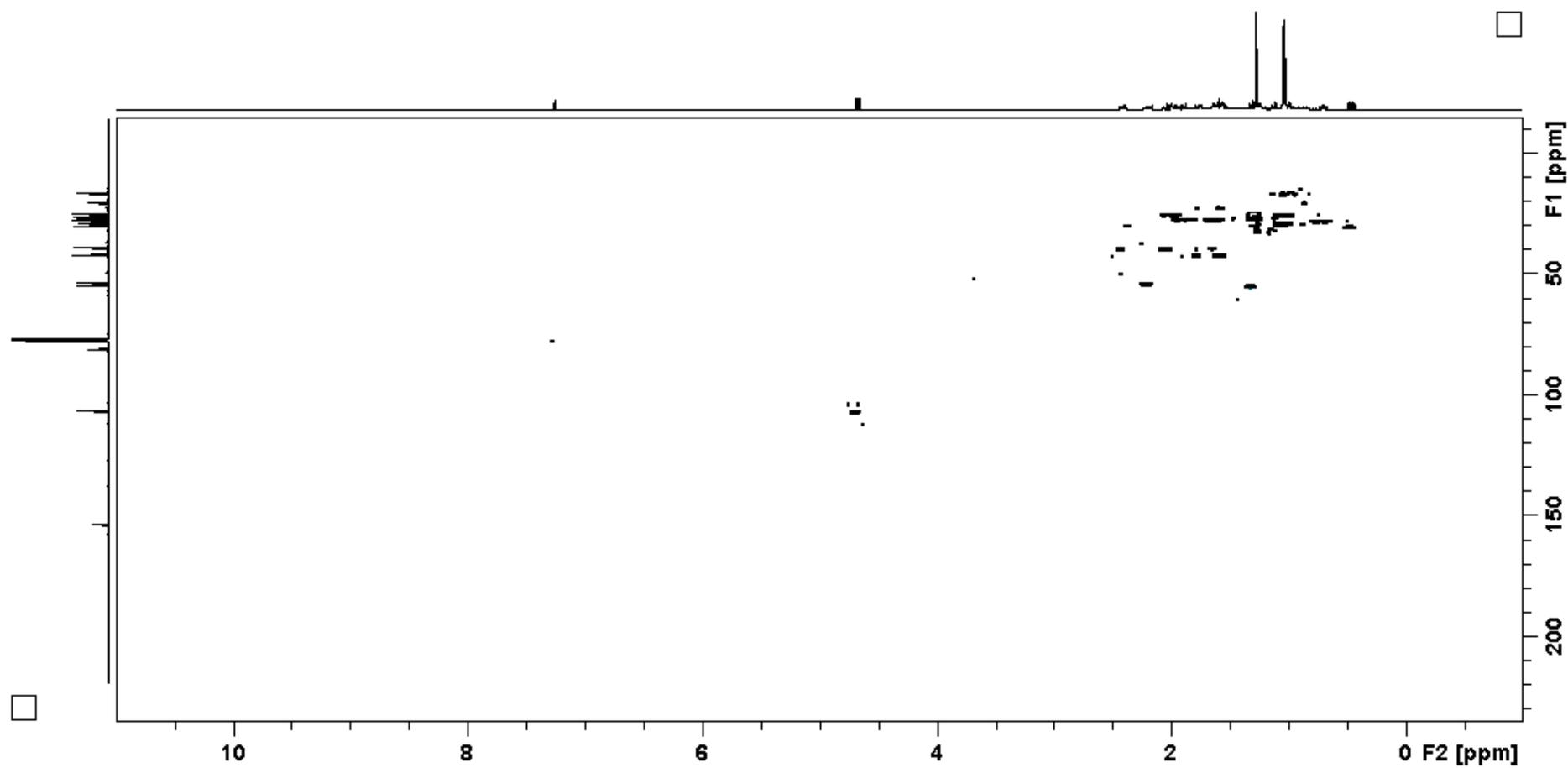
Apêndice B. Expansão da região entre 0,44 a 0,70 ppm do espectro de RMN de ^1H da do espatulenol (400 MHz; CDCl_3)



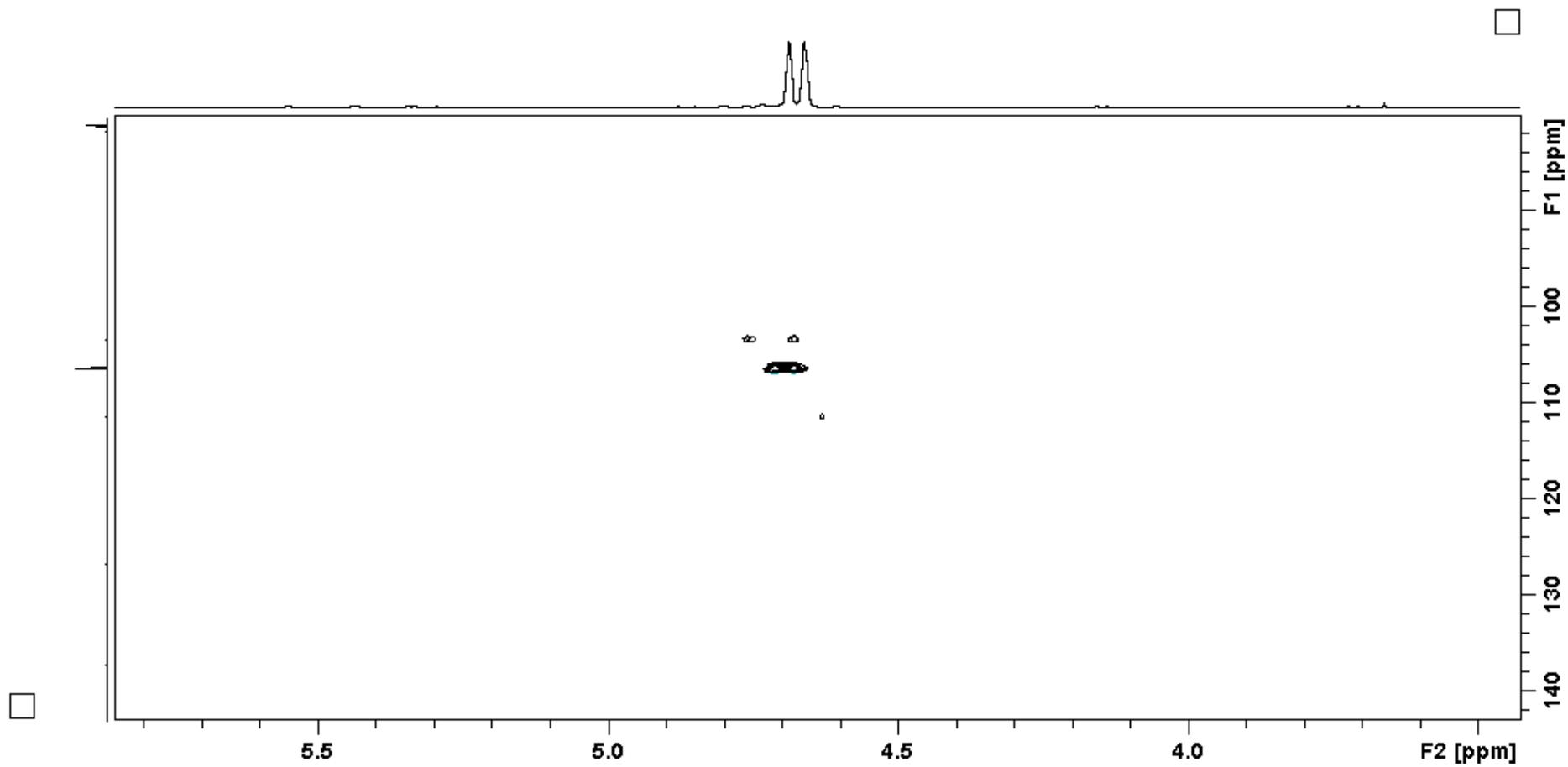
Apêndice C. Espectro de RMN ^{13}C do espatulenol (100 MHz, CDCl_3)Apêndice D. Espectro de RMN DEPT-135 do espatulenol (100 MHz, CDCl_3)



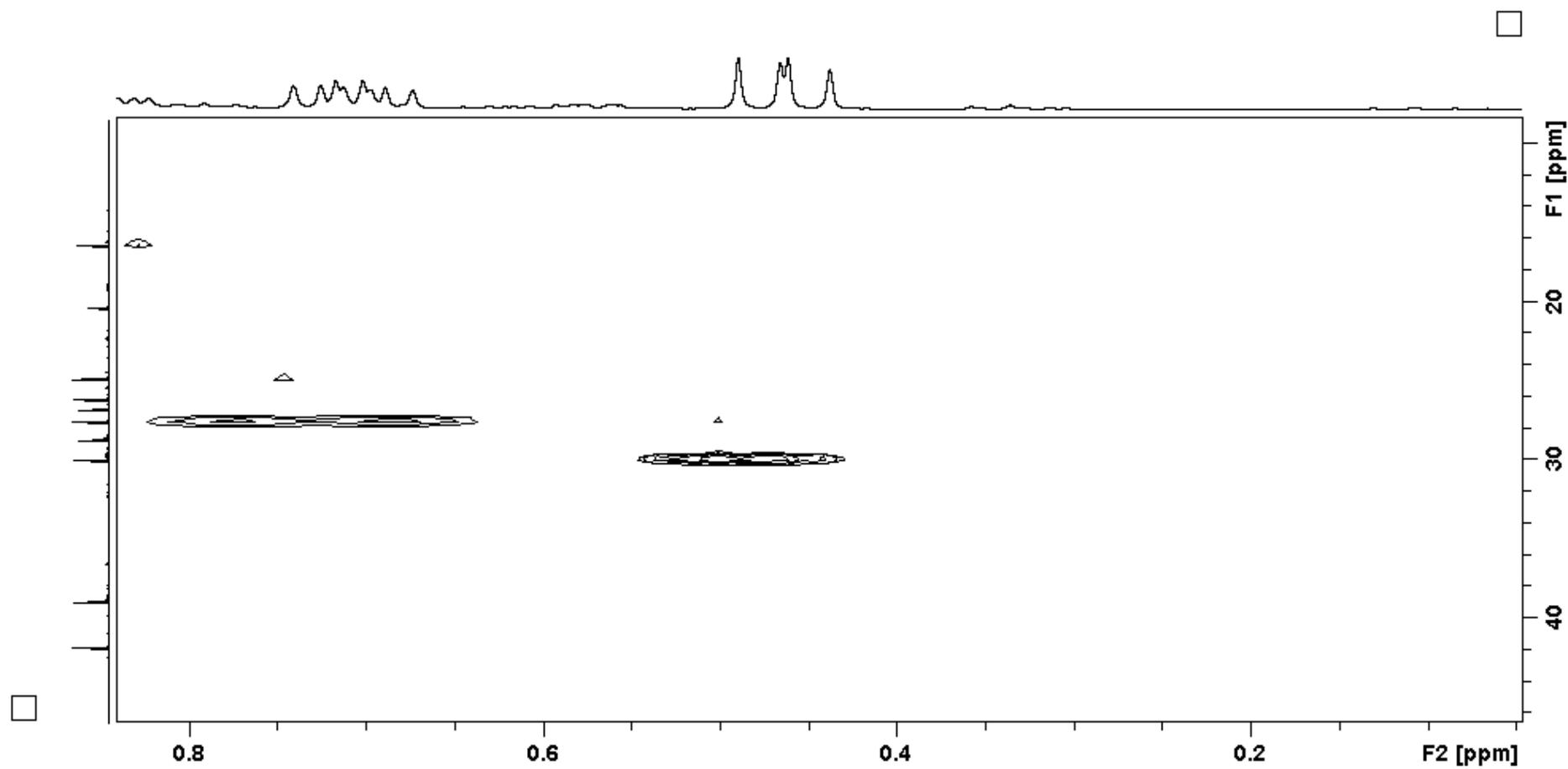
Apêndice E. Mapa de contorno de gHSQC do espatulenol



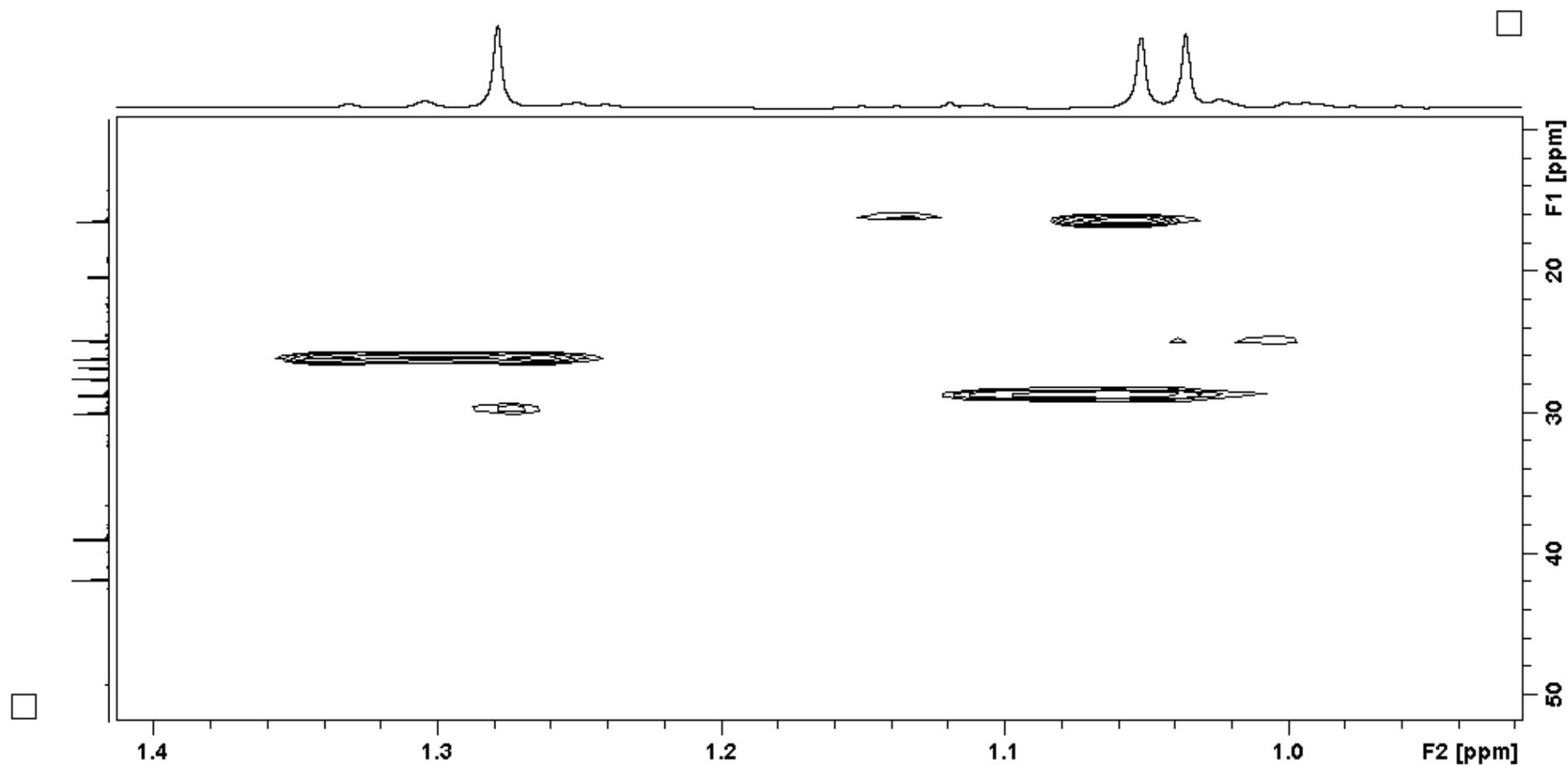
Apêndice F. Expansão da região entre 4,60 a 4,7 ppm do mapa de contorno de gHSQC do espatulenol

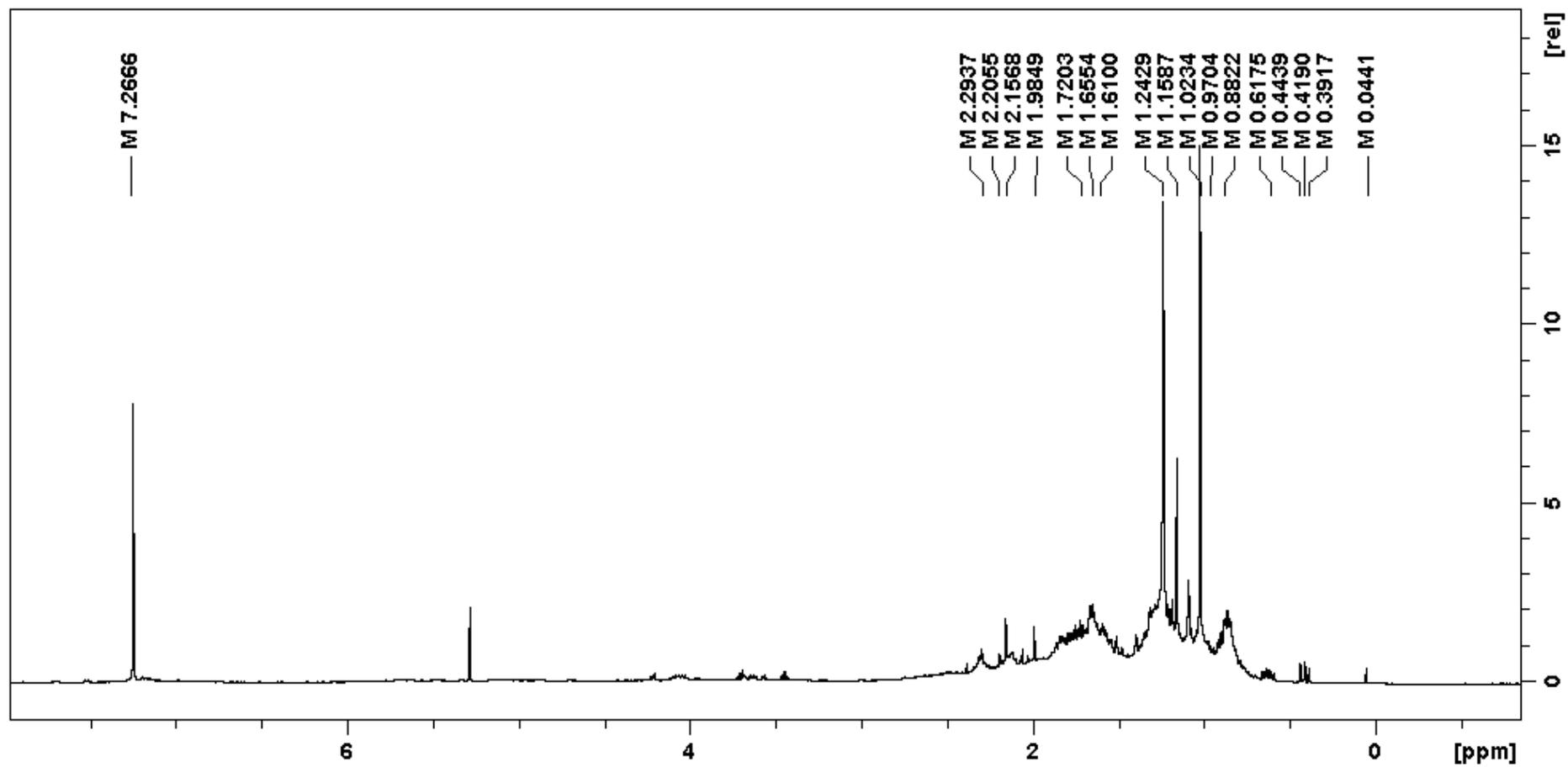


Apêndice G. Expansão da região entre 0,72 a 0,43 ppm do mapa de contorno de gHSQC do espatulenol

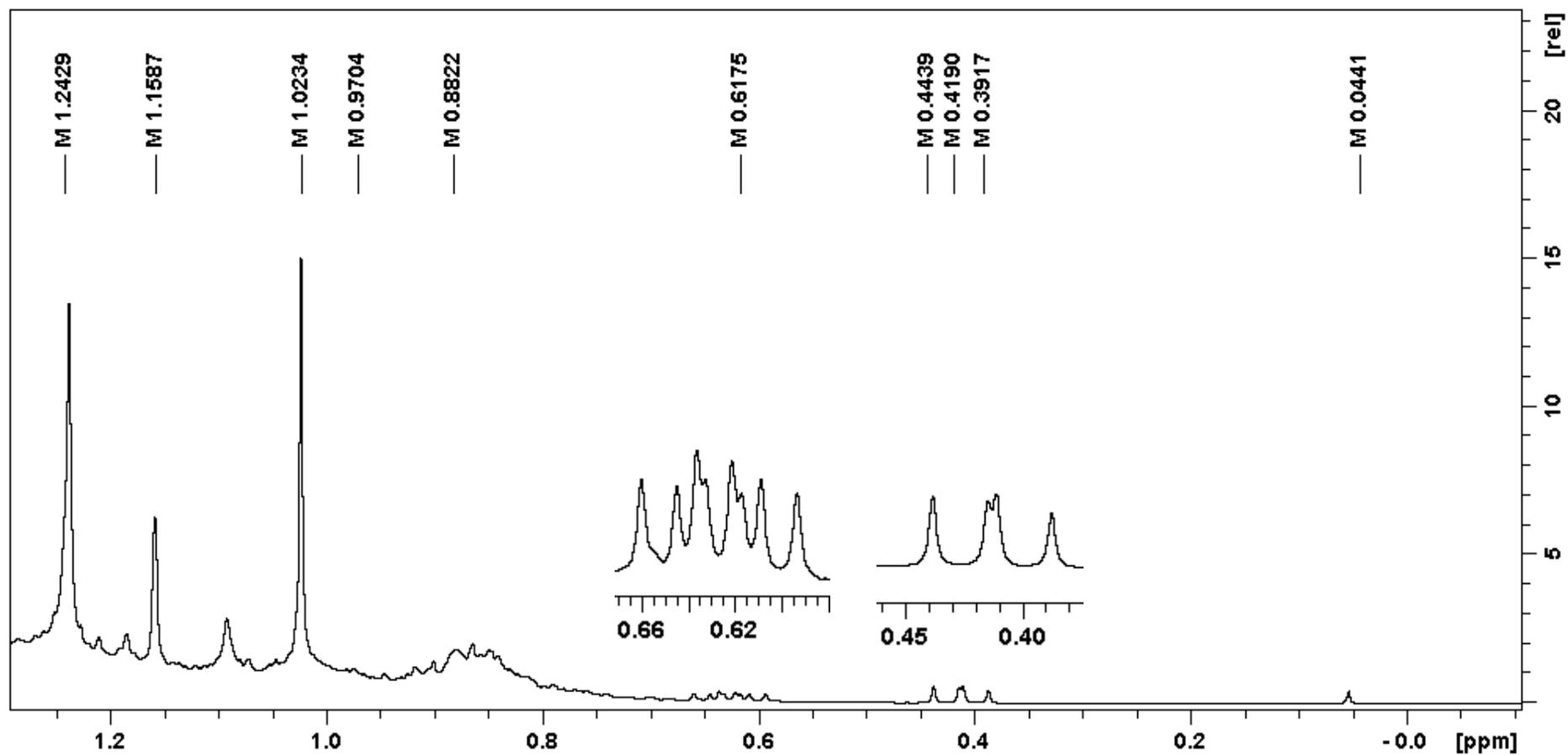


Apêndice H. Expansão da região entre 1,02 a 1,30 ppm do mapa de contorno de gHSQC do espatulenol

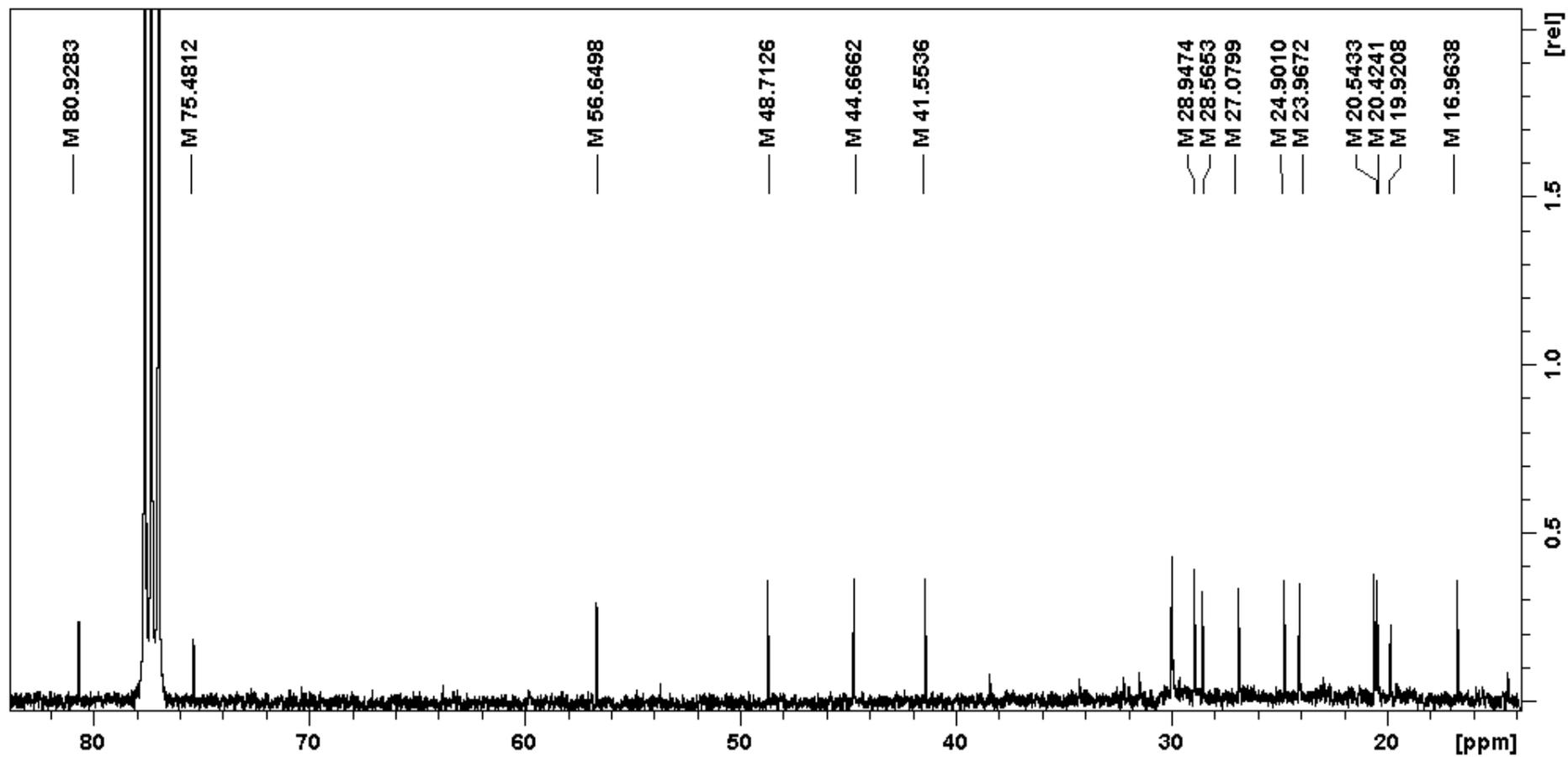
Apêndice I. Espectro de RMN de ^1H do $4\beta,10\alpha$ -aromadendranodiol (400 MHz; CDCl_3)



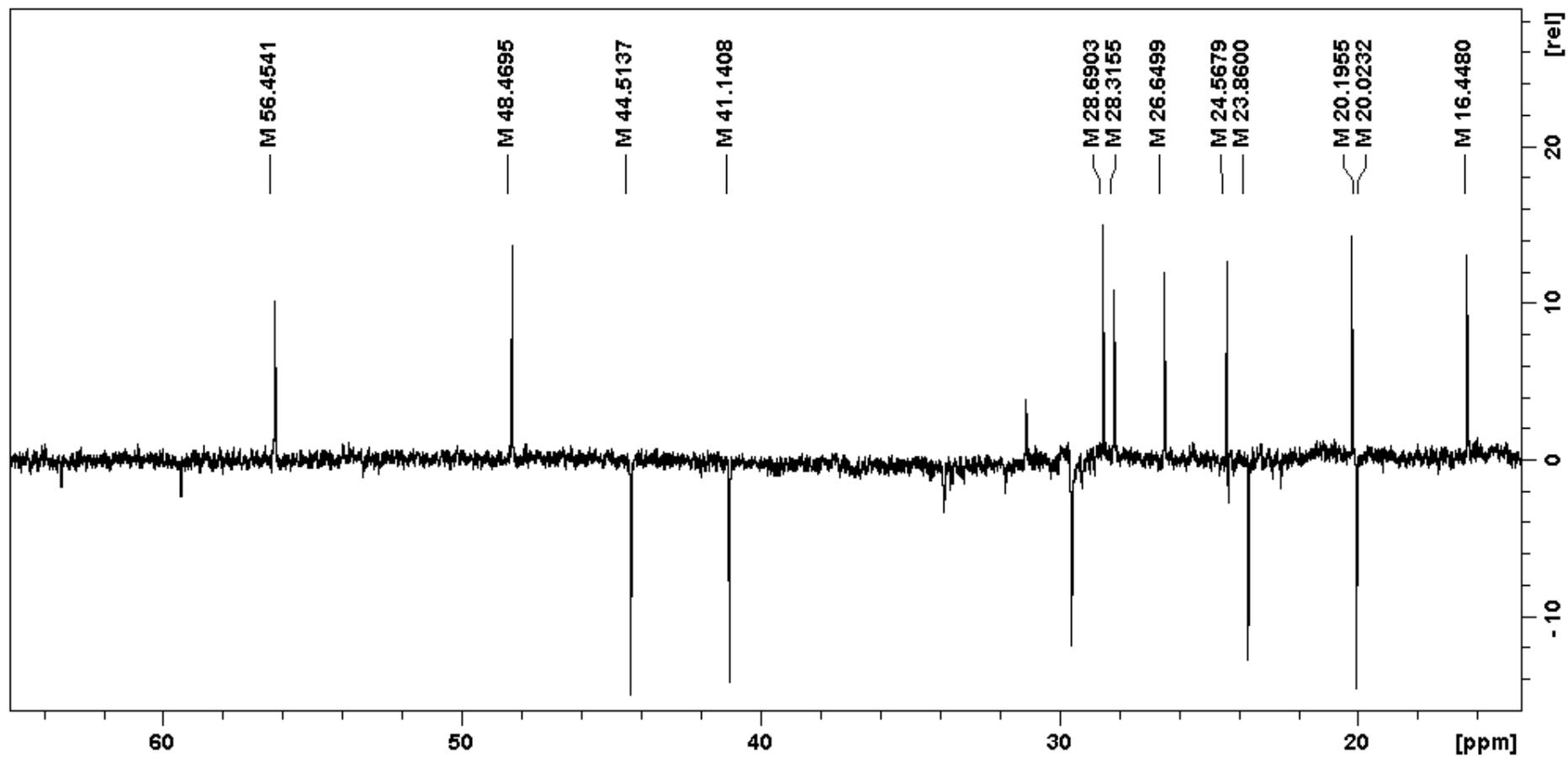
Apêndice J. Expansão da região entre 1,24 a 0,38 ppm do espectro de RMN de ¹H do 4β,10α-aromadendranodiol (400 MHz; CDCl₃)



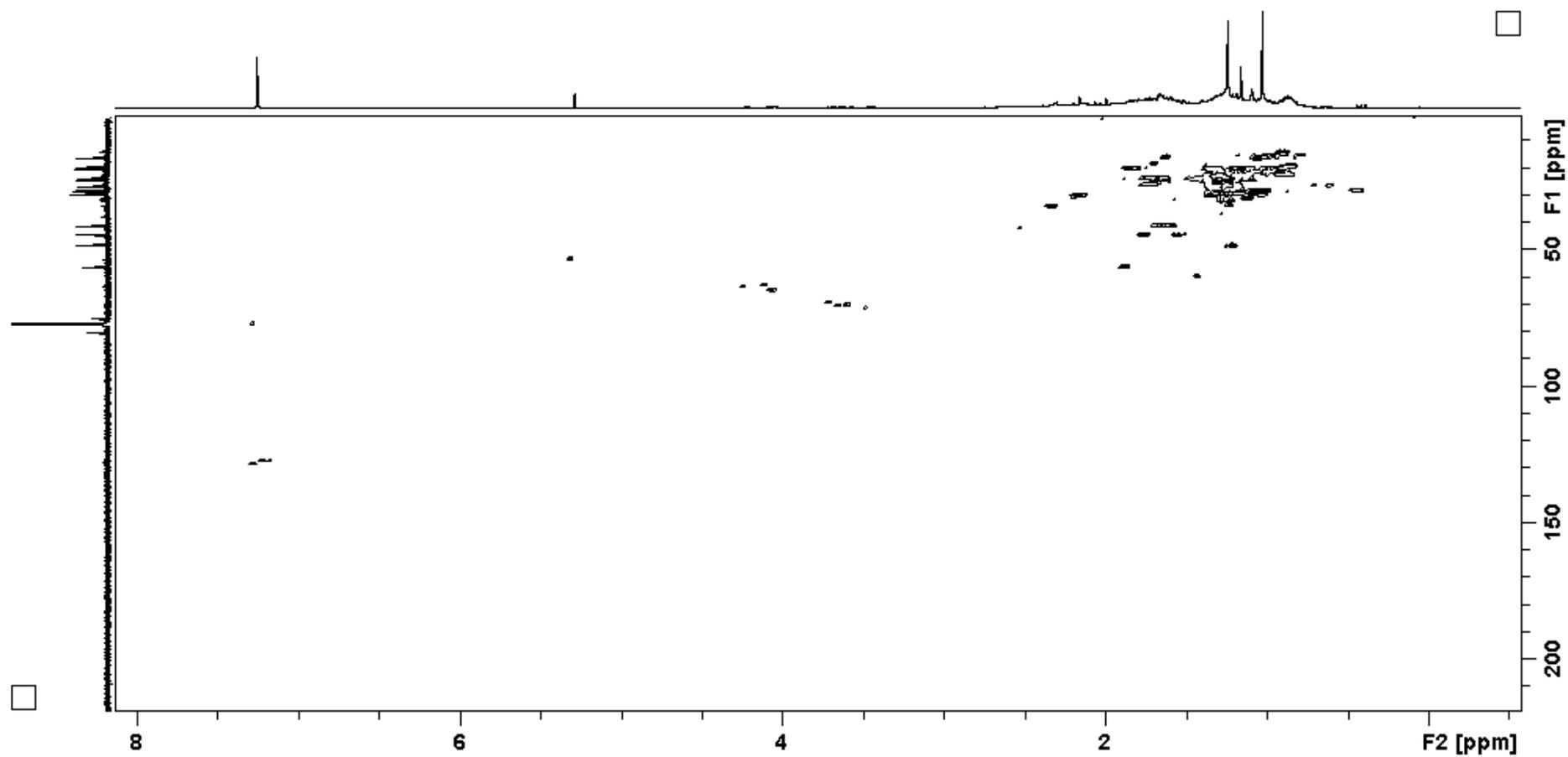
Apêndice K. Espectro de RMN ^{13}C do 4 β ,10 α -aromadendranodiol (100 MHz, CDCl_3)



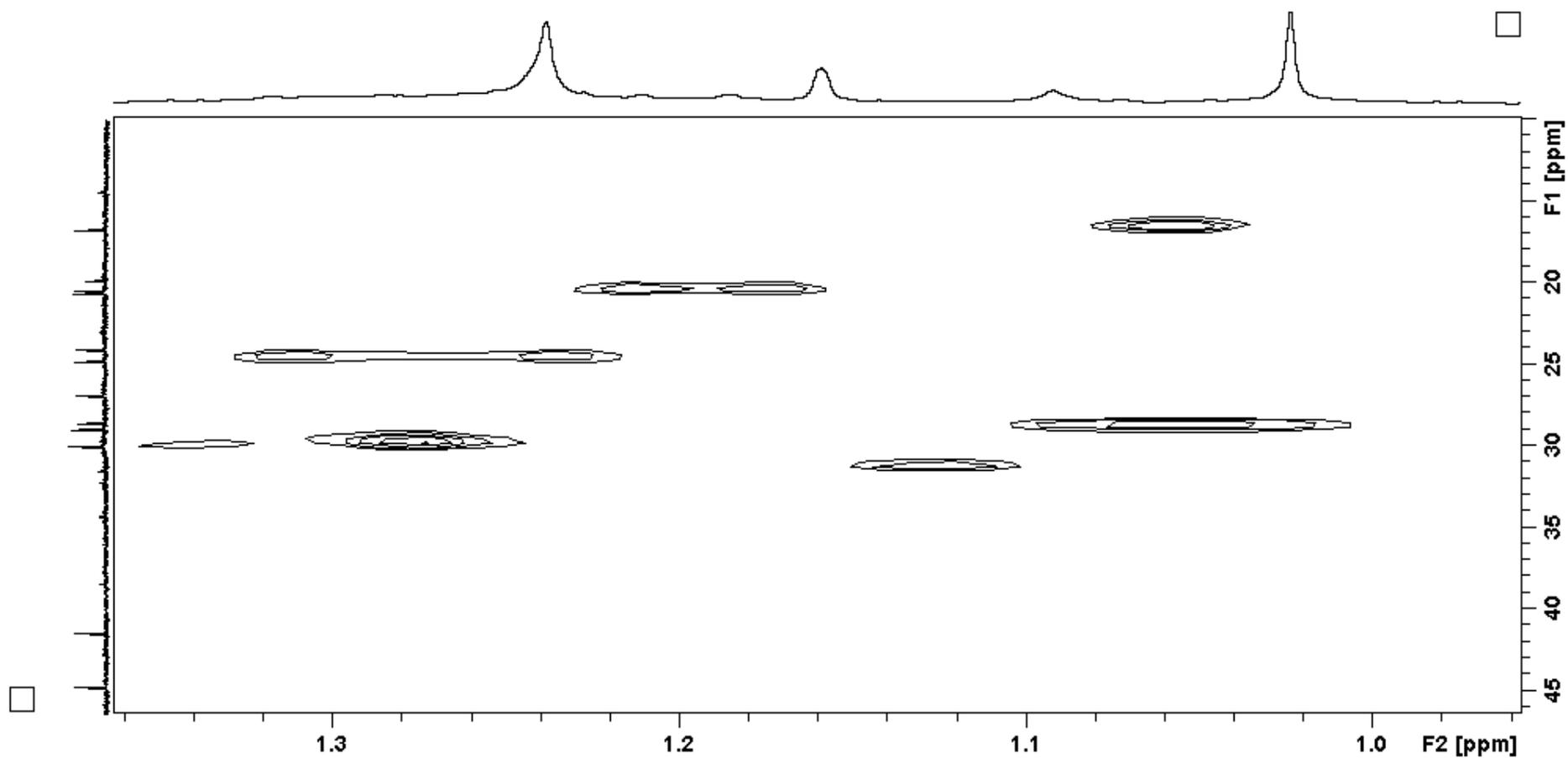
Apêndice L. Espectro de RMN DEPT-135 do 4 β ,10 α -aromadendranodiol (100 MHz, CDCl₃)



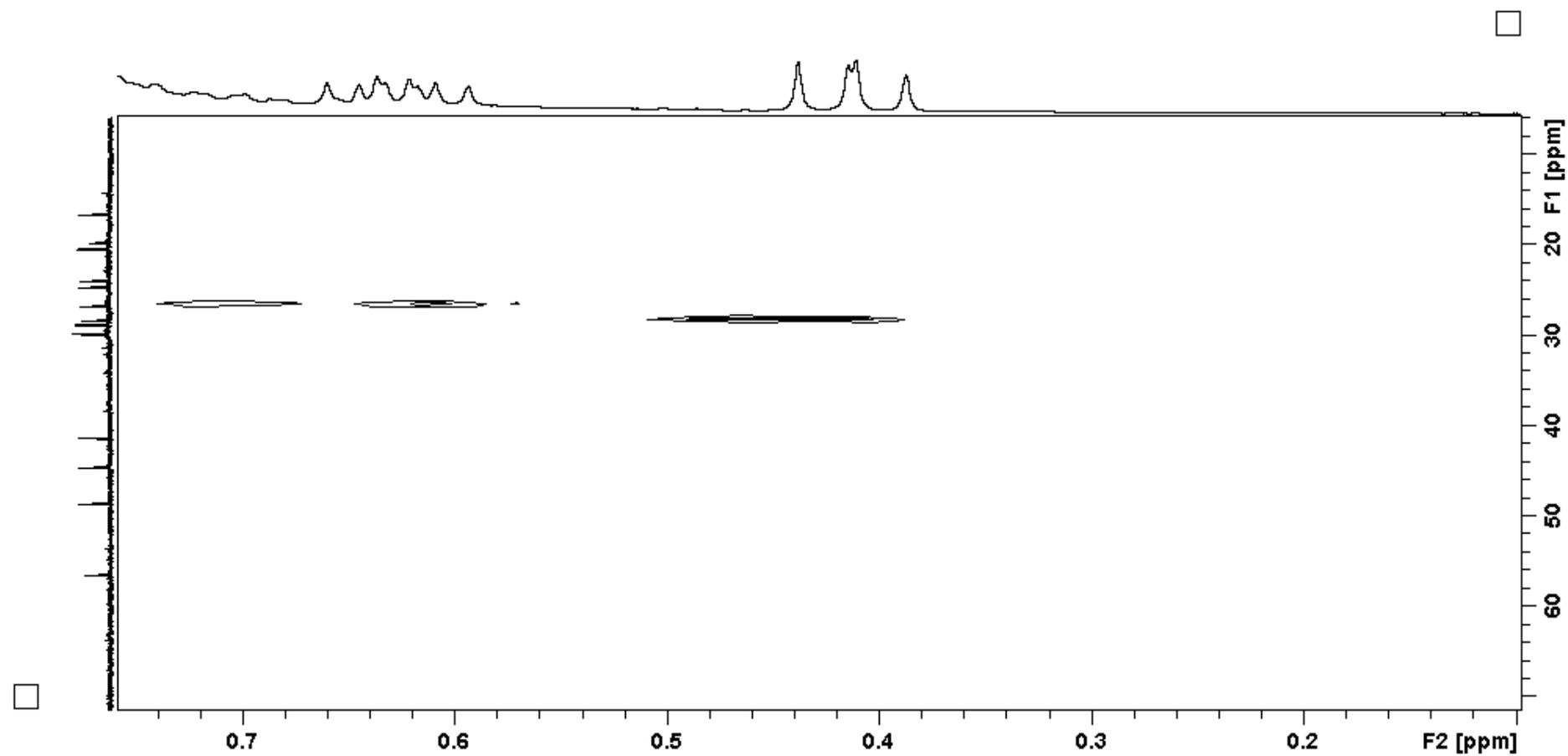
Apêndice M. Mapa de contorno de gHSQC do 4β,10α-aromadendranodiol

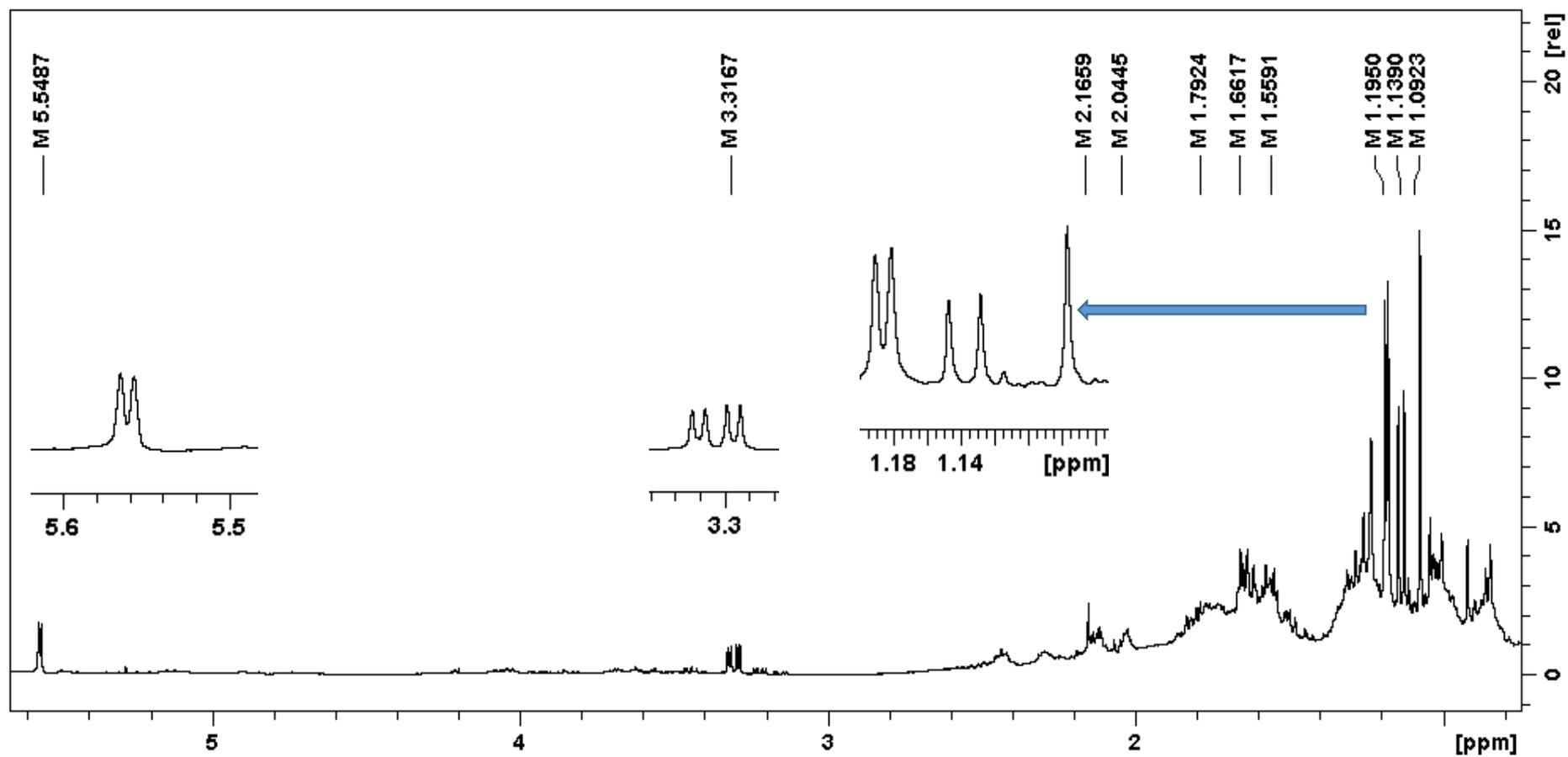


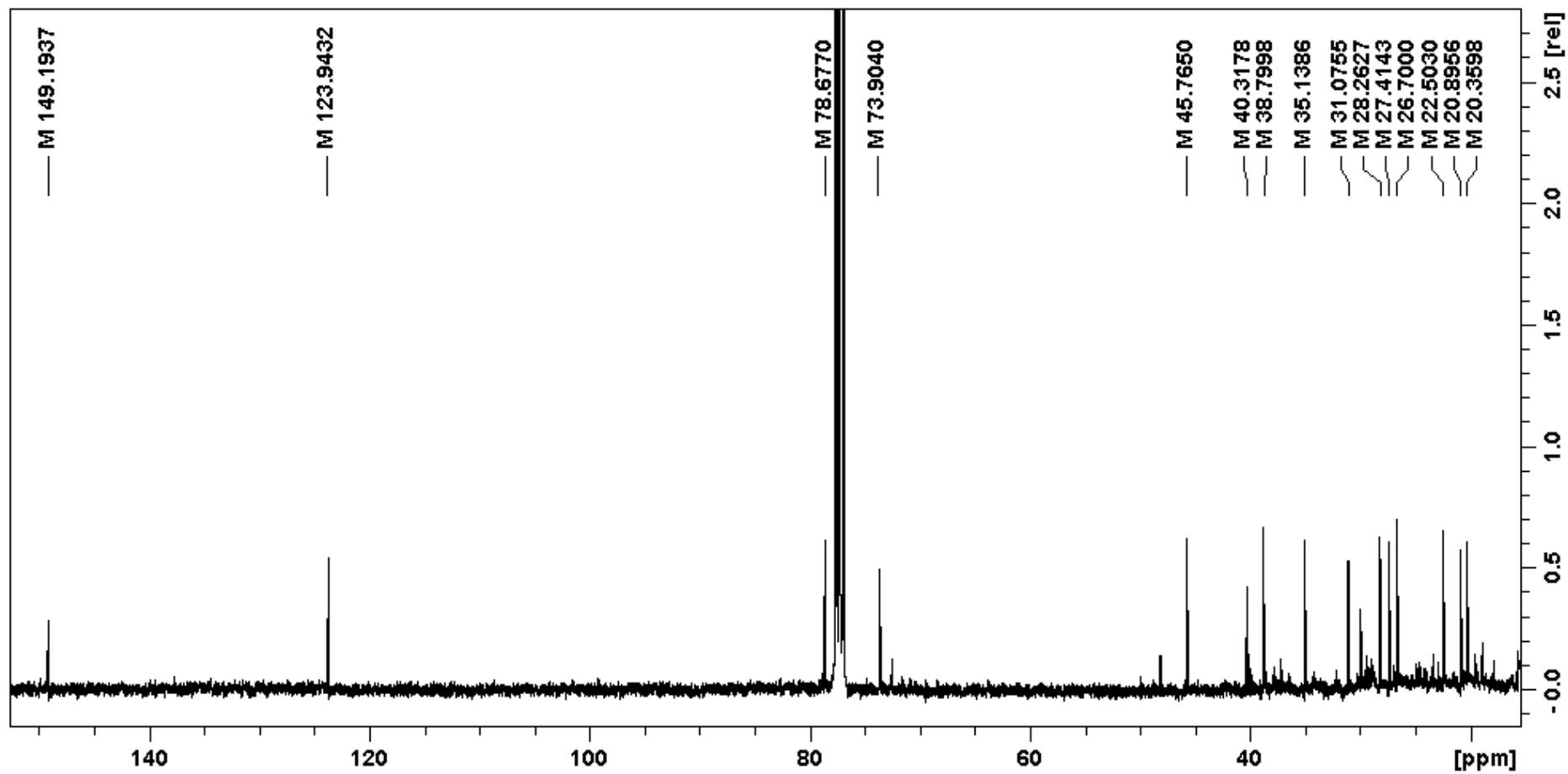
Apêndice N. Expansão da região entre 1,24 a 1,02 ppm do mapa de contorno de gHSQC do 4 β ,10 α -aromadendranodiol



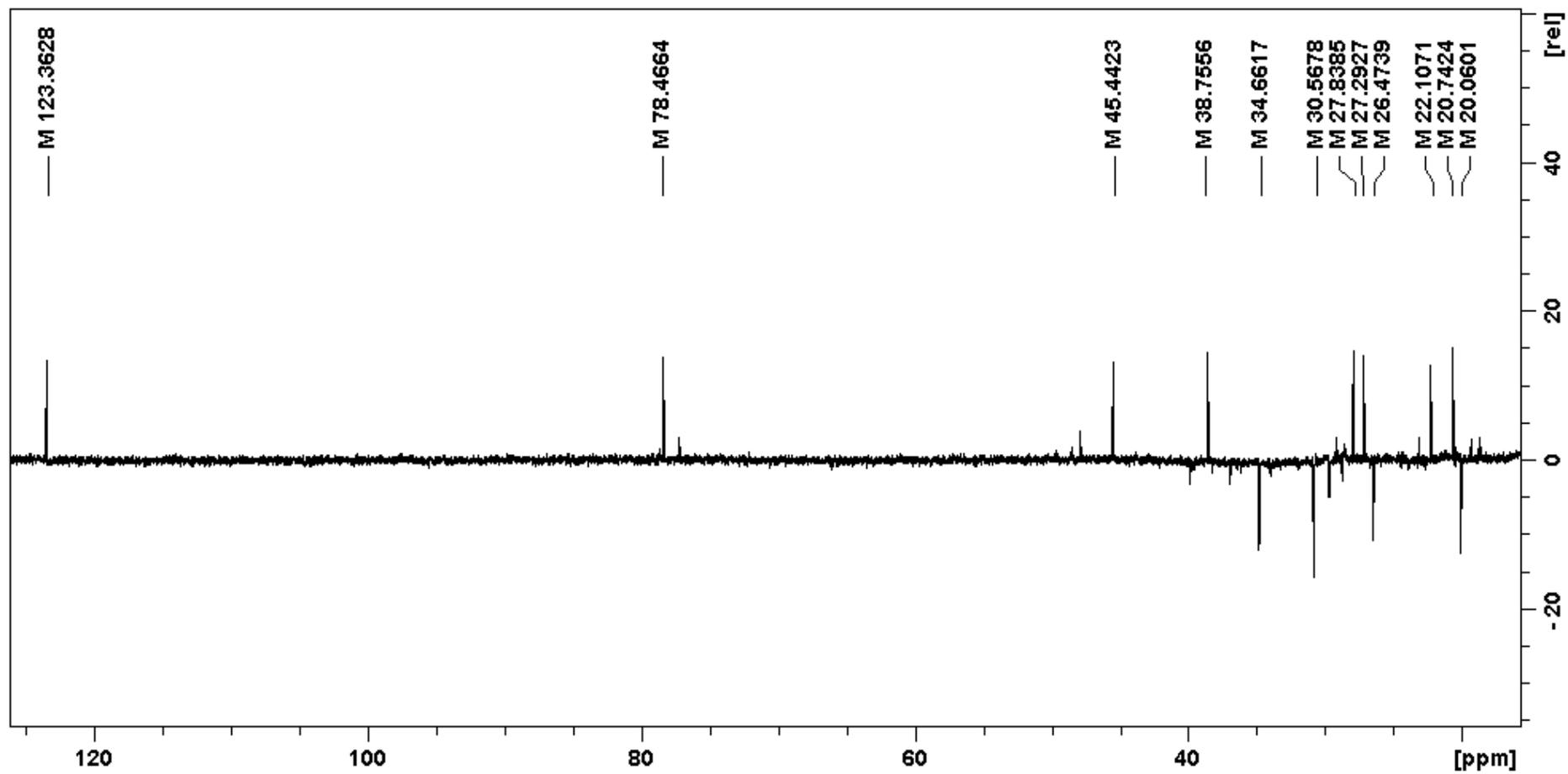
Apêndice O. Expansão da região entre 0,66 a 0,38 ppm do mapa de contorno de gHSQC do 4 β ,10 α -aromadendranodiol



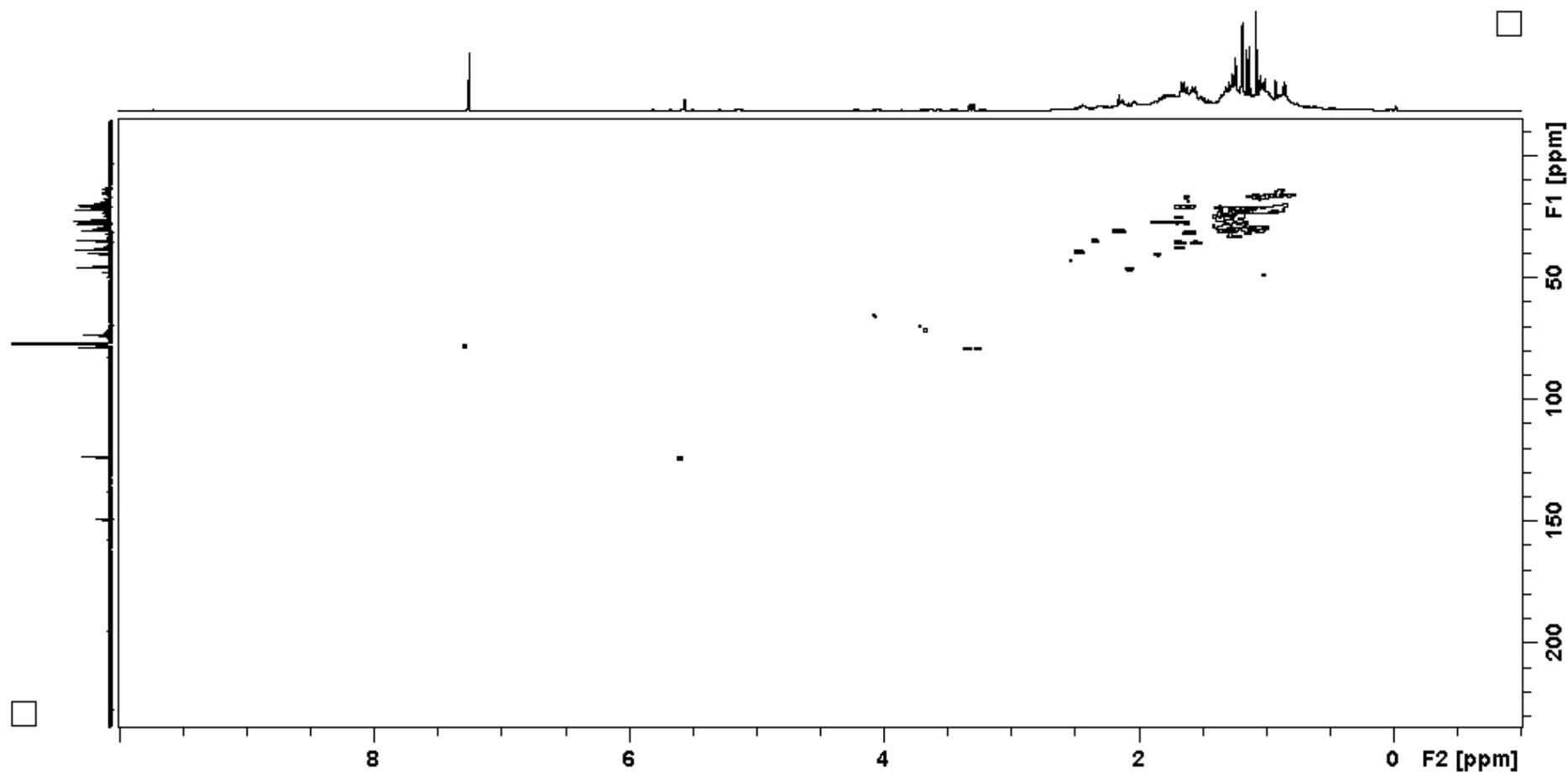
Apêndice P. Espectro de RMN de ^1H do $1\beta,11$ -dihidróxi-5-eudesmeno (400 MHz; CDCl_3)Apêndice Q. Espectro de RMN ^{13}C do $1\beta,11$ -dihidróxi-5-eudesmeno (100 MHz, CDCl_3)



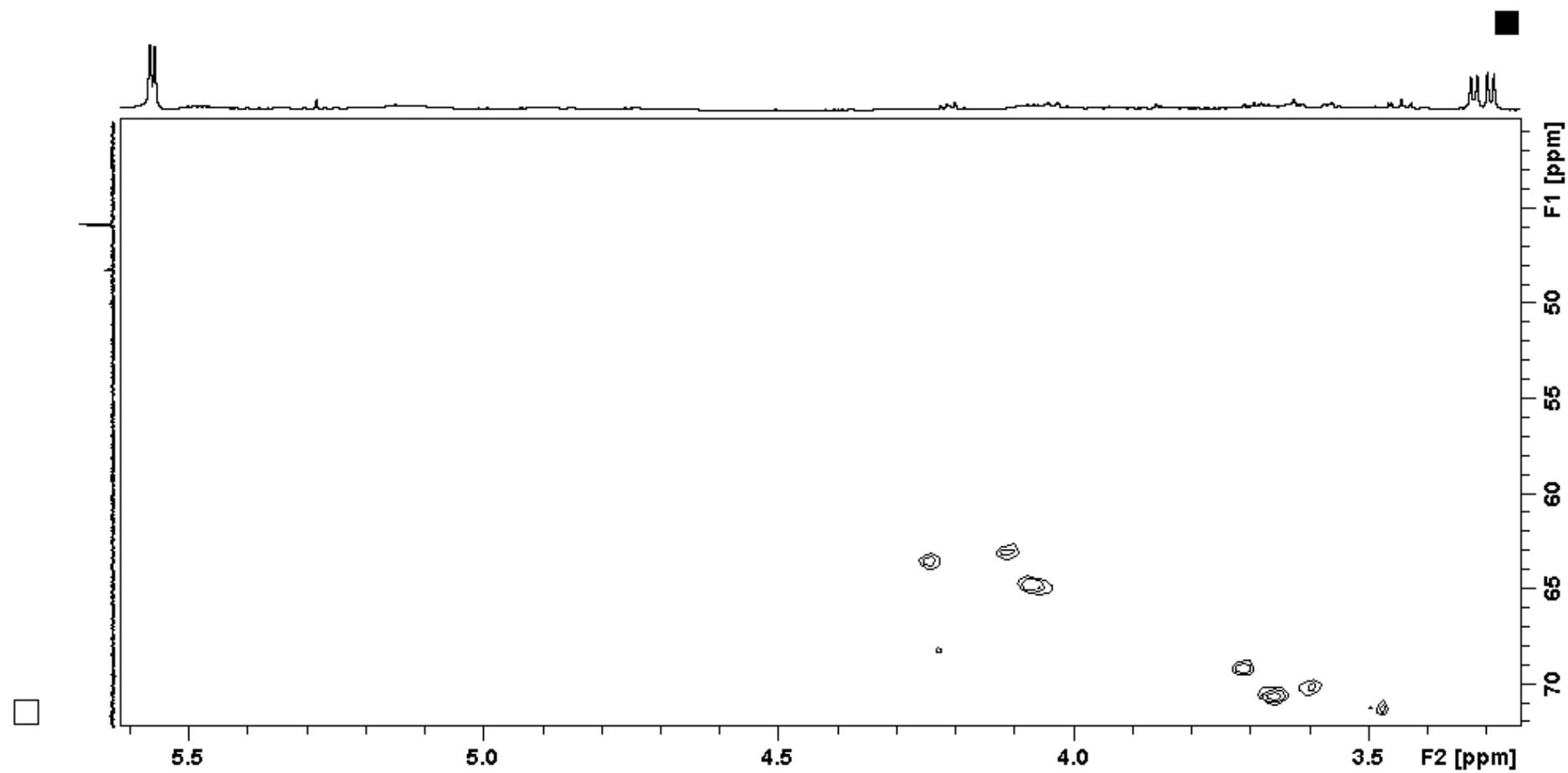
Apêndice R. Espectro de RMN DEPT-135 do 1 β ,11-dihidróxi-5-eudesmeno (100 MHz, CDCl₃)



Apêndice S. Mapa de contorno de gHSQC do 1β,11-dihidroxi-5-eudesmeno



Apêndice T. Expansão da região entre 5,60 a 3,30 ppm do mapa de contorno de gHSQC do $1\beta,11$ -dihidróxi-5-eudesmeno



Apêndice U. Expansão da região entre 1,20 a 1,05 ppm do mapa de contorno de gHSQC do 1 β ,11-dihidróxi-5-eudesmeno

