

Artigo

**Óleo Essencial das Flores de *Eugenia klotzschiana* (Myrtaceae):
Composição Química e Atividades Tripanocida e Citotóxica *In Vitro*****Carneiro, N. S.; Alves, J. M.; Alves, C. C. F.; Esperandim, V. R.; Miranda,
M. L. D.****Rev. Virtual Quim.*, 2017, 9 (3), no prelo. Data de publicação na Web: 12 de junho de 2017<http://rvq.sbq.org.br>**Essential Oil of Flowers from *Eugenia klotzschiana* (Myrtaceae): Chemical
Composition and *In Vitro* Trypanocidal and Cytotoxic Activities**

Abstract: Chagas disease, which is caused by *Trypanosoma cruzi*, has been commonly treated by nifurtimox and benznidazole, two drugs that cause several side effects. As a result, the use of natural products for treating neglected diseases has increased in recent years and plants have become a promising alternative to developing new medicines. Therefore, this study aimed to determine the chemical composition of the essential oil from fresh flowers of *Eugenia klotzschiana* and to evaluate for the first time its trypanocidal and cytotoxic potential *in vitro*. The essential oil from the fresh flowers was obtained by hydrodistillation carried out by a Clevenger apparatus and its chemical composition was determined by GC-MS. The main compounds found in the essential oil were sesquiterpenoids: β -caryophyllene (21.1%), bicyclogermacrene (10.2%) and spathulenol (20.9%). Results showed that the essential oil had strong trypanocidal activity against the trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi* ($IC_{50} = 20.2 \mu\text{g/mL}$) and moderate cytotoxicity against fibroblasts in the concentration range ($CC_{50} = 220.3 \mu\text{g/mL}$). In short, the essential oil from fresh flowers of *Eugenia klotzschiana* can be considered a new source of bioactive compounds for the development of antiparasitic drugs.


Keywords: *Eugenia klotzschiana*; Myrtaceae; essential oil; flowers; *Trypanosoma cruzi*; cytotoxic analysis.

Resumo

A Doença de Chagas é causada pelo *Trypanosoma cruzi* e os medicamentos mais utilizados em seu tratamento são o nifurtimox e benznidazol, que causam vários efeitos colaterais. O uso de produtos naturais no tratamento de doenças negligenciadas aumentou nos últimos anos e as plantas tornaram-se uma alternativa promissora para o desenvolvimento de novos medicamentos. Portanto, este estudo teve como objetivo determinar a composição química do óleo essencial das flores frescas de *Eugenia klotzschiana* e avaliar pela primeira vez seus potenciais tripanocida e citotóxico *in vitro*. O óleo essencial das flores frescas foi obtido por hidrodestilação em aparelho tipo Clevenger e sua composição química foi determinada por CG-EM. Os principais compostos encontrados no óleo essencial das flores foram sesquiterpenoides: β -cariofileno (21,1%), biciclogermacreno (10,2%) e espatulenol (20,9%). Os resultados mostraram que o óleo essencial apresentou promissora atividade tripanocida contra formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* ($CI_{50} = 20,2 \mu\text{g/mL}$) e moderada citotoxicidade sobre fibroblastos na faixa de concentração analisada ($CC_{50} = 220,3 \mu\text{g/mL}$). Em suma, o óleo essencial das flores frescas de *Eugenia klotzschiana* pode ser considerado uma nova fonte de compostos bioativos para o desenvolvimento de medicamentos antiparasitários.

Palavras-chave: *Eugenia klotzschiana*; Myrtaceae; óleo essencial; flores; *Trypanosoma cruzi*; análise citotóxica.

* Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais, *Campus* Pouso Alegre, CEP 37550-000, Pouso Alegre, MG, Brasil.

 mayker.miranda@ifsuldeminas.edu.br

DOI:

Óleo Essencial das Flores de *Eugenia klotzschiana* (Myrtaceae): Composição Química e Atividades Tripanocida e Citotóxica *In Vitro*

Nárgella S. Carneiro,^a José Milton Alves,^a Cassia Cristina F. Alves,^a Viviane R. Esperandim,^b Mayker Lazaro D. Miranda^{c,*}

^a Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, *Campus* Rio Verde, CEP 75901-970, Rio Verde-GO, Brasil.

^b Universidade de Franca, Centro de Pesquisa em Ciências Exatas e Tecnologia, CEP 14404-600, Franca-SP, Brasil.

^c Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais, *Campus* Pouso Alegre, CEP 37550-000, Pouso Alegre-MG, Brasil.

* mayker.miranda@ifsuldeminas.edu.br

Recebido em 4 de maio de 2017. Aceito para publicação em 7 de junho de 2017

1. Introdução

2. Parte Experimental

2.1. Material vegetal

2.2. Extração do óleo essencial

2.3. Análise do óleo essencial por CG-EM

2.4. Atividades tripanocida e citotóxica *in vitro*

3. Resultados e Discussão

4. Conclusão

1. Introdução

As doenças tropicais negligenciadas são um grupo de 17 doenças consideradas infecções crônicas comuns em pessoas mais carentes, oriundas de países menos desenvolvidos. A organização mundial da saúde reconhece a urgência do desenvolvimento de novas ferramentas e tecnologias para o combate dessas doenças que são consideradas os maiores problemas

de saúde do mundo.¹

A Doença de Chagas ou Tripanossomíase Americana é causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*, que é transmitido ao hospedeiro humano, principalmente por triatomíneos infectados.² Esta doença atinge cerca de 7-8 milhões de latinos americanos e o modo principal de transmissão para as pessoas é através de fezes dos vetores infectados.² Existem outros meios de contaminação como transfusão de sangue contaminado, transmissão congênita,

transplante de órgãos² e inclusive pela ingestão de frutos infectados, como por exemplo o açaí.³

No tratamento da Doença de Chagas são amplamente empregados dois fármacos nitro-heterocíclicos: nifurtimox e o benzonidazol.² Estes fármacos apresentam vários efeitos colaterais, como: anorexia, náuseas, alterações gastrointestinais, dermatopatia alérgica, polineurite, depressão da medula óssea, neuropatia periférica entre outros.⁴

Devido a estas complicações causadas pelos fármacos disponíveis, torna-se cada vez mais relevante a busca por novos agentes quimioterápicos que sejam eficazes e apresentem baixa toxicidade. Neste sentido, a ampla biodiversidade de compostos bioativos presentes em óleos essenciais extraídos de plantas têm despertado cada vez mais o interesse dos pesquisadores do mundo inteiro.⁵ Estes óleos essenciais podem ser obtidos de diferentes espécies de plantas e possuem várias atividades biológicas, tais como: antibacteriana, anticancerígena, anti-inflamatória, antimutagênica, antifúngica, antioxidante e antiprotzoária.⁶

A espécie *Eugenia klotzschiana* é conhecida popularmente como Pêra-do-Cerrado e possui distribuição geográfica restrita sendo atualmente bastante empregada para prática vegetativa de controle da erosão dos solos.⁷ *Eugenia klotzschiana*, uma espécie típica do Cerrado, é encontrada em regiões tropicais e se adapta bem a solos drenados e permeáveis, como os de Goiás, Distrito Federal, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais e sudoeste da Bahia.⁸ Estudos recentes

demonstraram que além das folhas de *E. klotzschiana* possuem significativo potencial antioxidante esta espécie também pode ser encontrada na Bolívia.^{8,9}

No Brasil a família Myrtaceae apresenta 23 gêneros e aproximadamente 1000 espécies.¹⁰ As plantas pertencentes a esta família são consideradas fontes ricas em óleos essenciais responsáveis por importantes benefícios tanto econômicos quanto aqueles relacionados à saúde.¹⁰ O gênero *Eugenia* possui cerca de 400 espécies no Brasil e muitas destas espécies têm se destacado devido a produção destes óleos essenciais que exibem diversas propriedades farmacológicas.¹¹

Os óleos essenciais obtidos de espécies de *Eugenia* têm sido alvos de diversos trabalhos e dentre as espécies estudadas pode-se destacar *E. uniflora*,¹² *E. puniceifolia*,¹³ *E. caryophyllata*,¹⁴ *E. brasiliensis*¹⁵ e *E. racemulosa*.¹⁶ Especificamente, as espécies *E. brasiliensis* e *E. uniflora* já tiveram seus potenciais antiparasitários investigados anteriormente frente ao *T. cruzi*.¹⁷⁻¹⁸ Em adição, as atividades anti-*Trypanosoma cruzi* e citotóxica do óleo essencial das flores frescas de *E. klotzschiana* estão sendo descritas pela primeira vez neste trabalho.

Dando continuidade à nossa linha de pesquisa que visa conhecer a composição química e as atividades biológicas de óleos essenciais,¹⁹ o presente trabalho aborda a composição química do óleo essencial das flores frescas de *Eugenia klotzschiana* (Figura 1) e suas atividades *in vitro* contra as formas tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi* e citotóxica frente a fibroblastos da linhagem LLCMK₂.



Figura 1. Flor de *Eugenia klotzschiana* (Myrtaceae)

2. Parte Experimental

2.1. Material vegetal

As flores frescas da pêra-do-cerrado (*Eugenia klotzschiana*) foram coletadas em dezembro de 2014 as 18h:00min em uma propriedade rural com áreas de vegetação nativa típica do Cerrado, no município de Portelândia localizado no estado de Goiás (latitude sul 17° 23' e longitude oeste 52° 38'). A amostra coletada foi depositada no Herbário Germano Guarim Neto da Universidade Federal de Goiás, sob o registro HJ 7414.

2.2. Extração do óleo essencial

As flores frescas (100 g) foram submetidas em triplicata à extração do óleo essencial pelo método de hidrodestilação em aparelho do tipo Clevenger, por um período de 2 horas. Em seguida, o hidrolato foi submetido à extração com três porções de 10 mL de diclorometano em funil de separação. Os óleos essenciais extraídos foram reunidos e secos com sulfato de sódio anidro, acondicionados em frascos de vidro âmbar e mantidos sob refrigeração até a realização

das análises.

2.3. Análise do óleo essencial por CG-EM

A identificação dos constituintes do óleo essencial das flores frescas foi realizada empregando-se cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), utilizando aparelho Agilent Technologies 7820A CG e MSD 5975. A análise foi realizada com coluna capilar de sílica fundida, modelo DB-5 (5% fenil-95% dimetilpolisiloxano, 30 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro interno x 0,25 µm de espessura de filme) da Shimadzu®, sendo utilizado como gás de arraste hélio (He) em fluxo de 1,0 mL/min. A injeção em modo split 1:20 foi realizada com injetor a 240°C. A temperatura da fonte foi de 270°C e a programação de temperatura do forno foi temperatura inicial 60°C até 180°C com taxa de aquecimento a 3 °C/min. Para a detecção foi aplicada a ionização por elétrons a 70 eV. A determinação da composição química do óleo essencial foi realizada pela análise dos espectros de massas, obtidos por CG-EM. Os constituintes voláteis foram identificados por comparação de seus espectros de massas

com um banco de dados (biblioteca NIST 11) e pela comparação de seus índices de retenção (IR) com os relatados na literatura.²⁰ Os índices de retenção foram determinados em relação a retenção de uma série de *n*-alcanos (C₁₀-C₂₉), analisada nas mesmas condições cromatográficas das amostras.

2.4. Atividades tripanocida e citotóxica *in vitro*

Para obtenção das formas tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi*, as células LLCMK₂ foram cultivadas em meio RPMI suplementado com 2 x 10⁻⁶ mol/L de L-glutamina, 10⁻⁵ mol/L de NaHCO₃, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 10 % de soro fetal bovino inativado. O procedimento foi realizado em frascos de cultura a 37 °C, sob 5 % de CO₂ ambiente e humidade relativa de 95 %. As formas tripomastigotas foram mantidas em meio RPMI e os parasitas foram transferidos para meio fresco a cada 48 h para obter as formas livres dos parasitas. O ensaio realizado após 24 h baseou-se na metodologia relatada por Esperandim et al. (2013).²¹ Aproximadamente 1 x 10⁶ tripomastigotas foram adicionadas a cada poço numa placa de microtitulação de 96 poços. Em seguida, o óleo essencial foi adicionado em concentrações que variam de 12,5 a 200 µg/mL. Após 24 h de incubação, a atividade biológica das amostras foi avaliada pelo ensaio colorimétrico de sal de tetrazólio de MTT (MTT = brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) (5 mg/mL). As leituras foram conduzidas por um leitor de microplacas a 517 nm de comprimento de onda. Os controlos positivos e negativos foram benzonidazol (de 12,5 a 200 µg/mL) e 0,5 % de dimetilsulfóxido (DMSO), respectivamente. Os ensaios foram realizados em triplicata.

As células de fibroblastos LLCMK₂ foram propagadas em meio RPMI 1640 suplementado com 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 5 % de soro de vitelo fetal inativado. Mantidas a 37 °C em 5 % de CO₂. Uma suspensão de células foi semeada a uma concentração de 1 x 10⁶ células/mL numa microplaca de 96 poços com meio RPMI 1640. Em seguida, as células foram tratadas com óleo essencial a diferentes concentrações (6,25, 12,5, 25, 50, 100, 200 e 400 µg/mL). As placas foram incubadas a 37 °C durante 24 h e a atividade biológica foi avaliada pelo método colorimétrico MTT [MTT; Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] num leitor de microplacas a 540 nm. O meio RPMI 1640 foi o controle positivo enquanto que o meio DMSO e RPMI 1640 foi o negativo. Todas as experiências foram realizadas em triplicata. A percentagem de viabilidade celular foi determinada pela seguinte fórmula: % de viabilidade celular = 1 - [(Y-N) / (N-P)] x 100, em que Y = absorvância de poços contendo células e óleo essencial em diferentes concentrações; N = controle negativo; e P = controle positivo.²¹

3. Resultados e Discussão

O óleo essencial foi obtido por hidrodestilação das flores frescas de *E. klotzschiana* e apresentou coloração amarelo claro, odor acentuado e rendimento de 0,09%. Foram identificados 33 compostos com concentrações acima de 0,1% correspondendo a 85,8% da composição total do óleo estudado (Tabela 1, Figura 2). Em relação à composição química, identificou-se por CG-EM 2,9% de monoterpenos hidrocarbonetos, 3,0% de monoterpenos oxigenados, 41,9% de sesquiterpenos hidrocarbonetos, 36,3% de sesquiterpenos oxigenados e 1,7% de outros (Tabela 1).

Tabela 1. Composição química do óleo essencial das flores frescas de *E. klotzschiana*

Compostos	IR ^a	IR ^b	Área %
α-Pineno	954	953	2,5
Mirceno	990	977	1,2
Limoneno	1033	1031	0,4
Citronellol	1226	1223	1,4
Geraniol	1252	1249	1,6
Eugenol	1362	1362	1,7
β-Elemeno	1392	1396	1,3
α-Cedreno	1410	1408	0,6
β-Copaeno	1416	1415	0,7
β-Cedreno	1419	1418	0,4
α-(E)-Bergamoteno	1432	1438	1,8
α-Guaieno	1439	1438	0,4
β-Cariofileno	1454	1450	21,1
α-Humuleno	1456	1458	0,3
Alloaromadendreno	1462	1463	0,4
α-Muuroleno	1480	1482	0,6
Germacreno-D	1484	1486	0,8
β-Selineno	1489	1490	0,4
Epizonareno	1497	1495	0,4
γ-Muuroleno	1500	1497	0,6
Biciclogermacreno	1502	1501	10,2
β-Bisaboleno	1505	1504	0,4
β-Sesquifelandreno	1525	1521	0,3
Epiglobulol	1530	1532	4,6
Elemol	1560	1560	0,2
<i>trans</i> -nerolidol	1569	1570	0,3
Espatuleno	1575	1577	20,9
Globulol	1592	1590	1,4
α-Cadinol	1653	1652	2,8
2,3-Diidrofarnesol	1681	1680	0,6
Selin-7(11)-en-4-ol	1691	1690	0,5
α-Farnesol	1714	1714	3,4
Óxido de ledeno	1890	1890	1,6
Monoterpenos hidrocarbonetos			2,9
Monoterpenos oxigenados			3,0
Sesquiterpenos hidrocarbonetos			41,9
Sesquiterpenos oxigenados			36,3
Outros			1,7
Total			85,8

IR^a: Índices de retenção linear da literatura (Adams, 2007).²⁰ IR^b: Índices de retenção calculados a partir dos tempos de retenção em relação a série de *n*-alcanos (C₁₀-C₂₉) em uma coluna capilar DB-5 de 30 m.

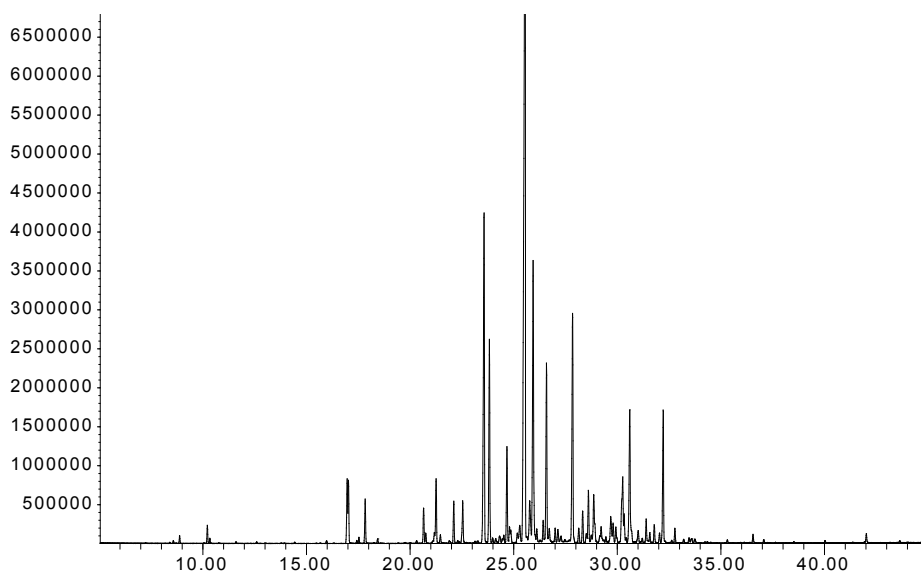


Figura 2. Cromatograma (CG-EM) do óleo essencial das flores frescas de *E. klotzschiana*.

É descrito na literatura que o odor apresentado pelos óleos essenciais é devido aos diversos constituintes voláteis que influenciam diretamente no aroma, os majoritários e inclusive aqueles constituintes químicos que não estejam em altas concentrações ou com alto rendimento.²²

A análise da composição química do óleo essencial das flores frescas de *E. klotzschiana* coletadas na região sudoeste do estado de Goiás exibiu três constituintes majoritários identificados como sendo os sesquiterpenos: β -cariofileno (21,1 %, **1**), biciclogermacreno (10,2 %, **2**) e espatulenol (20,9 %, **3**) (Figura 3).

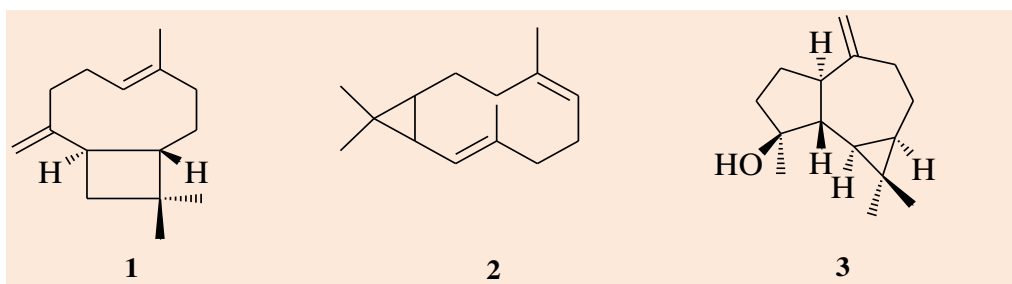


Figura 3. Estruturas dos constituintes majoritários do óleo essencial das flores frescas de *E. klotzschiana*: β -cariofileno (**1**), biciclogermacreno (**2**) e espatulenol (**3**)

É importante ressaltar que estes três constituintes químicos predominantes no óleo essencial das flores frescas de *E. klotzschiana* também já foram identificados anteriormente como constituintes majoritários, porém em concentrações diferentes, no óleo essencial das folhas de *Eugenia calycina* uma espécie pertencente ao mesmo gênero da planta estudada.²³ O estudo dos óleos essenciais das folhas e caule

de *E. sulcata* exibiu composição química semelhante a observada para *E. klotzschiana* tendo como componentes majoritários o β -cariofileno e espatulenol.²⁴ O óleo essencial das folhas de *E. puniceifolia* ocorrente no estado de Pernambuco também demonstrou composição química similar a de *E. klotzschiana* apresentando como um de seus constituintes majoritários o β -cariofileno.¹³

As variações nas concentrações dos constituintes químicos de óleos essenciais podem ser justificadas levando-se em consideração vários fatores como sazonalidade, ritmo circadiano, estágio de desenvolvimento e idade, temperatura, horário de coleta, disponibilidade de água, radiação UV, os nutrientes do solo, altitude, composição atmosférica e dano tecidual, já que todos atuam no metabolismo secundário, influenciando na quantidade total de metabólitos produzidos e também em suas proporções relativas.¹⁹

Em relação às atividades biológicas investigadas, o óleo essencial das flores frescas de *E. klotzschiana* demonstrou ser ativo frente às formas tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi*. Observou-se o aumento da inviabilidade das células tripomastigotas com aumento da concentração de óleo essencial. Desta forma, o óleo essencial apresentou satisfatória atividade tripanocida com $CI_{50} = 20,2 \mu\text{g/mL}$ em comparação com controle positivo utilizado o benzonidazol com $CI_{50} = 9,8 \mu\text{g/mL}$ (Tabela 2).

Tabela 2. Atividade tripanocida *in vitro* do óleo essencial das flores frescas de *E. klotzschiana*

	% de lise \pm DP/concentração ($\mu\text{g/mL}$)							CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
	6,25	12,5	25	50	100	200	400	
EK-EO	20,8 \pm 4,9	34,2 \pm 2,4	56,8 \pm 2,2	72,3 \pm 1,4	92,2 \pm 0,7	95,7 \pm 0,7	96,4 \pm 0,7	20,2

EK-EO: óleo essencial de *E. klotzschiana*. Desvio padrão - DP

O estudo anterior realizado com os óleos essenciais de duas espécies de *Citrus* ocorrentes na região sudoeste de Goiás, descreve que amostras com $CI_{50} < 10 \mu\text{g/mL}$ tiveram atividade tripanocida considerada altamente ativa, ativa ($CI_{50} > 10 < 50 \mu\text{g/mL}$), moderadamente ativa ($CI_{50} > 50 < 100 \mu\text{g/mL}$) e inativa ($CI_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$) frente às formas tripomastigotas do *T. cruzi*.²⁵

A atividade antiparasitária apresentada pelo óleo essencial das flores frescas de *E. klotzschiana* pode ser atribuída ao sinergismo entre os constituintes presentes no óleo essencial analisado.²⁶ Em adição, dentre os constituintes presentes no óleo destaca-se a presença daqueles que já possuem reconhecida atividade tripanocida relatada na literatura como por exemplo os terpenos: α -pineno (2,5 %) identificado no óleo essencial dos frutos de *Schinus terebinthifolius*²⁷, o mirceno (1,2 %) ocorrente em plantas do gênero *Xylopi*²⁸, o eugenol (1,7 %) identificado anteriormente no óleo essencial do cravo da índia²⁹ e o β -

cariofileno (21,1 %) que exibiu efeito tripanocida significativo através do efeito sinérgico com diterpenos.³⁰

As várias atividades biológicas apresentadas pelos óleos essenciais inclusive contra os tripanossomatídeos³¹⁻³² se devem principalmente à sua composição terpênica e ao já mencionado sinergismo entre seus constituintes.³³ Os terpenos são responsáveis pelo caráter hidrofóbico dos óleos essenciais, permitindo sua difusão através da membrana celular do parasito afetando assim as vias metabólicas e organelas intracelulares.⁶

A citotoxicidade foi avaliada frente às células LLCMK₂ devido o meio celular ser o mesmo em que são cultivados os parasitas. Justifica-se a execução deste ensaio uma vez que se comprova a eficácia da amostra contra os parasitas sem que a mesma esteja lisando as células sadias ao mesmo tempo em que lisa os parasitas. As culturas de células de fibroblasto de mamífero LLCMK₂ foram tratadas com o óleo essencial nas concentrações de 6,25, 12,5, 25,0, 50,0, 100,

200 e 400 $\mu\text{g/mL}$ durante 24 h. Os resultados mostraram que o óleo essencial das flores frescas apresentou moderada toxicidade na concentração avaliada, apresentando $\text{CC}_{50} =$

220,3 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 3) em comparação com o controle positivo o benzonidazol ($\text{CC}_{50} = 147,3 \mu\text{g/mL}$) e com dados já reportados na literatura.³⁴

Tabela 3. Atividade citotóxica do óleo essencial das flores frescas de *E. klotzschiana*.

	% de células viáveis \pm DP/concentração ($\mu\text{g/mL}$)							CC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
	6,25	12,5	25	50	100	200	400	
EK-EO	100 \pm 0	100 \pm 0	100 \pm 0	100 \pm 0	95,3 \pm 0,8	50,3 \pm 0,9	23,3 \pm 1,9	220,3

EK-EO: óleo essencial de *E. klotzschiana*. Desvio padrão - DP

Avaliar a citotoxicidade de uma determinada amostra é relevante porque torna possível a elucidação do mecanismo biológico gerador do efeito citotóxico e o mecanismo de ação de diferentes compostos durante a sua interação com os tecidos.³⁵ É descrito na literatura que amostras que apresentaram valor de $\text{CC}_{50} < 10 \mu\text{g/mL}$ foram consideradas altamente tóxicas, tóxicas $\text{CC}_{50} > 10 < 100 \mu\text{g/mL}$, moderadamente tóxicas $\text{CC}_{50} > 100 < 1000 \mu\text{g/mL}$ e não tóxicas $\text{CC}_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$.³⁶

A moderada citotoxicidade exibida pelo óleo essencial das flores frescas de *E. klotzschiana* frente a fibroblastos da linhagem LLCMK₂ é um indicador de que este óleo essencial pode ser bem tolerado frente ao sistema biológico,³⁷ entretanto, ainda são necessários estudos adicionais que avaliem sua toxicidade *in vivo*.

4. Conclusão

Os resultados do presente trabalho demonstraram que o óleo essencial das flores frescas de *E. klotzschiana* coletadas em dezembro de 2014 as 18h:00min apresentou em sua composição química uma mistura de mono e sesquiterpenos, sendo que os constituintes majoritários foram os terpenoides: β -cariofileno, biciclogermacreno e o espatulenol. O óleo essencial apresentou ainda satisfatória atividade tripanocida frente

às formas tripomastigota do *Trypanosoma cruzi* e exibiu moderada citotoxicidade frente às células LLCMK₂. As promissoras atividades tripanocida e citotóxica foram descritas pela primeira vez. Em suma, nossos resultados fornecem subsídios para futuros estudos do óleo essencial das flores frescas de *E. klotzschiana* visando o isolamento dos compostos bioativos e investigação de seus potenciais antiparasitários.

Referências Bibliográficas

- Hotez, P. J.; Pecoult, B.; Rijal, S.; Boehme, C.; Aksoy, S.; Malecela, M.; Tapia-Conyer, R.; Reeder, J. C. Eliminating the neglected tropical diseases: translational science and new technologies. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **2016**, *10*, e0003895. [CrossRef]
- Lavorato, S. N.; Sales Júnior, P. A.; Murta, S. M. F.; Romanha, A. J.; Alves, R. J. *In vitro* activity of 1,3-bisaryloxypropanamines against *Trypanosoma cruzi*-infected L929 cultures. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **2015**, *110*, 566. [CrossRef]
- Passos, L. A. C.; Guaraldo, A. M. A.; Barbosa, R. L.; Dias, V. L.; Pereira, K. S.; Schmidt, F. L.; Franco, R. M. B.; Alves, D. P. Sobrevivência e infectividade do *Trypanosoma cruzi* na polpa de açaí: estudo *in vitro* e *in vivo*. *Epidemiologia e Serviços de Saúde* **2012**, *21*, 223. [CrossRef]

- ⁴ Oliveira, M. F.; Nagao-Dias, A. T.; Pontes, V. M. O.; Sousa Júnior, A. S.; Coelho, H. L. L.; Coelho, I. C. B. Tratamento etiológico da Doença de Chagas no Brasil. *Revista de Patologia Tropical* **2008**, *37*, 209. [[CrossRef](#)]
- ⁵ Melo, D. C.; Miranda, M. L. D.; Ferreira Júnior, W. G.; Andrade, P. M.; Alcoba, A. E. T.; Silva, T. S.; Casal, C. M.; Martins, C. H. G. Anticariogenic and antimycobacterial activities of the essential oil of *Siparuna guianensis* Aublet (Siparunaceae). *Orbital: The Electronic Journal of Chemistry* **2017**, *9*, 55. [[CrossRef](#)]
- ⁶ Raut, J. S.; Karuppayil, S. M. A status review on the medicinal properties of essential oils. *Industrial Crops and Products* **2014**, *62*, 250. [[CrossRef](#)]
- ⁷ Oliveira, G. C.; Lopes, P. S. N.; Cunha Neto, F. R.; Carvalho, J. G.; Gavilanes, M. L. Caracterização de plantas de *Eugenia klotzschiana* Berg (Pêra-do-Cerrado) e do ambiente de sua ocorrência na região fisiográfica dos campos das vertentes em Minas Gerais. *Revista da Universidade Alfenas* **1999**, *5*, 9. [[Link](#)]
- ⁸ Takao, L. K.; Imatomi, M.; Gualtieri, S. C. J. Antioxidant activity and phenolic content of leaf infusions of Myrtaceae species from Cerrado (Brazilian Savanna). *Brazilian Journal of Biology* **2015**, *75*, 948. [[CrossRef](#)]
- ⁹ Villarroel, D.; Proença, C. E. B. A new species and new records of Myrtaceae from the Noel Kempff Mercado National Park region of Bolivia. *Kew Bulletin* **2013**, *68*, 261. [[CrossRef](#)]
- ¹⁰ D'Angelis, A. S. R.; Negrelle R. R. B. *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum: aspectos botânicos, ecológicos, etnobotânicos e farmacológicos. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* **2014**, *16*, 607. [[CrossRef](#)]
- ¹¹ Queiroz, J. M. G.; Suzuki, M. C. M.; Motta, A. P. R.; Nogueira, J. M. R.; Carvalho, E. M. Aspectos populares e científicos do uso de espécies de *Eugenia* como fitoterápico. *Revista Fitos* **2015**, *9*, 73. [[CrossRef](#)]
- ¹² Costa, D. P.; Santos, S. C.; Seraphin, J. C.; Ferri, P. H. Seasonal variability of essential oils of *Eugenia uniflora* Leaves. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **2009**, *20*, 1287. [[CrossRef](#)]
- ¹³ Oliveira, R. N.; Dias, I. J. M.; Câmara, C. A. G. Estudo comparativo do óleo essencial de *Eugenia puniceifolia* (HBK) DC. de diferentes localidades de Pernambuco. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **2005**, *15*, 39. [[CrossRef](#)]
- ¹⁴ Chaieb, K.; Hajlaoui, H.; Zmantar, T.; Kahla-Nakbi, A. B.; Rouabhia, M.; Mahdouani, K.; Bakhrouf, A. The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzigium aromaticum* L. Myrtaceae): a short review. *Phytotherapy Research* **2007**, *21*, 501. [[CrossRef](#)]
- ¹⁵ Moreno, P. R. H.; Lima, M. E. L.; Sobral, M.; Young, M. C. M.; Cordeiro, I.; Apel, M. A.; Limberger, R. P.; Henriques, A. T. Essential oil composition of fruit colour varieties of *Eugenia brasiliensis* Lam. *Scientia Agricola* **2007**, *64*, 428. [[CrossRef](#)]
- ¹⁶ Senna, L. M.; Souza, G. R.; Bizzo, H. R.; Moreira, D. L. Composição volátil das folhas de *Eugenia racemulosa* O. Berg. (Myrtaceae). *Revista Brasileira de Farmácia* **2011**, *92*, 51. [[Link](#)]
- ¹⁷ Donato, A. M.; Morretes, B. L. Anatomia foliar de *Eugenia brasiliensis* Lam. (Myrtaceae) proveniente de áreas de restinga e de floresta. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **2007**, *17*, 426. [[CrossRef](#)]
- ¹⁸ Azeredo, C. M. O.; Santos, T. G.; Maia, B. H. L. N. S.; Soares, M. J. *In vitro* biological evaluation of eight different essential oils against *Trypanosoma cruzi* with emphasis on *Cinnamomum verum* essential oil. *Complementary & Alternative Medicine* **2014**, *14*, 309. [[CrossRef](#)]
- ¹⁹ Xavier, M. N.; Alves, J. M.; Carneiro, N. S.; Souchie, E. L.; Silva, E. A. J.; Martins, C. H. G.; Ambrosio, M. A. L. V.; Egea, M. B.; Alves, C. C. F.; Miranda, M. L. D. Composição química do óleo essencial de *Cardiopetalum calophyllum* Schltdl. (Annonaceae) e suas atividades antioxidante, antibacteriana e antifúngica. *Revista Virtual de Química* **2016**, *8*, 1433. [[CrossRef](#)]

- ²⁰ Adams, R. P.; *Identification of essential oil componentes by gas chromatography quadropole mass spectroscopy*, Allured: Card Stream I L, 2007.
- ²¹ Esperandim, V. R.; Ferreira, D. S.; Rezende, K. C. S.; Magalhães, L. G.; Souza, J. M.; Pauletti, P. M.; Januário, A. H.; Laurentz, R. S.; Bastos, J. K.; Símaro, G. V.; Cunha, W. R.; Silva, M. L. A. *In vitro* antiparasitic activity and chemical composition of the essential oil obtained from the fruits of *Piper cubeba*. *Planta Medica* **2013**, *79*, 1653. [[CrossRef](#)]
- ²² Cordeiro, M. W. S.; Cavallieri, A. L. F.; Ferri, P. H.; Naves, M. M. V. Características físicas, composição químico-nutricional dos óleos essenciais da polpa de *Caryocar brasiliense* nativo do estado de Mato Grosso. *Revista Brasileira de Fruticultura* **2013**, *35*, 1127. [[CrossRef](#)]
- ²³ Sousa, R. M. F.; Morais, S. A. L.; Vieira, R. B. K.; Napolitano, D. R.; Guzman, V. B.; Moraes, T. S.; Cunha, L. C. S.; Martins, C. H. G.; Chang, R.; Aquino, F. J. T.; Nascimento, E. A.; Oliveira, A. Chemical composition, cytotoxic, and antibacterial activity of the essential oil from *Eugenia calycina* Cambess. leaves against oral bacteria. *Industrial Crops and Products* **2015**, *65*, 71. [[CrossRef](#)]
- ²⁴ Lima, B. G.; Tietbohl, L. A. C.; Fernandes, C. P.; Cruz, R. A. S.; Botas, G. S.; Santos, M. G.; Silva-Filho, M. V.; Rocha, L. Chemical composition of essential oils and anticholinesterasic activity of *Eugenia sulcata* Spring ex Mart. *Latin American Journal of Pharmacy* **2012**, *31*, 152. [[Link](#)]
- ²⁵ Estevam, E. B. B.; Miranda, M. L. D.; Alves, J. M.; Egea, M. B.; Pereira, P. S.; Martins, C. H. G.; Esperandim, V. R.; Magalhães, L. G.; Bolela, A. C.; Casal, C. M.; Souza, A. F.; Alves, C. C. F. Composição química e atividades biológicas dos óleos essenciais das folhas frescas de *Citrus limonia* Osbeck e *Citrus latifolia* Tanaka (Rutaceae). *Revista Virtual de Química* **2016**, *8*, 1842. [[CrossRef](#)]
- ²⁶ Bakkali, F.; Averbeck, S.; Averbeck, D.; Idaomar, M. Biological effects of essential oils – a review. *Food and Chemical Toxicology* **2008**, *46*, 446. [[CrossRef](#)]
- ²⁷ Sartorelli, P.; Santana, J. S.; Guadagnin, R. C.; Lago, J. H. G.; Pinto, E. G.; Tempone, A. G.; Stefani, H. A.; Soares, M. G.; Silva, A. M. *In vitro* trypanocidal evaluation of pinane derivatives from essential oils of ripe fruits from *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). *Química Nova* **2012**, *35*, 743. [[CrossRef](#)]
- ²⁸ Silva, L. E.; Reis, R. A.; Moura, E. A.; Amaral, W.; Sousa, Jr. P. T. Plantas do gênero *Xylopia*: composição química e potencial farmacológico. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* **2015**, *17*, 814. [[CrossRef](#)]
- ²⁹ Affonso, R. S.; Rennó, M. N.; Slana, G. B. C. A.; França, T. C. C. Aspectos químicos e biológicos do óleo essencial de cravo da Índia. *Revista Virtual de Química* **2012**, *4*, 146. [[CrossRef](#)]
- ³⁰ De Pieri, F. A. Atividade sinérgica entre terpenos obtidos do gênero *Copaifera* sobre o agente etiológico da Doença de Chagas. *Revista Virtual de Química*, **2012**, *4*, 343. [[CrossRef](#)]
- ³¹ Escobar, P.; Leal, S. M.; Herrera, L. V.; Martinez, J. R.; Stashenko, E. Chemical composition and antiprotozoal activities of Colombian *Lippia* spp essential oils and their major componentes. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **2010**, *105*, 184. [[CrossRef](#)]
- ³² Siqueira, C. A. T.; Oliani, J.; Sartoratto, A.; Queiroga, C. L.; Moreno, P. R. H.; Reimão, J. Q.; Tempone, A. G.; Fischer, D. C. H. Chemical constituents of the volatile oil from leaves of *Annona coriácea* and *in vitro* antiprotozoal activity. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **2011**, *21*, 33. [[CrossRef](#)]
- ³³ Borges, A. R.; Aires, J. R. A.; Higino, T. M. M.; Medeiros, M. G. F.; Citó, A. M. G. L.; Lopes, J. A. D.; Figueiredo, R. C. B. Q. Trypanocidal and cytotoxic activities of essential oils from medicinal plants of northeast of Brazil. *Experimental Parasitology* **2012**, *132*, 123. [[CrossRef](#)]
- ³⁴ Magalhães, L. G.; Souza, J. M.; Wakabayashi, K. A. L.; Laurentiz, R. S.; Vinholis, A. H. C.; Rezende, K. C. S.; Símaro, G. V.; Bastos, J. K.; Rodrigues, V.; Ferreira, D. S.; Crotti, A. E. M.; Cunha, W. R.; Silva, M. L. A. *In*

in vitro efficacy of the essential oil of *Piper cubeba* L. (Piperaceae) against *Schistosoma mansoni*. *Parasitology Research* **2012**, *110*, 1747. [CrossRef]

³⁵ Marreiro, R. O.; Bandeira, M. F. C. L.; Almeida, M. C.; Coelho, C. N.; Venâncio, G. N.; Conde, N. C. O. Avaliação da citotoxicidade de um enxaguatório bucal contendo extrato de *Libidibia férrea*. *Brazilian Research in Pediatric Dentistry and Integrated Clinic* **2014**, *14*, 34. [CrossRef]

³⁶ Alves, R. T.; Regasini, L. O.; Funari, C. S.; Young, M. C. M.; Rimoldi, A.; Bolzani, V. S.; Silva, D. H. S.; Albuquerque, S.; Rosa, J. A. Trypanocidal activity of Brazilian plants

against epimastigote forms from Y and Bolivia strains of *Trypanosoma cruzi*. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **2012**, *22*, 528. [CrossRef]

³⁷ Estevam, E. B. B.; Silva, E. M.; Miranda, M. L. D.; Alves, J. M.; Pereira, P. S.; Silva, F. G.; Esperandim, V. R.; Martins, C. H. G.; Ambrosio, M. A. L. V.; Tófoli, D.; Junior, L. R. A.; Alves, C. C. F. Avaliação das atividades antibacteriana, tripanocida e citotóxica do extrato hidroalcoólico das raízes de *Tradescantia sillamontana* Matuda (Veludo Branco) (Commelinaceae). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* **2016**, *18*, 415. [CrossRef]