



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

CÍCERO RAMON BEZERRA DOS SANTOS

**POTENCIAL ANTIFÚNGICO E ANTIPARASITÁRIO DE ÓLEOS ESSENCIAIS  
EXTRAÍDOS DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Eugenia***

Recife  
2020

CÍCERO RAMON BEZERRA DOS SANTOS

**POTENCIAL ANTIFÚNGICO E ANTIPARASITÁRIO DE ÓLEOS ESSENCIAIS  
EXTRAÍDOS DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Eugenia***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

**Área de concentração:** Biotecnologia.

**Orientador:** Prof<sup>ª</sup>. Dra. Márcia Vanusa da Silva.

Recife

2020

Catálogo na fonte  
Elaine C Barroso  
(CRB4 1728)

Santos, Cícero Ramon Bezerra dos  
Potencial antifúngico e antiparasitário de óleos essenciais extraídos de espécies do gênero *Eugenia* / Cícero Ramon Bezerra dos Santos – 2020.

109 f.: il., fig., tab.

Orientadora: Márcia Vanusa da Silva

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, 2020.  
Inclui referências.

1. Plantas medicinais 2. Atividade Biológica 3. *Eugenia* I. Silva, Márcia Vanusa (orient.) II. Título

615.321

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2020-157

CÍCERO RAMON BEZERRA DOS SANTOS

**POTENCIAL ANTIFÚNGICO E ANTIPARASITÁRIO DE ÓLEOS ESSENCIAIS  
EXTRAÍDOS DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Eugenia***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

Aprovada em: \_\_ / \_\_ / \_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Márcia Vanusa da Silva (Orientadora)

Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof<sup>º</sup>. Dr. Thiago Henrique Napoleão (Examinador Interno)

Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia (Examinadora Interna)

Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Priscilla Andrade de Moura (Examinadora Externa)

Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Mariana Gomes Vidal Sampaio (Examinadora Externa)

Centro Universitário Paraíso do Ceará

*Dedico, primeiramente, esse trabalho a Deus,  
pela força contínua durante minha caminhada.  
Dedico também a minha família, pelo amor e  
apoio de sempre.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado forças.

Aos meus pais, pela educação que a mim dedicaram. Exemplos de sabedoria, garra e honestidade. Obrigado por todo amor e dedicação de todos esses anos.

À minha orientadora, Professora Doutora Márcia Vanusa, por ter aceito a orientação e confiado no meu trabalho.

A Douglas Wylliam por ser tão importante na minha vida. Graças ao seu companheirismo, apoio, amizade, paciência, compreensão, alegria e amor, esse trabalho também pôde ser concretizado.

Às minhas amigas e colegas de profissão, Mariana Gomes e Lilian Vandesmet, pela amizade, por sempre me indicarem o caminho e pelo apoio constante.

Ao meu amigo Doutor Eduardo Brandão, pela amizade que me devotas, por ter me incentivado nesse projeto e por ter me acolhido em Recife.

À Universidade Federal do Pernambuco, em especial ao Centro de Biociências, pela oportunidade.

A comunidade Agrodóia, pela contribuição cultural e pela ajuda nas coletas dos materiais botânicos e extrações dos óleos essenciais utilizados nesse trabalho.

À banca examinadora, por ter aceito o convite.

A todos que contribuíram para a realização desse sonho, meu muito obrigado.

## RESUMO

A literatura comprova que as espécies do gênero *Eugenia*, pertencentes à família Myrtaceae, tem utilização na medicina popular como: antidiabético, antimicrobiano, antiparasitário, fotoprotetor, analgésico, antipirético, antiartrítico, cicatrizante, anti-inflamatório, hepatoprotetor, anti-oxidante, ulceroprotetor, entre outros. As plantas medicinais vêm se tornando uma alternativa na terapêutica de doenças tropicais negligenciadas, como as parasitoses, pois alguns antiparasitários são tóxicos, dispendiosos e apresentam muitos efeitos colaterais e de doenças causadas por fungos, que têm se tornado cada vez mais resistentes a terapia disponível. Diante desse contexto, objetivou-se avaliar o potencial antifúngico e antiparasitário de óleos essenciais extraídos de espécies do gênero *Eugenia*. Para avaliar a composição química e a atividade antiparasitária, os óleos essenciais (OEs) foram extraídos por hidrodestilação e a análise fitoquímica foi realizada por cromatografia gasosa, sendo testado contra as formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* e formas promastigotas de *Leishmania braziliensis* e de *Leishmania infantum*. A atividade citotóxica foi realizada em fibroblastos através de um método de microdiluição em placa e posteriormente revelado com resazurina. O Óleo Essencial de *Eugenia gracillima* (OEEG) apresentou germacreno D, muuroleno, biciclogermacreno, germacreno B,  $\Delta$ -cadieno e  $\Delta$ -elemeno como componentes majoritários e exibiu valores de LC50 de (74,64  $\mu$ g/ml) para *Leishmania braziliensis* e (76,99  $\mu$ g/ml) para *Leishmania infantum*, obtendo resultados maiores que 1000  $\mu$ g/ml para as formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* nas mesmas concentrações. Apresentou ainda alta seletividade contra as formas promastigotas de *L. braziliensis* (73,66) e *L. infantum* (71,41), mas não apresentou efeito antiparasitário relevante frente às formas epimastigotas de *T. cruzi*. O Óleo Essencial de *Eugenia stipitata* (OEES) obteve valores de LC50 de (37,65  $\mu$ g/ml) para *Leishmania braziliensis* e (54,71  $\mu$ g/ml) para *Leishmania infantum*, exibindo resultados maiores que 1000  $\mu$ g/ml para as formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* nas mesmas concentrações. Também apresentou alta seletividade contra as formas promastigotas de *L. braziliensis* (13,58) e *L. infantum* (9,35), sendo seus constituintes químicos mais abundantes:  $\beta$ -eudesmol,  $\gamma$ -eudesmol, elemol, óxido de cariofileno, cloveno e espatulenol. A atividade antifúngica foi realizada com o OEES. A propriedade anti-*Candida* foi determinada através da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Fungicida Mínima (CFM), o mecanismo de ação na presença de sorbitol e ergosterol exógeno e a propriedade moduladora pela determinação do Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF) com os antifúngicos fluconazol e anfotericina B. Na análise antifúngica, obteve-se valores de CIM que variaram de 64 a 512  $\mu$ g/mL e de CFM que

estão entre 512 a > 1024 µg/ml. Na presença ou na ausência do sorbitol, os valores de CIM permaneceram inalterados. Já com o aumento da concentração exógena de ergosterol, os valores de CIM não mudaram. Os valores de ICIF para as interações com fluconazol, demonstraram que as mesmas foram sinérgicas para 87,5% (7/8) das cepas testadas e indiferentes às demais. Os resultados revelam que os OEEG e OEES representam compostos com potencial capacidade biológica a serem exploradas, possuindo notável atividade leishmanicida, tornando-se favorável para a realização de novos testes de caráter antiparasitário que poderão ser promissores na terapêutica alternativa contra doenças tropicais negligenciadas. Além disso, o OEES demonstrou propriedade antifúngica contra as cepas de *Candida* testadas, com provável mecanismo de ação através da inibição da biossíntese de ergosterol. Ademais, foi obtido efeito sinérgico entre o óleo essencial e a fluconazol para a maioria das espécies, exceto para uma cepa de *C. tropicalis*.

**Palavras-chave:** Plantas medicinais. Atividades biológicas. *Eugenia*.

## ABSTRACT

The literature shows that species of the genus *Eugenia*, belonging to the Myrtaceae family, are used in popular medicine such as: antidiabetic, antimicrobial, antiparasitic, photoprotective, analgesic, antipyretic, antiarthritic, healing, anti-inflammatory, hepatoprotective, anti-oxidant, ulceroprotective, among others. Medicinal plants are becoming an alternative in the treatment of neglected tropical diseases, such as parasites, as some antiparasitic drugs are toxic, expensive and have many side effects and diseases caused by fungi, which have become increasingly resistant to available therapy. In this context, the objective was to evaluate the antifungal and antiparasitic potential of essential oils extracted from species of the genus *Eugenia*. To evaluate the chemical composition and antiparasitic activity, essential oils (EOs) were extracted by hydrodistillation and the phytochemical analysis was performed by gas chromatography, being tested against the epimastigotes forms of *Trypanosoma cruzi* and promastigotes forms of *Leishmania braziliensis* and *Leishmania infantum*. Cytotoxic activity was performed on fibroblasts using a microdilution plate method and later revealed with resazurin. The Essential Oil of *Eugenia gracillima* (EOEG) presented germacrene D, muurolene, bicyclogermacrene, germacrene B,  $\Delta$ -cadiene and  $\Delta$ -elemene as major components and exhibited LC<sub>50</sub> values of (74.64  $\mu$ g / ml) for *Leishmania braziliensis* e (76 , 99  $\mu$ g / ml) for *Leishmania infantum*, obtaining results greater than 1000  $\mu$ g / ml for the epimastigote forms of *Trypanosoma cruzi* in the same concentrations. It also showed high selectivity against the promastigote forms of *L. braziliensis* (73.66) and *L. infantum* (71.41), but it did not have a relevant antiparasitic effect compared to the epimastigote forms of *T. cruzi*. The Essential Oil of *Eugenia stipitata* (EOES) obtained LC<sub>50</sub> values of (37.65  $\mu$ g / ml) for *Leishmania braziliensis* and (54.71  $\mu$ g / ml) for *Leishmania infantum*, showing results greater than 1000  $\mu$ g / ml for epimastigotes forms *Trypanosoma cruzi* in the same concentrations. It also showed high selectivity against the promastigote forms of *L. braziliensis* (13.58) and *L. infantum* (9.35), with its most abundant chemical constituents:  $\beta$ -eudesmol,  $\gamma$ -eudesmol, elemol, karyophylline oxide, clovene and spatulenol. The antifungal activity was performed with the EOES. The anti-*Candida* property was determined through the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and the Minimum Fungicidal Concentration (CFM), the mechanism of action in the presence of exogenous sorbitol and ergosterol and the modulating property by determining the Fractional Inhibitory Concentration Index (FICI) with the antifungals fluconazole and amphotericin B. In the antifungal analysis, MIC values ranging from 64 to 512

$\mu\text{g} / \text{ml}$  and MFC values between 512 to  $> 1024 \mu\text{g} / \text{ml}$  were obtained. In the presence or absence of sorbitol, MIC values remained unchanged. With the increase in the exogenous concentration of ergosterol, MIC values did not change. The FICI values for interactions with fluconazole, showed that they were synergistic for 87.5% (7/8) of the strains tested and indifferent to the others. The results reveal that the EOEG and EOES represent compounds with potential biological capacity to be explored, possessing remarkable leishmanicidal activity, making it favorable for the performance of new tests of antiparasitic character that could be promising in the alternative therapy against neglected tropical diseases. In addition, the EOES demonstrated antifungal properties against the tested *Candida* strains, with a probable mechanism of action through the inhibition of ergosterol biosynthesis. In addition, a synergistic effect was obtained between essential oil and fluconazole for most species, except for a strain of *C. tropicalis*.

**Keywords:** Medicinal plants. Biological activities. *Eugenia*.

## LISTA DE FIGURAS

### Artigo 3

- Figura 1 – Quantificação do conteúdo de ergosterol celular de *Candida* spp. após exposição a diferentes concentrações do OEES..... 78

## LISTA DE TABELAS

### Artigo 1

Table 1 –	Chemical composition of the essential oil from <i>Eugenia stipitata</i> McVaugh.	54
Table 2 –	Antiprotozoal activity and cytotoxicity of <i>Eugenia stipitata</i> essential oil.....	55
Table 3 –	Antibacterial activity of <i>Eugenia stipitata</i> essential oil.....	55
Table 4 –	Free radical scavenging activity of <i>Eugenia stipitata</i> essential oil.....	56

### Artigo 2

Table S1 –	Chemical composition of the essential oil of <i>Eugenia gracillima</i> Kiaersk.....	68
Table S2 –	Antioxidant activity of <i>Eugenia gracillima</i> essential oil.....	68
Table S3 –	Antiprotozoal activity and cytotoxicity of <i>Eugenia gracillima</i> essential oil	69

### Artigo 3

Tabela 1 –	Atividade antifúngica do óleo essencial de <i>Eugenia stipitata</i> frente espécies de <i>Candida</i> .....	77
Tabela 2 –	Efeito do óleo essencial de <i>Eugenia stipitata</i> em <i>Candida</i> spp. na biossíntese da parede celular (sorbitol).....	78
Tabela 3 –	Efeito de diferentes concentrações de ergosterol exógeno na CIM do óleo essencial de <i>Eugenia stipitata</i> e anfotericina B contra <i>Candida</i> spp.....	79
Tabela 4 –	Interação farmacológica entre o óleo essencial de <i>Eugenia stipitata</i> e antifúngicos contra <i>Candida</i> spp.....	80

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>13</b>
1.1	OBJETIVOS	15
1.1.1	<b>Objetivo Geral</b>	<b>15</b>
1.1.2	<b>Objetivos Específicos</b>	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b>	<b>17</b>
2.1	PLANTAS MEDICINAIS	17
2.2	ÓLEOS ESSENCIAIS	19
2.3	CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A FAMÍLIA MYRTACEAE	20
2.4	GÊNERO <i>Eugenia</i>	21
2.4.1	<b>Atividades biológicas de plantas do gênero <i>Eugenia</i></b>	<b>22</b>
2.4.2	<b>Considerações gerais sobre a espécie <i>Eugenia stipitata</i></b>	<b>23</b>
2.4.3	<b>Considerações gerais sobre a espécie <i>Eugenia gracillima</i></b>	<b>24</b>
2.5	CANDIDA	25
2.5.1	<b>Óleos essenciais com potencial antifúngico</b>	<b>27</b>
2.6	LEISHMANIA	28
2.6.1	<b>Óleos essenciais com potencial leishmanicida</b>	<b>30</b>
2.7	TRYPANOSOMA CRUZI	31
2.7.1	<b>Óleos essenciais com potencial tripanosida</b>	<b>32</b>
<b>3</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>34</b>
3.1	ARTIGO 1 – CHEMICAL COMPOSITION, ANTIOXIDANT, ANTIBACTERIAL, ANTIPROTOZOAL AND CYTOTOXIC ACTIVITIES OF <i>Eugenia stipitata</i> MCVAUGH LEAVES ESSENTIAL OIL	34
3.2	ARTIGO 2 – CHEMICAL COMPOSITION, ANTIOXIDANT AND ANTIPROTOZOAL ACTIVITY OF <i>Eugenia gracillima</i> KIAERSK. LEAVES ESSENTIAL OIL	57
3.3	ARTIGO 3 – AVALIAÇÃO DA PROPRIEDADE ANTIFÚNGICA, INTERAÇÃO COM ANTIFÚNGICOS E MECANISMO DE AÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Eugenia stipitata</i> MCVAUGH	70
<b>4</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>90</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>92</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A utilização das plantas como medicamento é uma das mais antigas armas empregadas para o tratamento das enfermidades humanas e muito já se conhece a respeito de seu uso por parte da sabedoria popular. A Organização Mundial de Saúde (OMS) comenta que, na busca incessante do homem por bem-estar e qualidade de vida, a fitoterapia tornou-se uma alternativa devido à credibilidade terapêutica e ao baixo custo, o que favorece sua utilização por uma grande parcela da população mundial (LUCHESSI et al., 2005).

Nos países em que a população não tem acesso amplo a medicamentos, a medicina popular exerce um importante papel, sobretudo na atenção primária à saúde. É estimado pela OMS que em países considerados em menor desenvolvimento, mesmo diante dos avanços alcançados nos últimos 30 anos no tocante as políticas públicas, uma grande parcela da população ainda não tem acesso regular a serviços de saúde convencionais e medicamentos essenciais (OMS, 2018). Assim, o uso de plantas medicinais e seus derivados tem se tornado uma alternativa à terapêutica convencional, prática que os órgãos internacionais têm concentrado esforços no sentido de garantir que seja segura e eficaz (OMS, 2012).

O Brasil é detentor de arcabouço legal para plantas medicinais e fitoterápicos e programas de incentivo à pesquisa desses; contudo, apenas em 2006 foram publicadas políticas governamentais voltadas à área: a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) e a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde, que trazem em suas diretrizes pautas regulatórias e incentivo à pesquisa em plantas medicinais e fitoterápicos, priorizando a biodiversidade do País (CARVALHO, 2011). Dentre os agentes terapêuticos vegetais destacam-se os óleos essenciais (Oes), produzidos nas folhas de plantas aromáticas, em estruturas chamadas tricomas glandulares, provenientes do metabolismo secundário das plantas, que atuam nos mecanismos de defesa contra as condições adversas (MICHELIN, 2018). Algumas plantas aromáticas detêm significativa importância para a indústria farmacêutica por apresentar potencial inibidor antimicrobiano. O problema emergente da resistência à antibioticoterapia impulsiona múltiplos estudos sobre a potencial atividade antimicrobiana dos óleos essenciais (ZAMORA; TORRES; NUNES, 2018).

A obtenção de uma droga vegetal de qualidade tem correlação direta com o conhecimento prévio das classes de componentes químicos encontrados nesses vegetais. Quando confirmada a presença de determinados grupos químicos, o estudo fitoquímico e biológico é direcionado através de ensaios que avaliam substâncias oriundas de plantas, em

extratos ou substâncias isoladas (LÔBO et al., 2010).

A família Myrtaceae, no Brasil, é representada por 27 gêneros e cerca de 1102 espécies (FLORA DO BRASIL, 2020). Estudos apontam que as plantas pertencentes a essa família são fontes de óleos essenciais responsáveis por importantes benefícios associados à saúde (D'ANGELIS; NEGRELLE, 2014). Do ponto de vista químico, várias substâncias com atividade farmacológica foram isoladas a partir de espécies dessa família, tais como o cariofileno, biciclogermacreno, espatulenol, carotenoides, ácido ascórbico e compostos fenólicos (MORENO et al., 2014; MIRANDA et al., 2017; PEREIRA et al., 2017).

O gênero *Eugenia* encontra-se representado por 438 espécies nos diversos domínios fitogeográficos do Brasil, sendo as espécies desse gênero alvos constantes de pesquisas, uma vez que são detentoras de óleos essenciais e diversos metabólitos secundários que apresentam importantes ações biológicas, tais como antimicrobiana, antifúngica e antiparasitária (VICTÓRIA et al., 2012; QUEIROZ et al., 2015; FLORA DO BRASIL, 2020).

Sobretudo em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, as infecções por protozoários são tidas como um problema mundial de saúde pública, onde aproximadamente 14% da população está sob risco de infecção (KONDRASHIN et al., 2011; WALDRON et al., 2011). Assim sendo, salienta-se: a doença de Chagas, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, cujo tratamento quimioterápico apresenta vários efeitos colaterais e efeito limitado para diferentes isolados de parasitas e fases da doença; a leishmaniose, causada pelo protozoário *Leishmania*, considerada pela OMS como uma das seis principais doenças infecciosas apresentando alta incidência e capacidade de produzir deformidades, no qual o tratamento utilizado atualmente é baseado na quimioterapia com fármacos caros, tóxicos e ineficientes, que não atendem à variedade de agentes etiológicos da doença, além de não haver ações eficazes no controle do vetor (ALIZADEH et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2008; MITROPOULOS et al., 2010; FERREIRA, 2012; REBOLLO; OLIVERO-VERBEL; REYES, 2013).

Com o mesmo viés, as candidíases são um grupo de doenças ocasionadas por algumas espécies do gênero fúngico *Candida*, dentre elas: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. krusei*, podendo ainda ser causada por outras espécies (SIDRIM; ROCHA, 2014).

Infecções por *Candida* manifestam-se costumeiramente em pele e mucosas, porém, há uma complicação desta enfermidade, passando a ser uma infecção fúngica invasiva. A Candidíase Invasiva (CI) é comumente observada no meio hospitalar em pacientes imunologicamente debilitados, internados em Unidades de Terapia Intensiva (UTI), geralmente

com comorbidades crônicas (CORCIONE et al., 2018; JAHANSHIRI et al., 2018; MIRANDA-CADENA et al., 2018, SANGARÉ et al., 2018). Outra problemática é o precário arsenal terapêutico disponível para o tratamento, uma vez que os fármacos são restritos a classe dos azóis, poliênicos e equinocandinas, são altamente tóxicos para o hospedeiro e possuem eficácia reduzida devido os mecanismos de resistência fúngica (CHAMORRO-DE-VEJA; GIL-NAVARRO; CORZÓ-LÉON et al., 2018; SHARIFZADEH; SHOKRI; ABBASZADEH, 2019).

Dessa forma, o isolamento, a caracterização e a aplicação biológica de compostos naturais, possuem um elevado grau de significância na produção de novas drogas com perfil farmacológico. Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial antifúngico e antiparasitário de óleos essenciais extraídos de espécies do gênero *Eugenia*.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial antifúngico e antiparasitário de óleos essenciais extraídos de espécies do gênero *Eugenia*.

### 1.1.2 Objetivos específicos

- Obter, caracterizar e quantificar os óleos essenciais das folhas de *Eugenia gracillima* Kiaersk (OEEG) e *Eugenia stipitata* McVaugh (OEES), através da técnica de hidrodestilação e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG/MS);
- Avaliar as atividades citotóxica e tripanocida do OEEG e do OEES, contra a forma epimastigota de *Trypanosoma cruzi* e leishmanicida, contra as formas promastigotas de *Leishmania braziliensis* e *Leishmania infantum*;
- Avaliar a ação antifúngica do OEES a partir da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) frente às espécies de *Candida*;
- Verificar o efeito modulador da atividade antifúngica da Anfotericina B e Fluconazol exercido pelo OEES frente às espécies de *Candida*;
- Verificar os possíveis mecanismos de ação do OEES frente às espécies de *Candida*.

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 PLANTAS MEDICINAIS

As plantas são bem conhecidas como fonte de muitos compostos biologicamente ativos e utilizadas pelos homens como um aporte terapêutico para tratar e curar doenças, além de garantir uma sensação de bem-estar (ANDRADE et al., 2017). Esse poder curativo foi notado no início das primeiras civilizações, na qual se tinha noção que algumas plantas possuíam princípios ativos que, quando experimentados frente algumas doenças, revelavam seu potencial terapêutico. Por conseguinte, as plantas medicinais foram usadas por muitos anos como o primordial mecanismo para tratar as pessoas (BADKE et al., 2011).

Historicamente, nas tribos primitivas, quem detinha o poder de curar era o feiticeiro, sendo assim, o qual tinha o dever de estudar sobre as plantas medicinais e assumia uma posição hierárquica elevada devido ao seu conhecimento e medo que impunha aos demais. Nessa época, muitas moléstias eram atribuídas a seres malignos e demônios. Os feiticeiros, portanto, deviam expulsá-los do corpo. Para isso, plantas com potencial purgante, emético e alucinógeno eram as mais usadas nesse processo. Dentre elas, muitas tinham odor e aspecto nauseante para expulsar o demônio e, no caso dos alucinógenos, o feiticeiro se conectava com forças sobrenaturais para diagnosticar e tratar o mal que acometia o molestado (IUSC, 2011).

Crê-se que o registro mais antigo sobre o uso de plantas medicinais no processo de cura e tratamento das enfermidades data de 2800 a. C., quando o herborista chinês Shen Nung descreve o uso terapêutico de centenas de plantas medicinais na sua obra Pen Ts'ao. Outro registro muito importante no processo histórico do desenvolvimento do uso de plantas com potencial terapêutico é um papiro datado de aproximadamente 1500 a. C., que foi acessado pelo egiptólogo alemão Yorg Ebers no final do século XIX e, após a tradução, ficou conhecido como “Papiro de Ebers”, sendo esse um dos mais relevantes registros da cultura médica (ALMEIDA, 2011).

A papoula (*Papaver somniferum*), a maconha (*Cannabis sativa*), a babosa (*Aloe vera*), entre outras, são exemplos de plantas que foram usadas ao longo da história, tendo registros de uso há milhares de anos antes de Cristo. Entretanto, a pesquisa por princípios ativos nas plantas medicinais só ocorreu ao longo do século XIX, dando origem aos primeiros medicamentos que, até hoje, são usados na medicina moderna, como o alcalóide morfina originário da papoula.

Exemplos importantes de medicamento isolado de planta é a atropina, um antagonista muscarínico, isolado de *Atropa beladonna*; a cafeína, isolada de *Coffea arábica*; a digoxina,

obtida a partir de *Digitalis lanata* e do curare, obtido de *Chondrodendron tomentosum* (CALIXTO; SIQUEIRA JUNIOR, 2008).

No Brasil, no período colonial, remédios oriundos da natureza eram vastamente utilizados na cura das doenças que atacavam os seus habitantes e, desde o século XVIII, os conhecimentos sobre os usos e propriedades das plantas medicinais foram sendo pesquisados e divulgados no meio científico, nos centros de botânica e na história natural na Europa (SANTOS, 2008).

De acordo com Monteiro e Brandelli (2017), a fitoterapia brasileira sofreu grande influência africana, indígena e europeia, uma vez que os escravos africanos trouxeram consigo plantas que eram utilizadas em seus rituais religiosos e possuíam propriedades terapêuticas empiricamente descobertas. Já os índios, contribuíram com o conhecimento acerca da biodiversidade utilizada por eles, em que o pajé transmitia o conhecimento para as futuras gerações, e os europeus cooperaram ao absorver o conhecimento e praticá-los de acordo com a necessidade diária como habitante brasileiro.

Ao decorrer dos anos, houve um expressivo aumento de estudos no Brasil com plantas medicinais, como pode ser verificado na análise retrospectiva de Carneiro e colaboradores (2014), realizada entre os anos de 1995 e 2011, em que os estudos estão direcionados principalmente para a farmacologia, com amplas aplicações no âmbito da saúde. É possível também identificar nesse estudo um aumento considerável a partir do ano de 2006, provavelmente ligado ao decreto 5.813/2006, que institui a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF). A PNPMF estabelece diretrizes e linhas prioritárias com a pretensão de garantir o acesso seguro e uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos no país, além de incentivar a ampliação das alternativas terapêuticas e serviços em fitoterapia no Sistema Único de Saúde (SUS), procurando a melhoria da atenção à saúde da população e à inclusão social (BRASIL, 2006).

Um fator decisivo para a consolidação da fitoterapia no SUS foi a inserção de oito medicamentos fitoterápicos e homeopáticos como alternativa terapêutica recomendada pelo Ministério da Saúde para as doenças passíveis de tratamento na atenção básica a saúde, sendo custeados pelo poder público, dado pela aprovação da Portaria nº 2.982 de 26 de novembro de 2009 (BRASIL, 2009<sup>a</sup>).

No decorrer dos anos, outros fatores favoreceram a implementação da fitoterapia no Brasil como, por exemplo, a lista de 71 plantas medicinais indicadas para uso terapêutico da população publicada pelo Ministério da Saúde em 2009 na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (BRASIL, 2009b), além do projeto Farmácia Viva ter sido

oficialmente instituído no âmbito do SUS através da Portaria nº 886, de 20 de Abril de 2010, considerando a necessidade de ampliação da oferta de fitoterápicos e de plantas medicinais que atenda à demanda e às necessidades locais (BRASIL, 2010).

Entretanto, apesar de tanta evolução no âmbito da implementação da fitoterapia no Brasil, pouco se investe em pesquisa com plantas medicinais, uma realidade preocupante quando se sabe que pelo menos metade de todas as plantas possuem princípios ativos desconhecidos, os quais podem ter atividades terapêuticas para diversas moléstias (LORENZI; MATOS, 2002; SANTOS; TRINDADE, 2017).

## 2.2 ÓLEOS ESSENCIAIS

Os Óleos Essenciais (Oes) são substâncias voláteis e lipofílicas sintetizadas a partir do metabolismo secundário de plantas aromáticas em situações de estresse fisiológico, desencadeado por fatores climáticos ou biológicos. Esses desempenham funções importantes na proteção da planta, atuando como agentes alelopáticos, antivirais, antifúngicos, antibacterianos, inseticidas, sendo também capazes de reduzir o apetite de animais herbívoros. Os Oes possuem também função de grande relevância na polinização das plantas, atraindo insetos para favorecer a dispersão de pólenes e sementes e repelindo aqueles indesejáveis (SANTURIO et al., 2007; BAKKALI et al., 2008; XAVIER et al., 2016).

As plantas aromáticas são utilizadas desde a Antiguidade por suas atividades conservantes, aromáticas e medicinais. Uma prova disso é que Hipócrates, considerado pai da Medicina, prescrevia perfumes derivados de Oes para combater infecções. Ao decorrer dos anos, a utilização dos Oes foi reduzida a produzir perfumes, cosméticos e aromas alimentares, em consequência disso as preparações farmacêuticas desapareceram. Entretanto, atualmente há um ressurgimento da busca pela medicina popular, especialmente por remédios de origem vegetal. Essa busca estimula a procura por substâncias biologicamente ativas como os Oes (EDRIS, 2007; FIGUEIREDO et al., 2008).

Todo OE possui características específicas que os diferenciam, devido à mistura complexa de compostos químicos, em que cada constituinte possui suas propriedades físico-químicas e encontram-se em concentrações distintas. Os principais componentes normalmente encontrados nos OE's são mono e sesquiterpenos, além de fenilpropanoides, metabólitos responsáveis por conferir suas propriedades organolépticas (FIGUEIREDO et al., 2008; BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009).

Os Oes possuem algumas propriedades já bem estabelecidas na literatura, como

sedativa, antibacteriana, anti-inflamatória, antiviral e antifúngica (NIETO, 2017). Nesse sentido, Freire e colaboradores (2014) acreditam que há uma possibilidade de futura aplicação clínica embasada na literatura, tendo em vista o fácil acesso da população a esses produtos.

### 2.3 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A FAMÍLIA MYRTACEAE

No Brasil, a família Myrtaceae é representada por 27 gêneros e cerca de 1102 espécies. Segundo o extenso levantamento da flora brasileira, responsável por catalogar espécies de plantas e fungos, 795 destas são endêmicas do Brasil, ou seja, ocorrem apenas no território do País (FLORA DO BRASIL, 2020).

As plantas da família são caracterizadas como árvores ou arbustos de caule cilíndrico e casca áspera ou lisa, geralmente com o ritidoma desprendendo-se em placas ou lâminas. As espécies apresentam folhas simples, opostas e inteiras. As inflorescências podem ser terminais ou axilares, racemiformes, fasciculiformes, glomeruliformes ou paniculiformes, podendo ocorrer flores solitárias e axilares. As flores são bissexuais, com cálice caliptriforme; sépalas geralmente persistentes; 4-5 pétalas, reduzidas ou ausentes, alvas, estames numerosos, livres; ovário ínfero, número variável de lóculos e óvulos; frutos tipo baga, com o embrião envolvido por polpa carnosa. Além disso, as plantas apresentam glândulas oleíferas sob a forma de pontos translúcidos ou imersas nos tecidos (GIARETTA et al., 2016).

A família é reconhecida não apenas por sua diversidade, mas também pela grande importância econômica. Vários gêneros são notáveis fontes de madeira e óleos essenciais, como *Eucalyptus* e *Corymbia*; especiarias como o gênero *Syzygium* (cravo-da-índia); peças ornamentais como *Callistemon*, *Melaleuca*, *Myrrhinium* e *Eugenia*. Dentre as frutíferas comercializadas e apreciadas na alimentação, destacam-se espécies dos gêneros *Psidium* (goiabas), *Eugenia* (pitangas), *Myrciaria* (jaboticabas) e *Syzygium* (jambo e jamelao). Além disso, as plantas desta família são empregadas na medicina popular para o tratamento de diversas enfermidades (GRATTAPAGLIA et al., 2012; GIARETTA et al., 2016).

Além da importância econômica, as espécies da família Myrtaceae apresentam grande potencial ecológico, tendo em vista que seus frutos carnosos e suculentos atuam como fonte de alimento para a fauna silvestre. Muitas aves e macacos auxiliam na dispersão das sementes destas plantas, contribuindo assim para a sobrevivência e permanência dessas espécies no meio ambiente (BEZERRA et al., 2006).

As espécies dessa família são bastante utilizadas na medicina popular por possuírem propriedades antidiarréica, antimicrobiana, antioxidante, anti-reumática, anti-inflamatória,

além diminuir a taxa de colesterol sanguínea (DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002).

Está incluído nessa família, o grupo de espécies nativas chamadas de araçá, composto por pelo menos três tipos diferentes, sendo eles o araçá comum (*Psidium* sp.), araçá-boi (*Eugenia stipitata* McVaugh) e araçá-pêra (*Psidium acutangulum* DC). Esse grupo tem ganhado destaque na realização de estudos, uma vez que possuem muitos minerais, como cálcio, fósforo e ferro, além de conter fibras e taninos em sua casca, todos de grande importância para o funcionamento normal do organismo humano. Os araçás também apresentam propriedades medicinais, ajudando a erradicar os radicais livres e fortalecendo o organismo contra gripes e infecções (FRANCO, 2001; GIACOBBO et al., 2008).

#### 2.4 O GÊNERO *Eugenia*

O gênero *Eugenia* compreende mais de mil espécies registradas, sendo considerado o maior da família *Myrtaceae*. Essas plantas encontram-se distribuídas a partir do Sul do México, Cuba, Brasil, Antilhas, Uruguai e Argentina, com raras espécies na África (GOVAERTS et al., 2008).

No Brasil, o gênero *Eugenia* encontra-se bem representado nos diversos domínios fitogeográficos destacando-se pelo vasto potencial medicinal, econômico, alimentício, bem como para exploração comercial de madeiras e óleos essenciais, além de seu uso como plantas ornamentais (ROMAGNOLO; SOUZA, 2006; ALVES; TRESMONDI; LONGUI, 2008; LAGO et al., 2011).

Este gênero possui representantes na forma de arbustos, subarbustos e árvores, nas quais o caule pode atingir de três a doze metros de altura. As flores exibem-se em racemos, dicásios ou isoladas, com antopódio presente e perfis livres, persistentes ou caducos. Os botões florais abertos apresentam quatro sépalas que frequentemente são desiguais, e as pétalas tetrâmeras semelhantes. Os estames são numerosos; ovário bilocular podendo apresentar de quatro a vinte óvulos por lóculo. Os frutos apresentam coloração heterogênea podendo ser amarelos, alaranjados, vermelhos, vináceos e até pretos quando maduros, sendo as bagas globosas a elipsóides, com cálice persistente. O número de sementes pode variar de uma a três, o embrião é do tipo eugenióide. Entre os cotilédones existe uma linha de separação e o eixo hipocótilo- radícula apresenta-se pouco desenvolvido (QUEIROZ et al., 2015).

As espécies pertencentes ao gênero *Eugenia* estão sendo constantemente pesquisadas, pois são detentoras de óleos essenciais e diversos metabólitos que apresentam importantes ações

biológicas (VICTORIA et al., 2012). No entanto, a maior parte das espécies nativas no Brasil pertencentes a este gênero ainda não foram estudadas, assim a composição química e as atividades biológicas são desconhecidas (LAZARINI et al., 2018).

#### 2.4.1 Atividades biológicas de plantas do gênero *Eugenia*

Estudos realizados com a espécie *Eugenia uniflora* L. mostraram importantes propriedades terapêuticas, tais como: antiparasitária, antibacteriana, antioxidante, antidepressiva, antinociceptiva e hipotérmicas. Os marcadores químicos ácido gálico, ácido elágico e miricitrina são os principais metabólitos de sua composição química. Porém, podem ser encontrados nesta planta outros metabólitos, tais como as antacioninas e sesquiterpenos (OGUNWANDE et al., 2005; AMORIM et al., 2009; BEZERRA et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2017; SOUZA et al., 2017<sup>a</sup>).

O OE das flores frescas de *Eugenia klotzschiana*, cujos componentes majoritários são os sesquiterpenos  $\beta$ -cariofileno (21,1%), espatulenol (20,9%) e biciclogermacreno (10,2%), apresentou atividade frente às formas tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi*, obtendo satisfatória atividade tripanocida (CARNEIRO et al., 2017). Os OE de folhas das espécies *Eugenia jambolana* e *Eugenia uniflora* demonstraram uma ampla variedade de compostos flavonóides associados à atividade antiparasitária contra promastigotas de *Leishmania sp.* e epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* (SOUZA et al., 2017<sup>a</sup>).

As atividades biológicas de OE obtidos a partir de folhas da espécie *Eugenia jambolana* L. incluem: antibacteriana, antidiarreica, antiparasitária, antidiabética, antinociceptiva e anti-inflamatória (MUKHERJEE et al., 1988; SAHA et al., 2013; LI et al., 2017; PEREIRA et al., 2017; SOUZA et al., 2017<sup>a</sup>). Um rastreio químico e quimiopreventivo realizado com extrato aquoso e frações de folhas e frutos de *E. jambolana* L. levaram à purificação de flavonoides (trictina-4'-O- $\beta$ -1-rhamnopiranosídeo e miricitrina) e antacioninas (malvidina-3-O-gentibiosídeo), sugerindo que esta espécie pode agir como um agente preventivo contra danos ao DNA (DAMETTO et al., 2017).

De acordo com Aranha et al. (2019), os Oes de folhas de *Eugenia tapacumensis* e de *Eugenia cuspidifolia* apresentaram resultados antitumorais promissores, com potencial efeito na linhagem celular HCT116 (linhagem celular de câncer de cólon humano). Os óleos essenciais reduziram a viabilidade das células tumorais com valores de IC 50 entre 12,37–26,17  $\mu$ g/mL e foram identificados um total de 24 compostos diferentes nos óleos essenciais; óxido de cariofileno (57,46%; 55,95%) e  $\alpha$ -copaeno (3,75%; 13,67%) foram os principais

compostos detectados nos óleos de *E. cuspidifolia* e *E. tapacumensis*, respectivamente.

O extrato aquoso de *Eugenia dysenterica*, no estudo de Fidelis-de-Oliveira et al. (2020), apresentou atividades cardiovasculares. O efeito hipotensivo induzido pelo extrato pareceu envolver bloqueio do canal de cálcio do tipo L, bem como sinalização da junção GAP mioendotelial. Além disso, outros estudos foram realizados com a espécie *E. dysenterica*, na qual as atividades biológicas descritas incluem: citotóxica, antioxidante, fotoprotetora, cicatrizante, antidiabética, entre outros (VITEK et al., 2017; VIEIRA et al., 2012; LIMA et al., 2010; ZORZIN, 2014; DONADO-PESTANA et al., 2018; THOMAZ et al., 2018; SILVA et al., 2019).

Segundo Neves e colaboradores (2017), *Eugenia candolleana* D.C. apresentou OE de folhas rico em sesquiterpenos, prevalecendo o  $\beta$ -elemeno ( $35,87 \pm 0,13\%$ ) como componente majoritário. O OE apresentou atividade larvicida, na qual obteve-se 100% de mortalidade das larvas do *A. aegypti* em 24 horas após o tratamento com o óleo na concentração de  $0,50 \mu\text{g}/\mu\text{L}^{-1}$  sendo a CL50 estimada em  $0,30 \mu\text{g}/\mu\text{L}^{-1}$ .

Alguns estudos já foram realizados para pesquisar a atividade citotóxica, utilizando fibroblastos murinos, de espécies do gênero *Eugenia*, destacando-se as espécies: *E. aurata*, *E. puniceifolia*, *E. brejoensis*, *E. flavescens* e *E. uniflora* (GALENO et al., 2014; LEITE et al., 2014; COSTA et al., 2016; SILVA et al., 2017; SOUZA et al., 2017b; FIGUEIREDO et al., 2019).

#### **2.4.2 Considerações gerais sobre a espécie *Eugenia stipitata***

O araçazeiro-boi (*Eugenia stipitata* McVaugh) é uma frutífera da Amazônia pertencente à família Myrtaceae. É originária da Amazônia Ocidental, comumente cultivada em pequena escala no Peru, Bolívia, Equador, Colômbia e Brasil (MCVAUGH, 1956).

O arbusto do araçá-boi alcança de três a cinco metros de altura, com abundante ramificação e folhagem, se adaptando muito bem ao clima tropical úmido. Suas folhas são elípticas, verde-escuras e as pequenas inflorescências possuem de três a dez flores hermafroditas, com pétalas brancas e 75 a 100 estames (CHÁVES-FLORES; CLEMENT, 1984; EMBRAPA, 1996).

Seu fruto é uma baga globosa, de formato redondo ou achatado, com casca delgada e coloração amarelo-canário quando madura. Sua polpa é suculenta, pouco fibrosa, e bastante ácida, de coloração amarelo-clara, possuindo de 4 a 10 sementes oblongas de 0,5 a 1,0 cm de comprimento (SACRAMENTO; BARRETTO; FARIA, 2008).

Devido a intensa acidez, a polpa do araçá-boi não é adequada para o consumo *in natura*. Porém, esta possui aroma e sabor agradáveis, podendo ser consumida em forma de sucos, sorvetes, geleias, néctar, licores e outros (EMBRAPA, 1996; SOARES, 2009; ANDRADE et al., 1997).

Na medicina popular local, o araçá-boi é utilizado no tratamento de desordens intestinais e urinárias, além de também aliviar os sintomas do resfriado, indicando que os compostos bioativos presentes na planta podem ter potenciais benefícios para a saúde humana (FERNÁNDEZ-TRUJILLO et al., 2011).

A espécie *E. stipitata* é considerada uma boa fonte de compostos voláteis e, em relação à composição fitoquímica e às propriedades benéficas à saúde, é uma potencial produtora de constituintes polifenóis, carotenóides, vitamina C, açúcares solúveis e fibras (ARAUJO et al., 2019).

Entre as propriedades biológicas investigadas da espécie *E. stipitata*, pode-se destacar o potencial antimicrobiano do óleo essencial obtido a partir de suas folhas contra *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Listeria monocytogenes* sendo os principais componentes o alfa-pineno (14,1%), o beta-cariofileno (22,7%) e o óxido de cariofileno (15,4%) (MEDEIROS et al., 2003).

No estudo de Costa e colaboradores (2020), o OE de *E. stipitata* é indicado como uma fonte promissora de constituintes com efeitos antinociceptivo, anti-inflamatório e antipirético natural. Os compostos majoritários identificados foram guaiol (13,77%), trans-cariofileno (11,36%) e  $\beta$ -eudesmol (8,13%) e  $\gamma$ -eudesmol (6,55%).

#### **2.4.3 Considerações gerais sobre a espécie *Eugenia gracillima***

A murta (*Eugenia gracillima* Kiaersk.) é uma frutífera nativa da Chapada do Araripe, Pernambuco. Trata-se de um arbusto que varia em altura de 1,5 a 5,0 metros, propagado por sementes na qual cada fruta contém até duas delas com o embrião do tipo eugenóide. O seu fruto pode ser consumido *in natura* ou processado como polpa, sendo de grande valor socioeconômico para a região, porém a falta de conhecimento técnico impede a domesticação da espécie. O processamento da murta poderá contribuir com o desenvolvimento da cadeia produtiva local (LUCENA et al., 2015; ARAUJO et al., 2016).

O fruto de *E. gracillima* é caracterizado uma pseudobaga carnuda, elipsóide, de coloração vinho ou vermelho arroxeada ou negra, contendo várias sementes, com longo histórico de aplicação na perfumaria, nas indústrias de cosméticos e alimentos e na indústria

farmacêutica. Apresenta ações anti-hiperglicêmica, antissépticas e atividade anti-inflamatória na medicina. A semente contém ácidos graxos insaturados devido ao seu teor elevado de ácido linoleico (78,7%), o que melhora seu potencial como óleo comestível, que também é um importante constituinte do fruto e das folhas da murta, sendo um nutriente essencial na síntese de prostaglandinas e nos mecanismos de defesa e regeneração de tecidos. Por isso, laboratórios chilenos desenvolveram cosméticos com sucesso, com vários produtos de extratos essenciais obtidos das folhas de murta. A *E. gracillima* ainda possui uso ornamental pelas características de suas flores (VALDEBENITO et al., 2003).

Sabe-se que a *E. gracillima* apresenta potencial antioxidante por conter fenólicos totais, antocianinas e flavonoides (ARAUJO et al., 2016). Suas folhas são conhecidas pela presença de óleos essenciais e são utilizadas para diversas finalidades na culinária; seus óleos frescos e/ou folhas secas são usadas em cosméticos, molhos, confeitaria e bebidas (OZEK et al., 2000). Sampaio et al. (2019) estudaram o óleo essencial extraído das folhas de *Eugenia gracillima*, coletada no estado de Pernambuco, cujos componentes majoritários identificados foram germacreno D (16,10%),  $\gamma$ -muuroleno (15,60%), biciclogermacreno (8,53%), germacreno B (7,43%) e  $\Delta$  elemeno (6,06%), o qual inibiu as formas promastigotas de *Leishmania braziliensis* e *Leishmania infantum*. É possível observar na literatura que a espécie é pouco explorada quanto a suas propriedades farmacológicas, tornando-se necessário o incentivo na realização de estudos com a mesma.

## 2.5 CANDIDA

O gênero fúngico *Candida* são microrganismos inseridos no domínio Eukarya, fazendo parte do reino Fungi e do sub-reino Dikarya, pertencendo ao filo Ascomycota, a classe Saccharomycetes e a ordem Saccharomycetales (DIEZMANN et al., 2004). As leveduras desse gênero são consideradas o principal grupo de patógenos oportunistas, apresentando como fatores de patogenicidade e virulência a capacidade de se aderir a diferentes mucosas e epitélios, o dimorfismo produzindo estruturas filamentosas, a termotolerância significativa e a produção de enzimas como proteinases e fosfolipases (SIQUEIRA JR; SEM, 2004; TRABULSI; ALTERTHUM, 2015).

Até 1963, eram conhecidas apenas cinco espécies de *Candida* como causadoras de doenças em humanos, incluindo *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. stellatoidea* e *C. guilliermondii*. Contudo, estão incluídas nesse gênero mais de 350 espécies, sendo pouco mais de 20 associadas com o desenvolvimento de infecções em seres humanos, as chamadas

candidíases (WILLIAMS et al., 2011).

Dessa maneira, apesar de espécies de *Candida* fazerem parte da microbiota normal, as doenças causadas por esse gênero têm sido tratadas como um problema de saúde pública, uma vez que em algumas situações de ruptura no balanço normal da microbiota ou quando o sistema imune do hospedeiro encontra-se comprometido, as espécies do gênero *Candida* tendem a se manifestar de formas agressivas, tornando-se patogênicas (PFALLER; DIEKEMA, 2007; PAPON et al., 2013; PUIG-ASENSIO et al., 2015; KONATÉ et al., 2017; CHEN et al., 2019). Estudos comprovam que a candidíase acomete mais pacientes imunocomprometidos, visto que a baixa na imunidade, mesmo após tratamento, poderá apresentar recidivas (SHIOZAWA et al., 2018). Os pacientes imunocomprometidos possuem uma maior probabilidade de serem acometidos por infecções fúngicas, assim como os indivíduos portadores de leucemia, linfoma, diabetes mellitus e síndrome da imunodeficiência adquirida (LIMA et al., 2006).

As manifestações clínicas causadas pelo gênero *Candida* são variadas, podendo gerar uma infecção localizada de mucosas até uma doença disseminada potencialmente fatal. O principal fator que determina o tipo e extensão de infecção causada por *Candida* spp. é a resposta imunológica do paciente. Dessa forma, pacientes imunossuprimidos, principalmente os que apresentam neutropenia, a disseminação visceral da infecção é comum. As formas de manifestação da candidíase são basicamente de três tipos: mucocutânea, cutânea e sistêmica (BARBEDO; SGARBI, 2010).

Definir corretamente o diagnóstico de candidíase é um dos pontos de maior importância para o sucesso terapêutico. Ao exame clínico, na maioria das vezes, é possível fazer o diagnóstico da candidíase mucocutânea. A necessidade de cultura é pouco comum. Por meio da escarificação das lesões e aplicação de uma preparação hidróxido de potássio (KOH) ou coloração de Gram, pode-se confirmar o diagnóstico identificando-se leveduras em brotamento ou pseudo-hifas. Se a patologia for recorrente ou resistente ao tratamento prévio, deve-se pedir a cultura para identificar se o agente é uma espécie mais resistente, como *C. glabrata* ou *C. krusei* (BOATTO et al., 2007; ZIMMERMANN et al., 2009).

As peculiaridades apresentadas por diferentes espécies de *Candida*, do ponto de vista epidemiológico e terapêutico, justificam a necessidade de identificar-se as leveduras ao nível de espécie quando tais microrganismos estão associados a doenças sistêmicas. Este procedimento é fundamental para permitir a escolha da melhor abordagem terapêutica a ser instituída no paciente infectado. Em relação aos aspectos epidemiológicos, a identificação de leveduras ao nível de espécie é etapa fundamental para monitorização das taxas de infecção hospitalar, bem como para a identificação precoce de surtos de infecções por *Candida* spp.

(PFALLER et al., 2001; MELO et al., 2019).

Nos últimos anos, a incidência de candidemia tem aumentado em taxas significativas em hospitais terciários (MARRA et al. 2011; COSTA et al., 2014; MELO et al., 2019). Segundo o estudo de Caggiano e colaboradores (2015) em um hospital universitário italiano, os casos de candidemia apresentam incidência de 3.06/10000 admissões, sendo 44.2% causados por *C. albicans* e 55.8% causados por espécies não-albicans.

Para o tratamento dessa moléstia, os antifúngicos utilizados incluem as classes dos poliênicos, triazólicos e equinocandinas. Os poliênicos são fármacos fungicidas, representados pela anfotericina B, capazes de interagir com o ergosterol na membrana celular e gerar poros, causando a perda de conteúdo citoplasmático. Já os azóis possuem o mecanismo de ação de inibir a biossíntese do ergosterol, tornando-se assim uma droga fungicida e fungistática, tendo como principais representantes o fluconazol e o itraconazol. Os fármacos pertencentes à classe das equinocandinas têm como mecanismo de ação a inibição não competitiva da enzima  $\beta$ -1,3- glicano sintase, que catalisa a polimerização da glicose-uridina-difosfato em  $\beta$ -1,3-glicano, causando o extravasamento do material celular, sendo portanto fármacos fungicidas (SILVA et al., 2012; MATTHAIYOU; CHRISTODOULOPOULOU; DIMOLOPOULOS, 2015).

Entretanto, devido ao uso indiscriminado de antimicrobianos nos tratamentos de doenças infecciosas, houve um crescimento das resistências das leveduras do gênero *Candida* frente aos antifúngicos disponíveis no mercado. Isto faz com que haja necessidade de pesquisas em plantas e em outras substâncias na busca de atividades antifúngicas para diminuição de recidiva (ABÍLIO et al., 2014).

### **2.5.1 Óleos essenciais com potencial antifúngico**

Em relação à atividade antifúngica dos Oes, o de *Neolitsea parvigemma* fpo ativo frente às espécies *Aspergillus clavatus*, *Aspergillus niger*, *Chaetomium globosum*, *Cladosporium cladosporioides*, *Myrothecium verrucaria*, *Penicillium citrinum* e *Trichoderma viride*, sendo o  $\beta$ -eudesmol um dos compostos majoritários identificados considerado um dos responsáveis pela atividade observada (HO et al., 2011).

Em uma pesquisa realizada com o óleo essencial de *Eugenia caryophyllata*, o mesmo foi testado frente à espécie de *Candida albicans* e apresentou CIM de 0,50  $\mu$ g/mL, tendo como constituintes majoritários o eugenol,  $\beta$ -cariofileno e acetato de eugenil (RAHIMIFARD et al., 2015). Em outros estudos, o OE de *E. caryophyllata* foi capaz de inibir o crescimento de *C.*

*albicans*, *C. guilliermondii*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. utilis*, *C. valida*, *C. parapsilosis*, *C. dubliniensis* e *C. sake* (KOUIDHI; ZMANTAR; BAKHROUF, 2010). No estudo de Bazzaz et al. (2018) com nanopartículas lipídicas sólidas contendo o OE de *E. caryophyllata* a CIM frente a cepas de *C. albicans* foi de 0,25 µg/mL.

O OE de folhas *Psidium cattleianum*, coletadas em Pelotas, no Rio Grande do Sul, apresentou valores de CIM variando de 41,67 a 166,70 µg/mL para as espécies de *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. guilhermondii* e *C. lipolytica*. O principal composto encontrado foi isocariofileno (59,62%) (CASTRO et al., 2015).

No estudo de Macêdo et al. (2018), o OE das folhas de *Psidium salutare* coletadas na Chapada do Araripe, Ceará, em diferentes períodos sazonais, apresentou linalol, p-cimeno, terpinoleno,  $\gamma$ -terpineno e  $\tau$ -cadinol como compostos majoritários. A avaliação da atividade antifúngica revelou ação contra as cepas de *C. albicans*, *C. krusei* e *C. tropicalis* com um IC 50 variando de 345,5 a 2.754,2 µg/mL e um CFM superior a 1.024 µg/mL.

Waikedre e colaboradores (2012) avaliaram a atividade antifúngica e fitoquímica do OE de *Callitris neocaledonica*. O mesmo teve o  $\gamma$ -eudesmol como um dos seus constituintes majoritários e exibiu atividade antifúngica frente as espécies de *Trichophyton mentagrophytes*, *T. rubrum*, *Microsporum canis*, *M. gypseum*, *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*.

Lago e colaboradores (2011) realizaram uma pesquisa com o OE de *E. uniflora* que apresentou como compostos majoritários o  $\alpha$ -cadinol (19,15%), apiol (11,15%) e cubenol (5,43 %). A avaliação da atividade antifúngica revelou valores de CIM que variaram de 0,22 a 3,75 µg/mL contra as espécies *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. grubii* e *C. gattii*. Outro estudo realizado com o OE de *E. uniflora* demonstrou promissora atividade antifúngica, apresentando valores de CIM variando de 93,7 a 312,5 µg/mL frente as espécies de *C. albicans*, *C. globosa*, *C. guilhermondi*, *C. parapsilosis*, *C. lipolytica* e *C. laurentii*, em que os principais constituintes identificados foram os germacrenos A, B e D e o óxido de selina-1,3,7-(11)-trien-8-ona (VICTORIA et al., 2012).

Kim e colaboradores (2016) realizaram um estudo que evidenciou o mecanismo antifúngico do elemol e eudesmol, componentes do óleo essencial de *Cryptomeria japonica*, contra espécies de dermatófitos de *Trichophyton rubrum*. De acordo com este estudo, o elemol e o eudesmol aumentaram a permeabilidade e destruíram a parede celular. Devido esses fatores, os fungos não foram capazes de crescer adequadamente.

O OE de *Cardiopetalum calophyllum* Schltdl. (Annonaceae), apresentou o espatulenol como composto majoritário, considerado como um dos responsáveis pela promissora atividade

antifúngica frente ao fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (XAVIER et al., 2016).

Santos et al. (2018) conduziram um estudo para demonstrar a propriedade antifúngica do OE das folhas de *Eugenia uniflora* contra *C. albicans*, *C. krusei* e *C. tropicalis*. Na análise química, alguns compostos se destacam, são eles: selina-1,3,7(11)-trien-8-ona (36,37%) e epóxido de selina-1,3,7(11)-trien-8-ona (27,32%). Nos ensaios, o OE foi apenas capaz de reduzir o número de células fúngicas. Os resultados dessa pesquisa não mostraram efeitos de atividade antifúngica promissora. Entretanto, outros ensaios foram realizados para verificar o efeito do OE de *E. uniflora* sobre a morfologia das células. Nos testes, foi possível observar que o OE inibiu o crescimento das estruturas filamentosas de *C. albicans* em todas as concentrações e somente inibiu *C. tropicalis* na concentração mais alta. A combinação do OE com fluconazol resultou em interações de indiferença e antagonismo.

## 2.6 LEISHMANIA

A Leishmaniose é uma doença infecciosa causada pelo protozoário do gênero *Leishmania* e transmitida pelo flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis*, também conhecido por mosquito palha ou birigui (VIANNA, 2016). Segundo a World Health Organization (2010), a Leishmaniose é uma das seis doenças infecciosas mais importantes do mundo.

As infecções humanas por *Leishmania* podem apresentar-se, a depender da espécie, como quadros cutâneos localizados e destruição de membranas mucosas, tais como a leishmaniose cutânea e mucocutânea; ou doenças sistêmicas generalizadas com progressão fatal, como o caso da leishmaniose visceral ou calazar (SACKS; KAMHAWI, 2011).

Esta doença é classificada como uma Doença Tropical Negligenciada, constituindo um problema de saúde pública em mais de 90 países de 5 continentes. Os registros contabilizam cerca de 1.5 a 2 milhões de casos anuais, com cerca de 30.000 mortes por ano e 350 milhões de pessoas residindo em zonas de risco para a infecção (DASSONI et al., 2013; WHO, 2015; KAMHAWI, 2017).

Grandes quantidades de casos são registrados nas Américas, fato responsável pela criação do Plano de Ação de Leishmanioses nas Américas 2017-2022, desenvolvido pelos órgãos administrativos dos países endêmicos. O plano visa, por meio do fortalecimento das ações de controle, vigilância, diagnóstico, tratamento e reabilitação, alcançar até 2022 a redução da letalidade de ambos os tipos de leishmanioses, a diminuição dos casos de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) em crianças e a redução da incidência da LV (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE, 2018).

No Brasil, nas últimas três décadas, a LV passou por um processo de urbanização em diversas regiões, sendo considerada endêmica nos grandes centros urbanos das macrorregiões do país. Inclusive presente em diversos estados da região Nordeste, principalmente Pernambuco e Bahia, que desde a década de 1990 sofrem mudanças no perfil epidemiológico da doença com disseminação dos casos em todas as microrregiões (GONTIJO; MELO, 2004; MAIA-ELKHOURY et al., 2008; DINIZ et al., 2018).

Uma problemática das infecções por *Leishmania* é a ausência de drogas totalmente seguras e eficazes para o tratamento. A terapia ainda é baseada no uso de drogas pentavalentes antimoniais desenvolvidas no século passado, que são tóxicas e propensas à resistência, enquanto outros medicamentos, como a anfotericina B e a pentamidina, também apresentam efeitos colaterais. A aprovação da miltefosina, pioneira no tratamento oral de leishmaniose, trouxe muitas expectativas, mas ainda faz-se necessário novas pesquisas que possibilitem uma terapêutica mais eficaz. Devido às diversas formas clínicas da doença, ao surgimento de espécies resistentes, aos longos períodos de administração e a alta toxicidade, os benefícios do tratamento são bastante limitados (SUNDAR; RAI, 2002; SINGH; SIVAKUMAR, 2004; SUNDAR; GOYAL, 2007; IGBINWEKA et al., 2012; SILVA et al., 2018).

O fato do arsenal terapêutico ser insatisfatório e o desenvolvimento de algumas espécies resistentes a esses produtos, têm levado às pesquisas com novos agentes terapêuticos (DORLO et al., 2014). Assim, com o alto custo e a problemática da farmacoterapia convencional, há uma busca incessante para o desenvolvimento de uma vacina (REITHINGER et al., 2007; DIDWANIA et al., 2017; GHORBANI; FARHOUDI, 2018).

### **2.6.1 Óleos essenciais com potencial leishmanicida**

No estudo de Sampaio e colaboradores (2019), o OE das folhas de *Eugenia gracilima* apresentou atividade leishmanicida promissora frente as formas promastigotas de *Leishmania braziliensis* e *Leishmania infantum*. Na análise química, foram identificados como componentes majoritários o germacreno D (16,10%),  $\gamma$ -muuroleno (15,60%), biciclogermacreno (8,53%), germacreno B (7,43%) e  $\Delta$  elemeno (6,06%).

O OE das folhas de *Psidium salutare* Cambess., coletadas em Alegrete, no Rio Grande do Sul, verificou-se uma moderada ação na viabilidade de formas promastigotas de *L. amazonensis*, com CI<sub>50</sub> de  $69.71 \pm 2.30 \mu\text{g/mL}$  (KAUFFMANN et al., 2016). Em outro estudo, o OE de folhas de *Cymbopogon citratus* e o seu constituinte majoritário, citral,

apresentaram promissora atividade frente as formas promastigotas de *L. amazonenses*. A concentração inibitória capaz de reduzir 50% das células viáveis foi de 1,7 e 8,0 µg/ml para o OE e o citral, respectivamente (SANTIN et al., 2009).

Kauffmann et al. (2017) estudaram a espécie *Eugenia pitanga*, os mesmos verificaram atividade frente às formas promastigotas de *Leishmania amazonenses*. No estudo, o OE das folhas da planta apresentou alta concentração de sesquiterpenos oxigenados, cujos constituintes majoritários identificados foram o espatulenol, globulol e (2E,6E) farnesoato de metila.

O OE de *Chenopodium ambrosioides* foi testado frente as espécies de *Leishmania amazonenses*, observando-se uma ação inibitória potente contra as formas promastigota e amastigota, com valores de dose efetivos de 50% de 3,7 e 4,6 µg/ml, respectivamente (MONZOTE et al., 2006).

## 2.7 TRYPANOSOMA CRUZI

A doença de Chagas (DC) é uma enfermidade negligenciada e endêmica em aproximadamente 21 países causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*. A infecção por *T. cruzi* pode ser transmitida por um vetor invertebrado, os triatomíneos, conhecidos no Brasil como barbeiros, cuja principal espécie é o *Triatoma infestans*. A transmissão também pode ocorrer via oral, por ingestão de alimentos contaminados, tais como os frutos do açaí e da bacaba, e carnes de animais silvestres. Essa doença afeta de 6 a 7 milhões de pessoas, enquanto aproximadamente 90 milhões continuam expostas ao risco de serem infectadas (ARAÚJO-JORGE; CASTRO, 2000; SILVEIRA, 2000; WHO, 2008; PEREIRA et al., 2009; NOBREGA et al., 2009; ANDRADE; GOLLOB; DUTRA, 2014; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

O *Trypanosoma cruzi* possui ciclo de vida complexo que requer passagem obrigatória por um hospedeiro invertebrado, o inseto vetor triatomíneo, e um hospedeiro vertebrado (BONNEY; ENGMAN, 2010). Durante seu ciclo de vida, o parasita apresenta basicamente três formas evolutivas: 1- epimastigota, forma replicativa não infectante, presente no intestino superior do inseto; 2- tripomastigota, forma não replicativa infectante, presente na porção posterior do intestino do inseto; 3- amastigota, forma replicativa intracelular. As formas são classificadas e diferenciadas a partir da posição do cinetoplasto em relação ao núcleo, flagelo e morfologia (FERRAZ et al., 2007; ABE et al., 2012; ROMERO; MORILLA, 2010).

A DC pode-se apresentar de duas formas clínicas: aguda e crônica. Na fase aguda, não há sintomas clínicos específicos o que, por sua vez, retarda o diagnóstico e, conseqüentemente, o tratamento, tornando-se, assim, um problema de saúde pública. A ausência de sintomas, em

alguns casos, pode levar a uma progressão para a forma crônica indeterminada da doença ou posteriormente progredir para a forma digestiva, cardíaca ou mista. (RASSI JR; RASSI; MARIN-NETO, 2010; PINTO et al., 2013; SOUZA-LIMA et al., 2013; ANDRADE; GOLLOB; DUTRA, 2014).

O Nifurtimox (Nf) e benznidazol (Bz) são os medicamentos disponíveis para o tratamento de pacientes infectados com *T. cruzi*. Entretanto, devido à sua conhecida toxicidade e efeito limitado para diferentes isolados de parasitas e fases da doença, a produção de novos fármacos é urgentemente necessária (DUSCHAK; COUTO, 2007; MCKERROW et al., 2009; URBINA, 2019; SOEIRO et al., 2019).

### 2.7.1 Óleos essenciais com potencial tripanosida

Carneiro et al. (2017) em seus estudos com o OE das flores frescas de *E. klotzschiana* verificaram a atividade frente às formas tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi*, apresentando boa atividade tripanocida em comparação com o controle positivo, o benznidazol. Na análise química o OE apresentou os seguintes componentes como majoritários: sesquiterpenos:  $\beta$ -cariofileno (21,1%), espatulenol (20,9%) e biciclogermacreno (10,2%).

O OE de folhas de *Alpinia speciosa* (Zingiberaceae), cujo componentes majoritários são 1,8-cineole (28,46%), camphor (17,10%) e sabinense (9,95%), apresentou atividade antiparasitária clinicamente relevante frente as espécies de *Trypanosoma cruzi* (LC<sub>50</sub> = 67,18  $\mu$ g/mL), uma vez que verificou-se ação abaixo de 500  $\mu$ g/mL (PEREIRA et al., 2018). Em outro estudo, Escobar e colaboradores (2010) verificaram a atividade tripanocida de Oes de diferentes espécies do gênero *Lippia*. O OE de folhas de *Lippia alba* exibiu maior atividade sobre *T. cruzi* (CI<sub>50</sub> = 5,5  $\mu$ g/ml em epimastigotas; CI<sub>50</sub> = 12,2  $\mu$ g/ml em amastigotas intracelulares; IS = 2,5). O Timol e S-carvona, dois dos componentes majoritários destes Oes, tiveram eficácia clinicamente relevante frente as formas amastigotas intracelulares de *T. cruzi*.

No estudo realizado com o OE obtido de folhas de *Eugenia brejoensis*, foi observado que o mesmo é constituído majoritariamente por sesquiterpenos (94,51%), na qual os componentes majoritários são  $\delta$ -cadineno (15,88%), trans-cariofileno (9,77%) e  $\alpha$ -muurolol (9,42%). Nessa mesma pesquisa estudaram o potencial tripanocida e os resultados obtidos indicam que OE de *E. brejoensis* é capaz de inibir as formas epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas de *Trypanosoma cruzi* (SOUZA et al., 2017).

De acordo com Rojas, Palacios e Ronceros (2012), o OE de *Aloysia triphylla* (cedrina) pode ser um promissor agente tripanocida, pois foi constatado nesse estudo que o OE causa

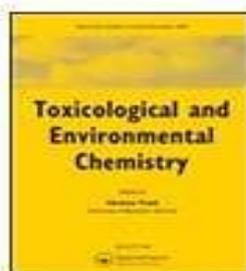
uma redução de 85,4% da parasitemia em camundongos infectados com *T. cruzi* após serem tratados com uma dose de 250 mg/kg do OE de *A triphylla*.

### 3 RESULTADOS

Os resultados dessa pesquisa são apresentados em formato de artigos.

#### 3.1 ARTIGO 1 – CHEMICAL COMPOSITION, ANTIOXIDANT, ANTIBACTERIAL, ANTIPROTOZOAL AND CYTOTOXIC ACTIVITIES OF *Eugenia stipitata* MCVAUGH LEAVES ESSENTIAL OIL.

Artigo submetido para publicação ao periódico: *Toxicological & Environmental Chemistry*.



#### Chemical composition, antioxidant, antibacterial, antiprotozoal and cytotoxic activities of *Eugenia stipitata* Mcvaugh leaves essential oil

Journal:	<i>Toxicological &amp; Environmental Chemistry</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	dos Santos, Cicero ; Universidade Federal de Pernambuco, BIOCHEMISTRY Vidal Sampaio, Mariana ; Universidade Federal de Pernambuco, BIOCHEMISTRY Sombra Vandesmet, Lilian ; Universidade Federal de Pernambuco, BIOCHEMISTRY SOUZA DOS SANTOS, BRUNO; Universidade Federal de Pernambuco, BIOCHEMISTRY de Menezes, Saulo ; Catholic University Center of Quixadá Machado Bortola, Benedita ; Catholic University Center of Quixadá Rodrigues Gomes, Douglas ; Catholic University Center of Quixadá dos Santos Correia, Maria ; Universidade Federal de Pernambuco, BIOCHEMISTRY vega, celeste; Fundación Moisés Bertoni de Alencar Menezes, Irwin ; Regional University of Carri, Pharmacology and Medicinal Chemistry da Silva, Marcia; Universidade Federal de Pernambuco, BIOCHEMISTRY
Keywords:	volatile oil, brazilian plant, Myrtaceae, Eugenia

1  
2  
3 **Chemical composition, antioxidant, antibacterial, antiprotozoal and cytotoxic**  
4 **activities of *Eugenia stipitata* Mcvaugh leaves essential oil**  
5  
6  
7

8 **Cicero Ramon Bezerra dos Santos<sup>1</sup>, Mariana Gomes Vidal Sampaio<sup>1</sup>, Lilian Cortez**  
9 **Sombra Vandemet<sup>1</sup>, Bruno Souza dos Santos<sup>1\*</sup>, Saulo Almeida de Menezes<sup>2</sup>,**  
10 **Benedito Yago Machado Portela<sup>2</sup>, Douglas Willyam Rodrigues Gomes<sup>2</sup>, Maria**  
11 **Tereza dos Santos Correia<sup>1</sup>, Maria Celeste Veja Gomez<sup>3</sup>, Irwin Rose de Alencar**  
12 **Menezes<sup>4</sup>, Márcia Vanusa da Silva<sup>1</sup>**  
13  
14  
15  
16  
17  
18

19  
20 <sup>1</sup> Biochemistry Department, Biocience Center, Federal University of Pernambuco – UFPE, Recife,  
21 Pernambuco, Brazil.  
22  
23

24  
25 <sup>2</sup> Catholic University Center of Quixadá, Quixadá, Ceará, Brazil.  
26  
27

28 <sup>3</sup> Centre for the Development of Scientific Investigation - CEDIC, Fundación Moisés Bertoni  
29 /Laboratorios Diaz Gill, Asuncion, Paraguay.  
30  
31

32 <sup>4</sup> Pharmacology and Medicinal Chemistry, Regional University of Cariri, Crato, Ceara, Brazil.  
33  
34  
35  
36

37 <sup>\*</sup>Corresponding Author: Bruno Souza dos Santos. Biochemistry Departament, Biocience Center.  
38 Federal University of Pernambuco – UFPE, Recife (PE), Brazil. Address: Av. Prof. Moraes Rego,  
39 1235, Cidade Universitária, CEP: 50.670-901. Phone: +55 (81) 2126.8540  
40  
41  
42

43  
44 E-mail: souza.farmacia@hotmail.com  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## ABSTRACT

The essential oils (EOs) of plants used in traditional medicine are known as a rich source of chemically different compounds with different biological activities. In this study, the volatile composition, cytotoxic, antibacterial, antioxidant and antiprotozoal activities of the essential oil obtained from leaves of *Eugenia stipitata* Mcvaugh (Myrtaceae) (ESEO) grown in Brazilian Northeast area (Araripe, Brazil) were investigated. The volatile compounds of ESEO were analyzed by gas chromatography and its chemical composition is mainly composed of oxygenated sesquiterpenes (56.77%), sesquiterpene hydrocarbons (34.33%), oxygenated monoterpenes (8.13%) and monoterpenes hydrocarbons (0.41%). The most abundant volatile constituents of the ESEO were  $\beta$ -eudesmol (15.28%),  $\gamma$ -eudesmol (10.85%), elemol (10.21%), caryophyllene oxide (6.65%), clovene (6.94%) and spathulenol (6.14%). ESEO was highly selective to *Leishmania braziliensis* and *Leishmania infantum* promastigotes with selective indexes of 13.58 and 9.35, respectively. ESEO did not inhibit *Trypanosoma cruzi*. The ESEO exhibited good antibacterial activity with MIC value ranged from 128  $\mu\text{g/mL}$  to  $>1024 \mu\text{g/mL}$  and MBC value ranged from 256  $\mu\text{g/mL}$  to  $>1024 \mu\text{g/mL}$ . ESEO showed low activity of free-radical scavenging for DPPH and ABTS assays. These data suggest that the *E. stipitata* essential oil is a relevant source of lead compounds for development of antibacterial and antiprotozoal drugs.

Keywords: volatile oil; brazilian plant; antiprotozoal; Myrtaceae; *Eugenia stipitata*; *Leishmania* spp.

## 1. INTRODUCTION

Traditional plant medicine always occupies an important place in health treatments for the general population, primarily in developing countries like Brazil (Nikolić et al., 2013). In recent years, there has also been a revival of traditional natural products in medicine and the preservation of food and cosmetics. Despite the development of antibiotics, infections caused by bacteria, fungi and protozoa are still a major public health problem, and the presence of countless drug-resistant strains or the toxicity of drugs represents a new challenge. According to the World Health Organization (WHO), Chagas disease (American trypanosomiasis) and leishmaniasis are illnesses that have been included in the list of neglected tropical diseases and they are associated with high morbidity and mortality. These infections to the vector-borne diseases affecting 20 million people and killing more than 50,000 every year and are caused by parasites of the kinetoplastida family (*Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* spp.) (Nocentini et al., 2019).

Recently, there has been a growing interest in natural products, like essential oils, due to their availability, less side effects or toxicity, in addition to better biodegradability, compared to available antibiotics and preservatives. Essential oils (EO) are composed mainly of monoterpenes, sesquiterpenes, isothiocyanates and phenylpropanoids. They are a complex mixture of compounds arising from plants secondary metabolism, which serve as a protective mechanism, acting as antimicrobial, antiviral and antifungal agents (Bakalli et al., 2008; Sharifi-Rad et al., 2017). Furthermore, their use has been shown to be safe, with few side effects and low toxicity to mammalian cells (Bakkali et al., 2008; Dubey et al., 2010; Santoro et al., 2007).

The genus *Eugenia* is well represented in the various phytogeographic domains in world wide and is considered the fourth most important genus of the family Myrtaceae for the production of essential oils after the *Eucalyptus*, *Melaleuca*, and *Psidium* genera

1  
2  
3 (De souza et al., 2018). Essential oils from *Eugenia* species comprise approximately 300  
4  
5 compounds that have been previously identified, with cyclic sesquiterpenes  
6  
7 predominating and monoterpenes found in smaller quantities (De souza et al., 2018).  
8  
9 *Eugenia stipitata* McVaugh, popularly known as araçá-boi, is used in folk medicine in  
10  
11 the treatment of intestinal and urinary disorders, in addition to relieving the symptoms of  
12  
13 cold, which indicates that the bioactive compounds present in the plant may have potential  
14  
15 benefits for human health (Yahia, 2011).  
16  
17

18  
19 This study aimed to investigate the antibacterial, antiprotozoal and antioxidant  
20  
21 activities and *in vitro* cytotoxicity, as well as to identify the chemical volatile components  
22  
23 present in the essential oil obtained from the leaves of *E. stipitata*.  
24  
25

## 26 27 **2. MATERIALS AND METHODS**

### 28 29 **2.1 Plant material**

30  
31 The leaves of *E. stipitata* were collected in the area of native vegetation, located in  
32  
33 Serra dos Paus Dóias in Chapada do Araripe (Exu, Pernambuco; latitude 7° 21"S,  
34  
35 longitude 39° 53" W and altitude 884m), between July and August 2017, under  
36  
37 authorization of the responsible authority Instituto Chico Mendes de Conservação da  
38  
39 Biodiversidade (ICMBio) using the license SISBIO 59070. The plant material was  
40  
41 identified by Dr. Maria Arlene Pessoa da Silva from the Laboratory of Microbiology and  
42  
43 Molecular Biology of the Regional University of Cariri (URCA). The voucher  
44  
45 (registration number: 13.054) was deposited in the URCA Herbarium (Herbário  
46  
47 Cariense Dárdano de Andrade Lima; HCDAL).  
48  
49

### 50 51 **2.2 Sample preparation and chemical characterization of *E. stipitata* essential oil**

52  
53 The essential oil from the fresh leaves of *E. stipitata* (ESEO) was obtained by  
54  
55 hydrodistillation method in a Clevenger-type apparatus. Afterwards, the water/oil mixture  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 obtained was separated, and ESEO was treated with anhydrous sodium sulfate, filtered,  
4 and kept under refrigeration until the time of analysis. The ESEO was filtered, weighed  
5 and stored in a dark at 4° C until use. The ESEO was analysed by gas chromatography  
6 and stored in a dark at 4° C until use. The ESEO was analysed by gas chromatography  
7 coupled to Shimadzu GCMS-QP2010 mass spectrometry (CG-MS) using Rtx®-5MS  
8 capillary column (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm). The electron ionization mode was used at  
9 70 eV. and helium (99.999%) was employed as the carrier gas (1 mL/min). The following  
10 temperature program was used: 100 °C (3 min) at 310 °C (3.5 °C/min). The identification  
11 of the individual volatile components was carried out by comparison with values of  
12 retention indices, obtained by co-injection of oil samples and a set of C<sub>7</sub>-C<sub>30</sub> linear  
13 hydrocarbons, and the MS data acquired for each volatile component were matched with  
14 the data available in the mass spectral library - MassFinder 4 (Dr. Hochmuth scientific  
15 consulting, Hamburg, Germany); NIST08 Mass Spectral Library (ChemSW Inc.  
16 Fairfield, CA, USA); Wiley Registry™ of Mass Spectral Data 9th Edition (Wiley,  
17 Hoboken, NJ, USA) and with other published mass spectral data (Adams, 2007).

18  
19  
20 For the quantitative analysis, a Shimadzu GC2010 Plus gas chromatograph  
21 equipped with a FID detector, with the same column and operating conditions above  
22 described were used. The percentage volatile composition was performed by the  
23 normalization method from the GC peak areas, in relation to the combined area of all  
24 peaks. All analyses were carried out in triplicate.

### 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 *2.3 Antiprotozoal activity*

#### 52 53 54 55 56 57 58 59 60 *2.3.1 Cell culture*

Tests with *T. cruzi* were performed using clone CL-B5 (Buckner et al., 1996) carrying *Escherichia coli* β-galactosidase (*lacZ*) gene, kindly supplied by Dr. F. Buckner

1  
2  
3 through the Gorgas Memorial Institute (Panama). The epimastigote forms were cultured  
4  
5 at 28 °C in tryptose broth for liver infusion (Difco, Detroit, MI) supplemented with 10%  
6  
7 Fetal Bovine Serum (FBS) (Gibco, Carlsbad, CA), penicillin (Ern, SA, Barcelona, Spain)  
8  
9 and streptomycin. Cells were collected for testing in the exponential growth phase.  
10  
11 Cultures of *Leishmania braziliensis* (MHOM/CO/88/UA301) and *L. infantum*  
12  
13 (MHOM/ES/92/BCN83) were obtained from the Institute of Health Sciences Research  
14  
15 (Paraguay). The strains were grown at 22 °C in Schneider's Drosophila medium  
16  
17 supplemented with 20% FBS. The cytotoxicity assays were performed using NCTC-929  
18  
19 murine fibroblasts obtained from the National Collection of Culture Types. The cells were  
20  
21 cultured in Minimum Essential Medium supplemented with FBS (10%), penicillin G (100  
22  
23 U/ml) and streptomycin (100 mg/ml). The cultures were maintained at 37 °C in a  
24  
25 humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>.  
26  
27  
28  
29  
30

### 31 2.3.2 Reagents

32  
33 Resazurin sodium was obtained from Sigma-Aldrich (St Louis, MO) and stored at  
34  
35 4°C away from light. Resazurin solution was prepared with 1% phosphate buffer, pH 7  
36  
37 and sterilized by filtration before use. Chlorophenol red-β-D galactopyranoside (CPRG;  
38  
39 Roche, Indianapolis, IN) was dissolved in a 0.9% Triton X-100 (pH 7.4) solution.  
40  
41 Penicillin G (Ern, S.A., Barcelona, Spain), streptomycin (Reig Jofré S.A., Barcelona,  
42  
43 Spain) and dimethyl sulfoxide (DMSO) were also used. The red-β-D-galactopyranoside  
44  
45 chlorophenol (CPRG, Roche, Indianapolis, IN) was dissolved in a solution of Triton X-  
46  
47 100 0.9% (pH 7.4). Penicillin G (Ern, SA, Barcelona, Spain), streptomycin (Reig Jofré  
48  
49 SA, Barcelona, Spain) and Dimethyl sulfoxide (DMSO) were also used.  
50  
51  
52  
53  
54

### 55 2.3.3 Trypanocidal activity

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

The screening assay was performed in 96-well microplates with cultures that had not reached the stationary phase (Vega et al., 2005). Briefly, epimastigotes were seeded at 10–5 mL in 200 mL of liver tryptose broth medium. The plates were then incubated with the drugs (0.1–50 mg/mL) at 28 °C for 72 h, and 50 mL of CPRG solution was added to give a final concentration of 200 mM. The plates were incubated at 37 °C for an additional 6 h and were then read at 595 nm. Each experiment was performed three-times and independently, each concentration was tested in triplicate in each experiment. The efficacy of each compound was estimated by calculating the anti-epimastigotes and the result was expressed in percent inhibition.

#### 2.3.4 Leishmanicidal activity

Promastigote forms ( $2.5 \times 10^5$  parasites/well) were treated with ESEO (15.75 µg/mL to 1000 µg/mL). ESEO was dissolved in Dimethyl sulfoxide (DMSO) used in atoxic concentration. After incubation of 48h at 26 °C, resazurin solution (20 µl) was added and the absorbance was determined at 595nm. Miltefosine that was used as a positive control.

#### 2.4 Antibacterial activity

Six bacterial strains including three Gram-positive (*Staphylococcus aureus* ATCC 29312, *Staphylococcus epidermidis* UFPEDA183 and *Bacillus subtilis* UFPEDA086) and three Gram-negative bacteria (*Klebsiella pneumoniae* UFPEDA396, *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA416 and *Escherichia coli* UFPADA224) were provided by Microbial Culture Collection of Departament of Antibiotics from Universidade Federal de Pernambuco (UFPEDA). Fresh culture of each bacterial strain tested was prepared through 16 h incubation at 37°C on nutrient agar and adjusted to approximately  $10^6$

1  
2  
3 CFU/mL with sterile saline (0.9%). The ESEO were dissolved separately in methanol as  
4  
5 co-solvent and added in Mueller-Hinton broth (MHB).  
6  
7

8  
9 Serial dilutions of MHB add ESEO were made in 96-well cell culture microplates  
10  
11 to obtain concentrations ranging from 1024 to 16 µg/mL. Following that, in each well  
12  
13 20 µL of bacterial suspension was inoculated ( $10^6$  CFU/mL). For negative control, MHB  
14  
15 (without ESEO) was used to prove the sterility of culture media and tested bacterial strain  
16  
17 were inoculated separately in the culture media as positive control of bacterial growth.  
18  
19 Commercially available antibiotics (ampicillin and oxacillin) were used as positive  
20  
21 control for bacteria. All samples were repeated three times to confirm the obtained results.  
22  
23

24  
25 The microplates were incubated at 37°C for 24 h for bacteria. The bacterial growth  
26  
27 was assessed with colorimetric method indicator of cell viability by adding 15 µL of  
28  
29 resazurin (0.01% w/v) and subsequent incubation at 37°C for 3 h. The minimum  
30  
31 inhibitory concentration (MIC) was considered as lowest concentration of ESEO that  
32  
33 inhibited bacterial growth (change in color of resazurin from blue to pink indicates the  
34  
35 growth of bacteria). The minimum bactericidal concentration (MBC) was considered the  
36  
37 lowest concentration that totally prevented bacterial growth further assessed by re-  
38  
39 culturing the contents of wells without color change into Mueller-Hinton agar plates at  
40  
41 37°C for 24 h.  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49

### 50 *2.5 Cytotoxicity test*

51

52  
53 NCTC929 fibroblasts were placed in 96-well flat-bottom microdilution plates at a  
54  
55 final concentration of  $3 \times 10^4$  cells/well. The cells were grown at 37 °C in an atmosphere  
56  
57 of 5% CO<sub>2</sub>. After that, the culture medium was removed and the compounds were added  
58  
59 to 200 µL, and performed a new culture for 24 h. After this incubation, 20 µL of a 2 mM  
60

1  
2  
3 solution of resazurin was added to each well. The plates were incubated for 3 h and the  
4 reduction of resazurin was measured at 490 and 595 nm against blank control. The  
5 toxicity to the fibroblast cell and the activity against the protozoan were compared by  
6 using the selectivity index (SI) ratio (LC50 for NCTC-929 cells/LC50 for protozoan).  
7  
8  
9

### 10 11 12 13 *2.6 Antioxidant activity*

14  
15 The antioxidant activity of ESEO was measured using the DPPH and ABTS assays.  
16 The DPPH radical scavenging activity was measured using the procedure described by  
17 Brand-Williams (1995). Briefly, an aliquot of 40  $\mu\text{L}$  of different sample concentrations  
18 (or BHT/ascorbic acid solutions) was mixed with 250  $\mu\text{L}$  of DPPH solution (0.05 mg/mL  
19 – adjusted to 0.7 absorbance at 517 nm) in 96-well microplate and homogenized. The  
20 mixture was allowed to react in the dark for 30 min at room temperature (37°C). Then the  
21 absorbance at 517 nm was measured using a microplate reader. BHT and ascorbic acid  
22 were used as the standard reference compounds. The results were expressed as  $\text{IC}_{50}$  value  
23 (the amount of sample necessary to decrease the absorbance of DPPH by 50%) calculated  
24 by linear regression analysis.  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38

39 The ABTS scavenging assay was measured according procedure described by Re  
40 (1999). Briefly, an aliquot of 5 mL of stock ABTS solution (7 mM) was reacted with 88  
41  $\mu\text{L}$  of potassium persulfate solution (140 mM) and kept in dark at room temperature for  
42 16 h before use. The ABTS solution was diluted in phosphate buffer saline (PBS) and  
43 adjusted 0.70 absorbance at 734 nm. Then, 150  $\mu\text{L}$  of ABTS solution and 50  $\mu\text{L}$  of  
44 different sample concentrations (or BHT/ascorbic acid solutions) were added in 96-well  
45 microplate and incubated at room temperature for 2 h. The absorbance was measured at  
46 734 nm. The results were expressed as  $\text{IC}_{50}$  value (the amount of sample necessary to  
47 decrease the absorbance of ABTS by 50%) calculated by linear regression analysis. All  
48 experiments were repeated at least three times.  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

### 2.7 Statistical analysis

All assays were carried out in three biological and technical replicates. The results were expressed as mean values  $\pm$  standard deviation. The median lethal concentrations ( $LC_{50}$ ) values of ESEO were calculated by linear regression analysis. The data were analyzed by GraphPad Prism 7.0 program (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

## 3. RESULTS

The fresh leaves of *E. stipitata* provided oil yield of 0.13%. Table 1 presents the chemical composition of the ESEO analyzed by GC/MS and 39 compounds were identified, corresponding to 100% of the total oil, which is composed oxygenated sesquiterpenes (56.77%), sesquiterpene hydrocarbons (34.33%), oxygenated monoterpenes (8.13%) and monoterpenes hydrocarbons (0.41%). The most abundant volatile constituents of the ESEO were  $\beta$ -eudesmol (15.28%),  $\gamma$ -eudesmol (10.85%), elemol (10.21%), caryophyllene oxide (6.65%), clovene (6.94%) and spathulenol (6.14%).

The *in vitro* antiprotozoal activity of the ESEO is summarized in Table 2. ESEO were able to inhibit *L. braziliensis* and *L. infantum* promastigote forms growth ( $IC_{50}$  37.65 $\pm$ 1.25 and 54.71 $\pm$ 2.26, respectively). The  $LC_{50}$  on NCTC929 fibroblast was 511.5 $\pm$ 24.32  $\mu$ g/mL, showing that *E. stipitata* essential oil was more toxic to the parasites than the fibroblast cells (Table 2). In this sense, ESEO was highly selective to *L. braziliensis* and *L. infantum* promastigotes with SI values of 13.58 and 9.35, respectively. However, ESEO was not active against *T. cruzi* epimastigote.

The MIC and MBC values of antibacterial activity of ESEO are shown in Table. The ESEO exhibited good antibacterial activity with MIC value ranged from 128  $\mu$ g/mL to >1024  $\mu$ g/mL and MBC value ranged from 256  $\mu$ g/mL to >1024  $\mu$ g/mL. The ESEO

1  
2  
3 possessed a best antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* ATCC 29312 and  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
possessed a best antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* ATCC 29312 and  
*Staphylococcus epidermidis* UFPEDA183 evidenced by the low MIC value. MBC/MIC  
ratio of 2 was detected in most of the isolates including *Staphylococcus aureus* ATCC  
29312, *Staphylococcus epidermidis* UFPEDA183 and *Bacillus subtilis* UFPEDA086.  
Therefore, ESEO is considered bactericidal agent (Hossain et al., 2017).

Free radical scavenging activity of ESEO in both DPPH and ABTS assays was  
concentration-dependent, with tested maximum antioxidant potential (at 100 mg/mL) of  
59.01% and 61.53% and IC<sub>50</sub> value of 79.31 mg/mL and 69.86 mg/mL, respectively.  
This value of IC<sub>50</sub> was considered statistically different from the value found  
for the antioxidant BHT and ascorbic acid (Table ).

#### 4. DISCUSSION

To explore a new natural source of bioactive essential oils, this study focuses on  
the evaluation of chemical composition, antiprotozoa, antibacterial and antioxidant  
activities of *E. stipitata* essential oil. Previous study has shown the analysis of chemical  
composition performed by GC/MS of essential oil of *E. stipitata* leaves, collected in São  
Miguel Island, in Portugal, with major components of the oil were monoterpenes and  
sesquiterpenes, as  $\alpha$ -pinene (14.1%),  $\beta$ -caryophyllene (22.7%), caryophyllene oxide  
(15.4%) (Medeiros et al., 2003). In another study, the analysis of the essential oil from *E.*  
*stipitata* leaves of the city of Macas, in Ecuador, revealed the presence of 30 compounds,  
of which  $\gamma$ -muurolene, E-caryophyllene and  $\delta$ -cadinene were the majoritarian (Ronquillo,  
Cristina and Chicaiza Galarza, 2016).

The mentioned EOs chemical analysis showed distinct chemical elements or the  
same element in different concentrations of those observed in the present study.  
According to Douglas et al. (2004), variations in the EO chemical composition of the

1  
2  
3 same species from distinct regions can be attributed to differences in the climatic and  
4  
5 geographical parameters, such as temperature, altitude, wind direction, rainfall, soil type.  
6  
7

8  
9 The chemical analysis of volatile compounds from the fruit of *E. stipitata*  
10 collected in the city of Manaus, was characterized by the presence of complex  
11 sesquiterpenes and the main majoritarian elements were germacrene D (37.65%),  $\beta$ -  
12 pinene (12.2%) and  $\alpha$ -pinene (10.4%) (Franco and Shibamoto, 2000).  
13  
14  
15  
16  
17

18 The synergism of the main chemical EO constituents or the presence of other  
19 constituents which may also be active at even lower concentrations is an important factor  
20 that can lead to good performance of biological activity as antiparasitic action (Melo et  
21 al., 2011). The biological activity of ESEO in this study is probably due to the presence  
22 of sesquiterpenes, whose biological activities are already well known (Sauter et al., 2011).  
23 The  $\beta$ -caryophyllene (sesquiterpenic hydrocarbon) and the nerolidol (oxygenated  
24 sesquiterpene) are examples of terpenic substances with well characterized anti-  
25 Leishmania activity, possibly related to the inhibition of the biosynthesis of isoprenoid  
26 cells (Arruda et al., 2005; Santos et al., 2008).  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38

39  
40  $\beta$ -eudesmol and  $\gamma$ -eudesmol were the majoritarian EO elements of *Guaterttia*  
41 *friesiana*, plant with antiprotozoal activity against *Plasmodium falciparum* (IC<sub>50</sub> 0.53  
42  $\mu$ g/mL) and different forms of *T. cruzi* (IC<sub>50</sub> 10.7 to 11.9  $\mu$ g/mL) (Meira et al., 2016).  
43  
44 The EO of *Alpinia zerumbet* had antiparasitic activity and presents caryophyllene oxide  
45 and  $\beta$ -eudesmol (Mendiola et al., 2015). Caryophyllene oxide was also isolated in  
46  
47 different species of *Lippia spp.*, known by the relevant antiparasitic activity (Escobar et  
48 al., 2010). It has been demonstrated that the EO lipophilic components can affect layers  
49 of polysaccharides, fatty acids and phospholipids in plasma membranes of promastigotes  
50 forms of *Leishmania spp.*, inducing cell lysis and the release of macromolecules (Di  
51 Pasqua et al., 2007). In the cytoplasm, these substances can break down specific  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

metabolic pathways of lipids and proteins or stimulate the mitochondrial membrane depolarization, leading to cell necrosis or apoptosis (Armstrong, 2006; Tariku et al., 2010).

Leishmaniasis is classified in cutaneous, subcutaneous and visceral forms, affecting 12 million people in 98 countries (Hamzavi et al., 2018; WHO, 2018b). The treatment occurs through the administration of antimonial multipurpose drugs, liposomal amphotericin B and pentamidine, paromomycin, miltefosine, among others; all with high cost and a lot of side effects. Therefore, drugs originating from natural products have been studied (Cameiro et al., 2015; Dias and Dasso, 2013). About Chagas disease, the current treatment is based on the use of nifurtimox and benznidazole, very toxic drugs to patients with various side effects (Marin-Neto et al., 2009; Urbina, 2002). Thus, the development of new safer and more effective therapeutic agents is necessary.

The *E. gracillima* essential oil (EGEO) was highly selective to *Leishmania braziliensis* and *Leishmania infantum* promastigotes with SI of 73.66 and 71.41, respectively. However, EGEO did not inhibit *T. cruzi* similar to the present investigation (Sampaio et al., 2019). The trypanocidal activity of ethanolic extract of *Eugenia jambolana* L. leaves, harvested in the city of Crato, Ceará, showed activity against the CL-B5 strain of *T. cruzi*, with 100% of inhibition at a concentration of 100 µg/mL. However, it showed cytotoxicity of 37% in the same concentration (Santos et al., 2012). Of the six species of Caatinga Brazilian plants from different families analyzed by Souza et al. (2017), essential oil of *E. brejoensis* leaves had the best dose-dependent inhibitory effect on the epimastigotes, trypomastigote and amastigote forms of *T. cruzi*.

In last decade, the search for new antiprotozoal compounds from natural sources has increased, and plants continue to be a major source of biologically active compounds that may provide lead structures to develop new drugs (Montavani et al., 2013). In this

1  
2  
3 scenario, some essential oils can be a promising alternative of new trypanocidal and  
4  
5 leishmanicidal compounds (Da silva et al., 2018).  
6

7  
8 ESEO showed bacterial type-dependent antimicrobial activity. As can be  
9  
10 observed, the Gram-positive bacteria were more susceptible to the antibacterial action of  
11  
12 ESEO compared to the Gram-negative ones, mainly due to composition of the bacterial  
13  
14 cell membranes, single mucopeptide layer in gram-positive bacteria that makes them to  
15  
16 be more sensitive to antimicrobial phytochemicals. In contrast, the presence of a more  
17  
18 complex lipopolysaccharide and phospholipid layer in the cell membranes of Gram-  
19  
20 negative bacteria implies a lower diffusion rate for lipophilic-based antimicrobial  
21  
22 compounds, such as essential oils (Alizadeh Behbahani et al., 2020).  
23  
24  
25

26  
27 ESEO showed low activity of free-radical scavenging with  $IC_{50}$  for DPPH and  
28  
29 ABTS assays, respectively, compared to BHT and ascorbic acid. However, essential oil  
30  
31 can play a promising strategy to improve the benefits of other components acting  
32  
33 additively to guarantee high quality and high value yield in formulations and processes  
34  
35 already used in the cosmetic, food and pharmaceutical industry.  
36  
37

### 38 39 40 5. CONCLUSION

41  
42 Altogether, the results obtained in this study shows that *E. stipitata* essential oil is  
43  
44 a natural source of sesquiterpenes. The study revealed that ESEO showed no relevant  
45  
46 antiparasitic effect against the epimastigotes forms of *T. cruzi*. In addition, the oil strongly  
47  
48 inhibited promastigote forms of *L. braziliensis* and *L. infantum*. *E. stipitata* was reported  
49  
50 for the first time to have promising antileishmanial potential.  
51

52  
53 Overall, the data suggest that ESEO could be further investigated for the isolation  
54  
55 and purification of the active antileishmanial, antioxidant and antibacterial constituents.  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 Further studies about ESEO-based formulation should be subjected to further *in vivo*  
4 studies in animal models to develop its relevance in phytotherapy application.  
5  
6

#### 7 8 **ACKNOWLEDGMENTS** 9

10  
11 The authors would like to express their gratitude to the following Brazilian  
12 agencies: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq),  
13 Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de  
14 Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE).  
15  
16  
17  
18  
19

#### 20 21 **AUTHOR CONTRIBUTIONS** 22

23  
24 CRBS, IRAM, MTSC, and MVS conceived the study and performed the study  
25 design. CRBS, MGVS, LCSV and MVS collected the plant material and performed the  
26 botanical identification and oil preparation. CRBS, MGVS, LCSV, MCVG and BSS  
27 performed *in vitro* assays. SAM, BYMP, DWRG, IRAM performed the chemical  
28 characterization of essential oil. CRBS, MGVS, LCSV, BSS, SAM, BYMP, DWRG,  
29 MTSC, MCVG, IRAM and MVS interpreted and discussed the results. CRBS, MGVS  
30 LCSV, and BSS drafted and revised the manuscript. All authors approved the final  
31 version of this manuscript.  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42

#### 43 44 **DECLARATION OF INTEREST STATEMENT** 45

46 The authors declare that the research was conducted in the absence of any  
47 commercial or financial relationships.  
48  
49

#### 50 51 **REFERENCES** 52

53  
54 Alizadeh Behbahani, B., Falah, F., Lavi Arab, F., Vasiee, M., & Tabatabaee Yazdi, F.  
55 (2020). Chemical Composition and Antioxidant, Antimicrobial, and Antiproliferative  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 Activities of *Cinnamomum zeylanicum* Bark Essential Oil. Evidence-Based  
4 Complementary and Alternative Medicine, 2020.

5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
Armstrong, J.S. 2006. Mitochondrial membrane permeabilization: the sine qua non for  
cell death. *BioEssays*. 28, 253–260.

Arruda, D.C., D'Alexandri, F.L., Katzin, A. M., Uliana, S.R.B. 2005. Antileishmanial  
activity of the terpene nerolidol. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 49, 1679–  
1687.

Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M. 2008. Biological effects of essential  
oils: a review. *Food and Chemical Toxicology*. 46, 446–475.  
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>

Cameiro, J.N.P., Albuquerque, R.S., Leite, N. F., Machado, A.J.T., Brito, D.I.V., Rólon,  
M., Veja, C., Coutinho, H.D.M., Morais-Braga, M.F.B. 2015. Avaliação da atividade  
tripanocida, leishmanicida e citotóxica do geraniol e citronelal. *Caderno de Cultura e  
Ciência*. 13, 29–36.

Da Silva, V. D., Almeida-Souza, F., Teles, A. M., Neto, P. A., Mondego-Oliveira, R.,  
Mendes Filho, N. E., Taniwaki, N.N., Abreu-Silva, A.L., Calabrese, K.D.S., Mouchrek  
Filho, V. E. 2018. Chemical composition of *Ocimum canum* Sims. essential oil and the  
antimicrobial, antiprotozoal and ultrastructural alterations it induces in *Leishmania  
amazonensis* promastigotes. *Industrial Crops and Products*, 119, 201–208.

De Souza, A. M., de Oliveira, C. F., de Oliveira, V. B., Betim, F. C. M., Miguel, O. G.,  
& Miguel, M. D. 2018. Traditional uses, Phytochemistry, and antimicrobial activities of  
*Eugenia* species—a review. *Planta Medica*, 84(17), 1232–1248.

Di Pasqua, R., Betts, G., Hoskins, N., Edwards, M., Ercolini, D., Mauriello, G. 2007.  
Membrane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils. *Journal of  
Agricultural and Food Chemistry*. 55, 4863–4870.

Dias, L.C., Dasso, M.A. 2013. Doenças tropicais negligenciadas: uma nova era de  
desafios e oportunidades. *Química Nova*. 36, 1552–1556, 2013.

Douglas, M.H., Van Klink, J.W., Smallfield, B.M., Perry, N.B., Anderson, R.E.,  
Johnstone, P., Weavers, R.T. 2004. Essential oils from New Zealand manuka: triketone  
and other chemotypes of *Leptospermum scoparium*. *Phytochemistry*. 65, 1255–1264.

Dubey, N. K., Shukla, R., Kumar, A., Singh, P., Prakash, B. 2010. Prospectives of  
botanical pesticides in sustainable agriculture. *Current Science*. 98, 479–480.

Escobar, P., Leal, S.M., Herrera, L.V., Martinez, J.R., Stashenko, E. 2010. Chemical  
composition and antiprotozoal activities of Colombian *Lippia* spp essential oils and their  
major components. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 105, 184–190.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

Franco, M.R.B., Shibamoto, T. 2000. 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*. 48, 1263-1265.

González, M., Cerecetto, H. 2011. Novel compounds to combat trypanosomatid infections: a medicinal chemical perspective. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*. 21, 699-715.

Hamzavi, S.S., Dashti, A.S., Kadivar, M.R., Pouladfar, G., Pourabbas, B., 2018. Successful treatment of disseminated cutaneous leishmaniasis with liposomal amphotericin B and miltefosine in an eight-year-old girl. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 37(3), 275-277.

Hossain, S., Heo, H., De Silva, B. C. J., Wimalasena, S. H. M. P., Pathirana, H. N. K. S., & Heo, G. J. (2017). Antibacterial activity of essential oil from lavender (*Lavandula angustifolia*) against pet turtle-borne pathogenic bacteria. *Laboratory animal research*, 33(3), 195-201.

Kalemba, D.; Kunicka, A. (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr. Med. Chem.* 10, 813–829

Mantovani, A. L., Vieira, G. P., Cunha, W. R., Groppo, M., Santos, R. A., Rodrigues, V., Magalhães, L.G., Crotti, A. E. 2013. Chemical composition, antischistosomal and cytotoxic effects of the essential oil of *Lavandula angustifolia* grown in Southeastern Brazil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 23(6), 877-884.

Marin-Neto, J.A., Rassi Júnior, A., Avezum Júnior, A., Mattos, A.C., Rassi, A., Morillo C.A., Sosa-Estani, S., Yusuf, S. 2009. The benefit trial: testing the hypothesis that trypanocidal therapy is beneficial for patients with chronic Chagas heart disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro. 104, 319–324.

Medeiros, J.R., Medeiros, N., Medeiros, H., Davin, L.B., Lewis, N.G. 2003. Composition of the bioactive essential oils from the leaves of *Eugenia stipitata* McVaugh ssp. *sororia* from de Azores. *Journal of Essential Oil Research*. 15, 293-295.

Meira, C.S., Menezes, L.R.A., Santos, T.B., Macedo, T.S., Fontes, J.E.N., Costa, E.V., Pinheiro, M.L.B., Da Silva, T.B., Teixeira, G.E, Soares, M.B.P. 2016. Chemical composition and antiparasitic activity of essential oils from leaves of *Guatteria friesiana* and *Guatteria pogonopus* (Annonaceae). *Journal of Essential Oil Research*. 29, 156-162.

Melo, N.I., Magalhaes, L.G., Carvalho, C.E., Wakabayashi, K.A., Aguiar, P.G., Ramos, R.C., Mantovani, A.L., Turatti, I.C., Rodrigues, V., Groppo, M., Cunha, W.R., Veneziani, R.C., Crotti, A.E. 2011. Schistosomicidal activity of the essential oil of *Ageratum comyzoides* L. (Asteraceae) against adult *Schistosoma mansoni* worms. *Molecules*. 16, 762-773.

Mendiola, J., Pino, J.A., Fernández-Calienes, A.; Mendoza, D.; Herrera, P. 2015. Chemical composition and *in vitro* antiplasmodial activity of essential oils of leaves and flowers of *alpinia zerumbet* grown in Cuba. *PharmacologyOnline*. 2, 1-5.

1  
2  
3  
4 Nikolić, M.; Marković, T.; Mojović, M.; Pejin, B.; Savić, A.; Perić, T.; Mojović, D.;  
5 Stević, T.; Soković, M.(2013). Chemical composition and biological activity of  
6 *Gaultheria procumbens* L. essential oil. *Ind. Crops Prod.*, 49, 561–567.

7  
8  
9 Nocentini, A., Osman, S.M., Almeida, I.A., Cardoso, V., Alasmay, F.A.S., AlOthman,  
10 Z., Vermelho, A. B, Grateri, P., Supuran, C. T. 2019. Appraisal of anti-protozoan activity  
11 of nitroaromatic benzenesulfonamides inhibiting carbonic anhydrases from *Trypanosoma*  
12 *cruzi* and *Leishmania donovani*. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*,  
13 34(1), 1164-1171.

14  
15  
16 Ronquillo, C., Cristina, E., Chicaiza Galarza, T. S. 2016. Evaluación de la actividad  
17 antioxidante bioautográfica de 5 variedades de aceites esenciales amazónicos (*Ocotea*  
18 *quixos*; *Psidium guajava*; *Eugenia stipitata*; *Piper auritum*; *Piper imperiale*) (Bachelor's  
19 thesis).

20  
21  
22 Santoro, G.F.; Cardoso, M.G.; Guimarães, L.G.; Freire, J.M.; Soares, M.J. 2007. Anti-  
23 proliferative effect of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf (lemongrass)  
24 on intracellular amastigotes, bloodstream trypomastigotes and culture epimastigotes of  
25 *Trypanosoma cruzi* (Protozoa: Kinetoplastida). *Parasitology*. 134, 1649–1656.

26  
27  
28 Santos, A.O., Ueda-Nakamura, T., Dias Filho, B.P., Veiga Junior, V.F., Pinto, A.C.,  
29 Nakamura, C.V. 2008. Effect of Brazilian copaiba oils on *Leishmania*  
30 *amazonensis*. *Journal of Ethnopharmacology*. 120, 204–208.

31  
32  
33 Santos, K.K.A., Matias, E.F.F., Tintino, S.R., Souza, C.E.S., Braga, M.F.B.M., Guedes,  
34 G.M.M., Rolón, M., Vega, C., Arias, A.R., Costa, J.G.M., Menezes, I.R.A., Coutinho,  
35 H.D.M. 2012. Cytotoxic, trypanocidal, and antifungal activities of *Eugenia jambolana*  
36 L. *Journal of Medicinal Food*. 15, 66-70.

37  
38  
39 Sauter, I.P., Santos, J.C., Apel, M.A., Cibulski, S.P., Roehle, P.M., Von Poser, G.L., Rott,  
40 M.B. 2011. Amoebicidal activity and chemical composition of *Pterocaulon polystachyum*  
41 (Asteraceae) essential oil. *Parasitology Research*. 109, 575-580.

42  
43  
44 Sharifi-Rad, J., Sureda, A., Tenore, G.C., Daglia, M., Sharifi-Rad, M., Valussi, M.,  
45 Tundis, R., Sharifi-Rad, M., Loizzo, M.R., Ademiluyi, A.O., Sharifi-Rad, R., Ayatollahi,  
46 S.A., Iriti, M. 2017. Biological activities of essential oils: from plant chemoecology to  
47 traditional healing systems. *Molecules*. 22, 70.

48  
49  
50 Souza, L.I.O., Bezzera-Silva, P.C., Navarro, D.M.D.A.F., Da Silva, A.G., Correia, M.  
51 T.D.S., Da Silva, M.V., De Figueiredo, R.C.B.Q. 2017. The chemical composition and  
52 trypanocidal activity of volatile oils from Brazilian Caatinga plants. *Biomedicine &*  
53 *Pharmacotherapy*. 96, 1055-1064.

54  
55  
56 Tariku, Y., Hymete, A., Hailu, A., Rohloff, J. 2010. Essential-oil composition,  
57 antileishmanial, and toxicity study of *Artemisia abyssinica* and *Satureja*  
58 *punctata* ssp. *punctata* from Ethiopia. *Chemistry and Biodiversity*. 7, 1009–1018.

59  
60  
Tasdemir, D., Kaiser, M., Brun, R., Yardley, V., Schmidt, T.J., Tosun, F., Rüedi, P., 2006.  
Antitrypanosomal and leishmanicidal activities of flavonoids and their analogues: *in*

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

*vitro*, *in vivo*, structure-activity relationship, and quantitative structure-activity relationship studies. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 50, 1352–1364.

Urbina, J. A. 2002. Chemotherapy of Chagas disease. *Current Pharmaceutical Design*, 8, 287–295.

Vega, C., Rolón, M., Martínez-Fernández, A. R., Escario, J. Á., Gómez-Barrio, A. 2005. A new pharmacological screening assay with *Trypanosoma cruzi* epimastigotas expressing beta-galactosidase. *Parasitology Research*. 95, 296-298.

WHO, 2018. Leishmaniasis. Available from: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>>. Access : 04 march. 2018.

WHO, 2019. Available from: <http://www.who.int/chagas/en/>; <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>.

Yahia, E. 2011. *Postharvest Biology and Technology of Tropical and Subtropical Fruits*, vol. 2. Woodhead Publishing, Cambridge.

Yap, P.S.X., Yiap, B.C., Ping, H.C., Lim, S.H.E. 2014. Essential oils, a new horizon in combating bacterial antibiotic resistance. *The Open Microbiology Journal*. 8, 6-14.

**Table 1.** Chemical composition of the essential oil from *Eugenia stipitata* McVaugh

Compound	Retention Index		Percentage composition (%)
	Determined	Literature	
$\beta$ -Pinene	982	980	0.41±0.00
$\alpha$ -Cymene	1022	1022	0.12±0.00
Eucalyptol	1033	1033	2.61±0.03
Linalool	1097	1098	0.24±0.01
$\delta$ -Elemene	1138	1139	0.53±0.00
Pinocarveol	1139	1139	0.49±0.00
Terpinen-4-ol	1175	1177	1.51±0.04
$\alpha$ -Terpinenol	1189	1189	2.62±0.1
Myrtenol	1194	1194	0.40±0.00
Myrtenal	1192	1193	0.26±0.01
(E)-Pinocarvyl acetate	1298	1298	0.24±0.00
$\alpha$ -Cubebene	1350	1351	0.95±0.00
Ylangene	1370	1373	0.19±0.00
$\beta$ -Bourbonene	1384	1384	1.99±0.10
$\beta$ -Cubebene	1390	1390	4.19±0.20
$\beta$ -Elemene	1392	1391	1.09±0.00
$\beta$ -Caryophyllene	1415	1417	4.38±0.10
$\beta$ -Cedrene	1418	1418	4.33±0.15
Aromadendrene	1437	1439	1.12±0.10
<b>Clovene</b>	<b>1454</b>	<b>1454</b>	<b>6.94±0.60</b>
$\alpha$ -Chamigene	1481	1476	0.49±0.00
$\alpha$ -Amorphene	1485	1485	0.86±0.00
Ledene	1488	1493	0.79±0.01
$\alpha$ -Munrolene	1497	1499	0.92±0.01
$\beta$ -Bisabolene	1500	1500	0.70±0.00
$\gamma$ -Cadinene	1513	1513	4.03±0.20
$\alpha$ -Cadinene	1542	1537	0.52±0.00
$\alpha$ -Calacorene	1544	1544	0.31±0.00
<b>Elemol</b>	<b>1550</b>	<b>1548</b>	<b>10.21±1.50</b>
<b>Spathulenol</b>	<b>1578</b>	<b>1576</b>	<b>6.14±0.5</b>
<b>Caryophyllene oxide</b>	<b>1571</b>	<b>1573</b>	<b>6.65±0.35</b>
Vinciflorol	1586	1587	1.56±0.01
Epiglobulol	1588	1588	0.81±0.00
Cubanol	1621	1625	0.48±0.00
Alloaromadendrene oxide	1633	1625	1.06±0.01
$\gamma$ -Eudesmol	<b>1635</b>	<b>1630</b>	<b>10.85±0.80</b>
$\delta$ -Cedren-13-ol	1688	1688	1.20±0.01
trans-Cadinol	1640	1640	2.53±0.15
$\beta$ -Eudesmol	<b>1649</b>	<b>1652</b>	<b>15.28±0.90</b>
Total			100.00

Notes: Percentage composition (%): percentage of compound on the samples

**Table 2.** Antiprotozoal activity and cytotoxicity of *Eugenia stipitata* essential oil.

Compound	Fibroblast	<i>L. braziliensis</i>		<i>L. infantum</i>		<i>T. cruzi</i>	
	LC <sub>50</sub> (µg/mL)	LC <sub>50</sub> (µg/mL)	SI	LC <sub>50</sub> (µg/mL)	SI	LC <sub>50</sub> (µg/mL)	SI
ESEO	511.5±24.32	37.65±1.25	13.58	54.71±2.26	9.35	>1000	ND
Benzimidazole	>100	ND	ND	ND	ND	10±0.58	ND
Miltefosine	>256	16±0.70	ND	8±0.14	ND	ND	ND

Notes: ESEO - *Eugenia stipitata* essential oil; LC<sub>50</sub> - median lethal concentration; SI - selectivity index; ND - Not determined

**Table 3.** Antibacterial activity of *Eugenia stipitata* essential oil.

Bacterial strain	Antibacterial activity				
	MIC (µg/mL)			MBC (µg/mL)	MBC/MIC
	ESEO	Oxacillin	Ampicillin	ESEO	ESEO
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29312	128	0.125	4	256	2
<i>Staphylococcus epidermidis</i> UFPEDA183	128	0.125	4	256	2
<i>Bacillus subtilis</i> UFPEDA086	256	25	2	512	2
<i>Klebsiella pneumoniae</i> UFPEDA396	>1024	8	8	>1024	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> UFPEDA416	512	4	2	512	1
<i>Escherichia coli</i> UFPADA224	512	8	4	512	1

Notes: MIC - Minimal Inhibitory Concentration; MBC - Minimal Bactericidal Concentration

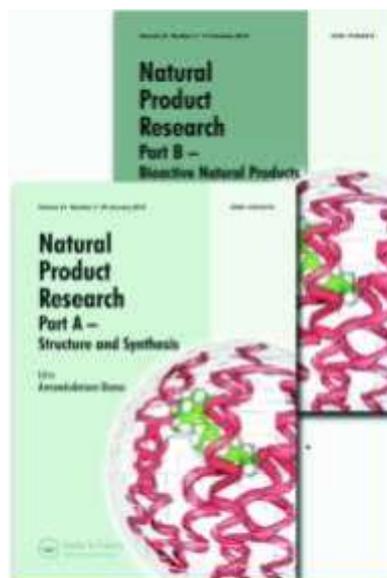
Table 4. Free radical scavenging activity of *Eugenia stipitata* essential oil

Compound	Concentration (mg/mL)	DPPH		ABTS	
		Scavenging (%)	IC <sub>50</sub> (mg/mL)	Scavenging (%)	IC <sub>50</sub> (mg/mL)
ESEO	100	59.01 ± 3.08	79.32 ± 5.34	61.54 ± 1.93	69.86 ± 2.43
	50	38.80 ± 4.46		45.70 ± 3.13	
	25	22.04 ± 7.43		30.55 ± 1.41	
	12.5	13.65 ± 2.66		20.58 ± 0.31	
BHT			0.0024 ± 0.0001		0.102 ± 0.028
Ascorbic acid			0.0087 ± 0.0024		0.0036 ± 0.0002

For Peer Review Only

3.2 ARTIGO 2 – CHEMICAL COMPOSITION, ANTIOXIDANT AND ANTIPROTOZOAL ACTIVITY OF *Eugenia gracillima* KIAERSK. LEAVES ESSENTIAL OIL

Artigo publicado no periódico *Natural Product Research*, 2019. DOI: 10.1080/14786419.2019.1644506



**Fator de impacto: 1.999**

**Classificação A4 no Qualis para Ciências Biológicas I**



Natural Product Research  
Formerly Natural Product Letters



ISSN: 1478-6419 (Print) 1478-6427 (Online) Journal homepage: <https://www.tandfonline.com/doi/urn:doi:>

## Chemical composition, antioxidant and antiprotozoal activity of *Eugenia gracillima* Kiaersk. leaves essential oil

Mariana Gomes Vidal Sampaio, Cícero Ramon Bezerra Dos Santos, Lilian Cortez Sombra Vandesmet, Bruno Souza Dos Santos, Izabelly Bianca Da Silva Santos, Maria Tereza dos Santos Correia, Arthur Lima de Berrêdo Martins, Luis Claudio Nascimento da Silva, Irwin Rose De Alencar Menezes, Maria Celeste Veja Gomez & Márcia Vanusa Da Silva

To cite this article: Mariana Gomes Vidal Sampaio, Cícero Ramon Bezerra Dos Santos, Lilian Cortez Sombra Vandesmet, Bruno Souza Dos Santos, Izabelly Bianca Da Silva Santos, Maria Tereza dos Santos Correia, Arthur Lima de Berrêdo Martins, Luis Claudio Nascimento da Silva, Irwin Rose De Alencar Menezes, Maria Celeste Veja Gomez & Márcia Vanusa Da Silva (2019): Chemical composition, antioxidant and antiprotozoal activity of *Eugenia gracillima* Kiaersk. leaves essential oil, Natural Product Research, DOI: [10.1080/14786419.2019.1644506](https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1644506)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1644506>



View supplementary material



Published online: 22 Jul 2019.



Submit your article to this journal



View Crossmark data

SHORT COMMUNICATION



## Chemical composition, antioxidant and antiprotozoal activity of *Eugenia gracillima* Kiaersk. leaves essential oil

Mariana Gomes Vidal Sampaio<sup>a</sup>, Cícero Ramon Bezerra Dos Santos<sup>a</sup>, Lilian Cortez Sombra Vandesmet<sup>a</sup>, Bruno Souza Dos Santos<sup>a</sup> , Izabelly Bianca Da Silva Santos<sup>a</sup>, Maria Tereza dos Santos Correia<sup>a</sup> , Arthur Lima de Berrêdo Martins<sup>b</sup>, Luis Claudio Nascimento da Silva<sup>b</sup> , Irwin Rose De Alencar Menezes<sup>c</sup>, Maria Celeste Veja Gomez<sup>d</sup> and Márcia Vanusa da Silva<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Biochemistry Department, Bioscience Center, Federal University of Pernambuco – UFPE, Recife, Pernambuco, Brazil; <sup>b</sup>Pró-reitoria de Pós-graduação, Pesquisa e Extensão, Universidade Ceuma, São Luís, Brazil; <sup>c</sup>Pharmacology and Medicinal Chemistry, Regional University of Cariri, Crato, Ceara, Brazil; <sup>d</sup>Center for the Development of Scientific Investigation - CEDIC, Fundación Moisés Bertoni/Laboratorios Díaz Gill, Asunción, Paraguay

### ABSTRACT

This work evaluated the volatile composition, antioxidant and antiprotozoal activities of the essential oil obtained from leaves of *Eugenia gracillima* Kiaersk. (EGEO) grown in Brazilian Northeast area (Araípe, Brazil). The volatile compounds of EGEO were analyzed by GC and GC–MS and its chemical composition is mainly composed of sesquiterpene hydrocarbons (91.22%), oxygenated sesquiterpenes (7.45%) and monoterpene (1.01%). The most abundant volatile constituents of the EGEO were germacrene D (16.10%),  $\gamma$ -muurolene (15.60%), bicyclogermacrene (8.53%), germacrene B (7.43%), and  $\Delta$ -elemene (6.06%). The oil showed weak to moderate antioxidant activity. EGEO was highly selective to *Leishmania braziliensis* and *Leishmania infantum* promastigotes with selective indexes of 73.66 and 71.41, respectively. EGEO did not inhibit *Trypanosoma cruzi*. These data suggest that the *E. gracillima* essential oil is a relevant source of lead compounds for development of anti-*Leishmania* drugs.

### ARTICLE HISTORY

Received 10 April 2019  
 Accepted 7 July 2019

### KEYWORDS

*Eugenia gracillima*; essential oil; antioxidant activity; antiprotozoal activity

CONTACT Mariana Gomes Vidal Sampaio  [marianavidalsampaio@gmail.com](mailto:marianavidalsampaio@gmail.com)

 Supplemental data for this article can be accessed at <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1644506>.

© 2019 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group



## 1. Introduction

Despite the expressive number of affected individuals, Leishmaniasis and Chagas' disease remain with the status of neglected pathologies. Delayed diagnosis allied with the absence of efficient therapeutic strategies lead to important host complications (Momcilovic et al. 2019). In addition, the drugs used in treatment of these diseases are associated with serious side effects and emergence of drug-resistant strains (Bemudez et al. 2016; Tiwari et al. 2018). This panorama denotes the urgent need to develop new therapeutic resources against these clinical conditions.

Essential oils (EO) are complex mixtures of volatile compounds that represent a source of lead molecules for drug discovery. EO from *Eugenia* plants (Myrtaceae) have showed several pharmacological actions, including antiprotozoal (against *Leishmania braziliensis*, *Leishmania infantum* and *Trypanosoma cruzi*) and antioxidant activities (Rodrigues et al. 2013; Siebert et al. 2015; Carneiro et al. 2017). Herein, we evaluated the chemical composition, antioxidant and antiprotozoal activities of the essential oil obtained from leaves of *Eugenia gracillima* Kiaersk. (EGEO), also known under the synonym *Eugenia klappenbachiana* Mattos & D. Legrand, grown in Brazilian Northeast area (Araripe, Pernambuco, Brazil).

## 2. Results and discussion

### 2.1. Chemical composition of EGEO

In this work, the chemical composition of EGEO and some pharmacological activity was evaluated. EGEO was obtained from fresh leaves of *E. gracillima* with a yield of about 0.136% (w/w). The employed technique of GC and GC-MS analyses allowed them to observe majority volatile compounds. A total of 42 compounds were identified corresponding to more than 99% of the total volatile components (Table S1).

EGEO is mainly composed of sesquiterpene hydrocarbons (91.22%), oxygenated sesquiterpenes (7.45%) and monoterpene (1.01%). The most abundant constituents of the EGEO were germacrene D (16.10%),  $\gamma$ -muurolene (15.60%), bicyclogermacrene (8.53%), germacrene B (7.43%), and  $\Delta$ -elemene (6.06%).

Although this chemical composition is similar to other *Eugenia* plants, these results differ from a previous characterization of an essential oil extracted from *E. gracillima* (= *E. klappenbachiana*) grown in Paraná state (South area of Brazil), whose major components were derived from the aromadendrane skeleton, such as globulol (8.7%), viridiflorene (6.9%), epi-globulol (6.8%) and spathulenol (5.9%) (Apel et al. 2002). These differences may result from the interaction of several factors, including soil composition, solar radiation, collection season, biotic factor (microorganisms, insects or other plants) (Moghaddam and Farhadi 2015; De Alencar Filho et al. 2017, Morelli et al. 2017).

### 2.2. Antioxidant activity of *Eugenia gracillima* essential oil

Given the relevance of oxidative stress in the pathogenesis of diseases as cancer and inflammatory disorders, we evaluated the antioxidant properties of the EGEO using different methods: DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) and ABTS [2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt] radicals scavenger assays and total antioxidant fosfomolibdenium assays (Table S2). The oil weakly inhibited the DPPH and ABTS radicals (IC<sub>50</sub> of 15.67 mg/mL and 15.16 mg/mL). However, it showed a high total antioxidant potential when compared to ascorbic acid (62.29%). Some other oils from *Eugenia* plants have been demonstrated antioxidant activity (Cameiro et al. 2017; Siebert et al. 2015).

### 2.3. Antiprotozoal activity of *Eugenia gracillima* essential oil

Following, we analyzed whether EGEO could inhibit *Leishmania* spp. and *T. cruzi*. As shown in Table S3, the oil exhibited higher activity towards the promastigote forms of *L. braziliensis* (IC<sub>50</sub> = 74.64  $\mu$ g/mL) and *L. infantum* (IC<sub>50</sub> = 80.4  $\mu$ g/mL), while it was not active against *T. cruzi* (IC<sub>50</sub> = 1487  $\mu$ g/mL). In order to determine the selective indexes (SI) of EGEO, its cytotoxicity was evaluated against NCTC-929 murine fibroblasts. EGEO showed low cytotoxicity with IC<sub>50</sub> value of 5498  $\mu$ g/mL.

In this sense, EGEO was highly selective to *L. braziliensis* and *L. infantum* promastigotes with SI values of 73.66 and 71.41, respectively. Similar results were observed to the essential oil obtained from *Eugenia uniflora* (also mostly composed by sesquiterpenes) which exhibited SI values around 20 against *L. amazonensis* (Rodrigues et al. 2013). Furthermore, oils rich in sesquiterpenes have been pointed out as efficient leishmanicidal agents (Rodrigues et al. 2013; Moreira et al. 2017).

After infection by *Leishmania*, both superoxide anion (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) and nitric oxide (NO) molecules produced after monocyte phagocytosis and they could participate in several events, such as *Leishmania* killing, act as pro and/or anti-inflammatory (inducing neutrophil apoptosis) molecules, and also be involved in human immunopathology. The use of topical formulations with antioxidant activity could be beneficial in the control

of leishmanial cutaneous lesions, due it could attenuate inflammatory signs by reducing tissue damage (Neira, Mantilla, and Escobar 2019). The development of formulation contain EGEO could be an appropriate candidate for use in leishmaniosis.

### 3. Conclusion

Altogether, the results obtained in this study shows that *E. gracillima* essential oil is a source of sesquiterpenes (such germacrene D and B,  $\gamma$ -muurolene, bicydogemacrene) with relevance for pharmaceutical, cosmetic and food industries. In addition, the oil strongly inhibited promastigote forms of *L. braziliensis* and *L. infantum*. *E. gracillima* was reported for the first time to have promising antileishmanial potential. Overall, the data suggest that EGEO could be further investigated for the isolation and purification of the active antileishmanial constituents. Further studies about EGEO-based formulation (long-stability, preclinical and clinical evaluation), in special reference to dermatological gel and nanotechnology approach, should be subjected to further *in vivo* studies in animal models to develop its relevance in biomedical applications.

### Disclosure statement

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships.

### Funding

The authors would like to express their gratitude to the following Brazilian agencies: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE) and Fundação de Amparo à Pesquisa e Desenvolvimento Científico do Maranhão (FAPEMA). Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco; Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão; Fundación Moisés Bertoni/Laboratorios Diaz Gil.

### ORCID

Bruno Souza Dos Santos  <http://orcid.org/0000-0003-4644-0047>

Maria Tereza dos Santos Correia  <http://orcid.org/0000-0003-4920-9975>

Luis Claudio Nascimento da Silva  <http://orcid.org/0000-0002-4206-0904>

### References

- Apel MA, Sobral M, Henriques AT, Menut C, Bessière JM. 2002. Chemical composition of the essential oils from southern Brazilian Eugenia species. Part IV: section Racemulosae. *J Essential Oil Res.* 14(4):290–292.
- Bermudez J, Davies C, Simonazzi A, Real JP, Palma S. 2016. Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas disease. *Acta Trop.* 156:1–16. Apr

- Cameiro NS, Alves CCF, Alves JM, Egea MB, Martins CHG, Silva TS, Bretanha LC, Balleste MP, Micke GA, Silveira EV, et al. 2017. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of essential oils from leaves and flowers of *Eugenia klotzschiana* Berg (Myrtaceae). *An Acad Bras Cienc.* 89(3):1907–1915.
- De Alencar Filho JMT, Araújo LDC, Oliveira AP, Guimarães AL, Pacheco AGM, Silva FS, Cavalcanti LS, Lucchese AM, Almeida J, Araújo ECC. 2017. Chemical composition and antibacterial activity of essential oil from leaves of *Croton heliotropifolius* in different seasons of the year. *Braz J Pharm.* 27(4):440–444.
- Moghaddam M, Farhadi N. 2015. Influence of environmental and genetic factors on resin yield, essential oil content and chemical composition of *Ferula assa-foetida* L. populations. *J Appl Res Med Aromat Plants.* 2:69–76.
- Momcilovic S, Cantacessi C, Arsic-Arsenijevic V, Otranto D, Tasic OS. 2019. Rapid diagnosis of parasitic diseases: current scenario and future needs. *Clin Microbiol Infect.* 25:290–309. Mar
- Moreira RRD, Martins GZ, Varandas R, Cogo J, Perego CH, Roncoli G, Sousa MDC, Nakamura CV, Salgueiro L, Cavaleiro C. 2017. Composition and leishmanicidal activity of the essential oil of *Vernonia polyanthes* Less (Asteraceae). *Nat Prod Res.* 31(24):2905–2908.
- Morelli F, Ferrarese L, Munhoz CL, Alberton O. 2017. Antimicrobial activity of essential oil and growth of *Ocimum basilicum* L. inoculated with mycorrhiza and humic substances applied to soil. *J Genet Mol Res.* 16(3):1–11.
- Neira LF, Mantilla JC, Escobar P. 2019. Anti-leishmanial activity of a topical miltefosine gel in experimental models of New World cutaneous leishmaniasis. *J Antimicrob Chemother.* 74(6): 1634–1641.
- Rodrigues KA, Amorim LV, de Oliveira JM, Dias CN, Moraes DF, Andrade EH, Maia JG, Carneiro SM, Carvalho FA. 2013. *Eugenia uniflora* L. essential oil as a potential anti-Leishmania agent: Effects on *Leishmania amazonensis* and possible mechanisms of action. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013:279726.
- Siebert DA, Tenfen A, Yamanaka CN, de Cordova CM, Scharf DR, Simionatto EL, Alberton MD. 2015. Evaluation of seasonal chemical composition, antibacterial, antioxidant and anticholinesterase activity of essential oil from *Eugenia brasiliensis* Lam. *Nat Prod Res.* 29:289–292.
- Tiwari N, Gedda MR, Tiwari VK, Singh SP, Singh RK. 2018. Limitations of current therapeutic options, possible drug targets and scope of natural products in control of leishmaniasis. *Mini Rev Med Chem.* 18:26–41.

**Chemical composition, antioxidant and antiprotozoal activity of *Eugenia gracillima* Kiaersk. leaves essential oil**

Mariana Gomes Vidal Sampaio<sup>a</sup>, Cicero Ramon Bezerra Dos Santos<sup>a</sup>, Lilian Cortez Sombra Vandemeta<sup>a</sup>, Bruno Souza Dos Santos<sup>a</sup>, Izabelly Bianca Da Silva Santos<sup>a</sup>, Maria Tereza dos Santos Correia<sup>a</sup>, Arthur Lima de Berrêdo Martins<sup>b</sup>, Luis Claudio Nascimento da Silva<sup>b</sup>, Irwin Rose De Alencar Menezes<sup>c</sup>, Maria Celeste Veja Gomez<sup>d</sup>, Márcia Vamusa da Silva<sup>a</sup>.

<sup>a</sup>Biochemistry Department, Bioscience Center, Federal University of Pernambuco – UFPE, Recife, Pernambuco, Brazil.

<sup>b</sup>Pró-reitoria de Pós-graduação, Pesquisa e Extensão, Universidade Ceuma, São Luis, Brazil.

<sup>c</sup>Pharmacology and Medicinal Chemistry, Regional University of Cariri, Crato, Ceara, Brazil.

<sup>d</sup>Center for the Development of Scientific Investigation - CEDIC, Fundación Moisés Bertoni /Laboratorios Diaz Gill, Asuncion, Paraguay.

\*Corresponding Author: Mariana Gomes Vidal Sampaio. Biochemistry Department, Bioscience Center. Federal University of Pernambuco – UFPE, Recife (PE), Brazil. Address: Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, CEP: 50.670-901. Phone: +55 (81) 2126.8540

E-mail: [marianavidalsampaio@gmail.com](mailto:marianavidalsampaio@gmail.com)

**Chemical composition, antioxidant and antiprotozoal activity of *Eugenia gracillima* Kiaersk. leaves essential oil**

This work evaluated the volatile composition, antioxidant and antiprotozoal activities of the essential oil obtained from leaves of *Eugenia gracillima* Kiaersk. (EGEO) grown in Brazilian Northeast area (Araripe, Brazil). The volatile compounds of EGEO were analyzed by GC and GC-MS and its chemical composition is mainly composed of sesquiterpene hydrocarbons (91.22%), oxygenated sesquiterpenes (7.45%) and monoterpene (1.01%). The most abundant volatile constituents of the EGEO were germacrene D (16.10%),  $\gamma$ -muurolene (15.60%), bicyclogermacrene (8.53%), germacrene B (7.43%), and  $\Delta$ -elemene (6.06%). The oil showed weak to moderate antioxidant activity. EGEO was highly selective to *Leishmania braziliensis* and *Leishmania infantum* promastigotes with selective indexes of 73.66 and 71.41, respectively. EGEO did not inhibit *Trypanosoma cruzi*. These data suggest that the *E. gracillima* essential oil is a relevant source of lead compounds for development of anti-*Leishmania* drugs.

**Keywords:** *Eugenia gracillima*, essential oil, antioxidant activity, antiprotozoal activity

## 1. Experimental section

### 1.1. Plant material

The leaves of *E. gracillima* were collected in the area of native vegetation, located in *Serra dos Paus Dóias* in *Chapada do Araripe* (Exu, Pernambuco; latitude 7° 21" S, longitude 39° 53" W and altitude 884m), between July and August 2017, under authorization of the responsible authority Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) using the license SISBIO 59070. The plant material was identified by Dr. Maria Arlene Pessoa da Silva from the Laboratory of Microbiology and Molecular Biology of the Regional University of Cariri (URCA). The voucher (registration number: 13.055) was deposited in the URCA Herbarium (*Herbário Caririense Dárdano de Andrade Lima*; HCDAL).

### 1.2. Sample preparation and chemical characterization of *E. gracillima* essential oil

The essential oil from the leaves of *E. gracillima* (EGEO) was obtained by hydrodistillation method. The EO was filtered, weighed and stored in a dark at 4° C until use. The EO was analysed by gas chromatography coupled to Shimadzu GCMS-QP2010 mass spectrometry (CG-MS) using Rtx®-5MS capillary column (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm). The electron ionization mode was used at 70 eV. and helium (99.999%) was employed as the carrier gas (1 mL/min). The following temperature program was used: 100 °C (3 min) at 310 °C (3.5 °C/min). The identification of the individual volatile components was carried out by comparison with values of retention indices, obtained by co-injection of oil samples and a set of C<sub>9</sub>-C<sub>30</sub> linear hydrocarbons, and the MS data acquired for each volatile component were matched with the data available in the mass spectral library - MassFinder 4 (Dr. Hochmuth scientific consulting, Hamburg, Germany); NIST08 Mass Spectral Library (ChemSW Inc. Fairfield, CA, USA); Wiley Registry™ of Mass Spectral Data 9th Edition (Wiley, Hoboken, NJ, USA) and with other published mass spectral data (Adams, 2007). For the quantitative analysis, a Shimadzu GC2010 Plus gas chromatograph equipped with a FID detector, with the same column and operating conditions above described were used. The percentage volatile composition was performed by the

normalization method from the GC peak areas, in relation to the combined area of all peaks. All analyses were carried out in triplicate.

### 1.3. Cell cultures

Tests with *T. cruzi* were performed using clone CL-B5 (Buckner et al., 1996) carrying *Escherichia coli*  $\beta$ -galactosidase (*lacZ*) gene, kindly supplied by Dr. F. Buckner through the Gorgas Memorial Institute (Panama). The epimastigote forms were cultured at 28 °C in tryptose broth for liver infusion (Difco, Detroit, MI) supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS) (Gibco, Carlsbad, CA), penicillin (Erm, SA, Barcelona, Spain) and streptomycin. Cells were collected for testing in the exponential growth phase.

Cultures of *Leishmania braziliensis* (MHOM/CO/88/UA301) and *L. infantum* (MHOM/ES/92/BCN83) were obtained from the Institute of Health Sciences Research (Paraguay). The strains were grown at 22 °C in Schneider's *Drosophila* medium supplemented with 20% FBS.

The cytotoxicity assays were performed using NCTC-929 murine fibroblasts obtained from the National Collection of Culture Types. The cells were cultured in Minimum Essential Medium supplemented with SBF (10%), penicillin G (100 U/ml) and streptomycin (100 mg/ml). The cultures were maintained at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>.

### 1.4. Anti-*T. cruzi* assay

Aliquot of epimastigote forms of *T. cruzi* suspension (200  $\mu$ L at  $1 \times 10^5$  per milliliter) were treated with different concentrations of EGEO (15.75  $\mu$ g/mL to 1000  $\mu$ g/mL) at 28 °C. After 72h, 200  $\mu$ M of red- $\beta$ -D-galactopyranoside chlorophenol (CPRG; dissolved in a solution of 0.9% Triton X-100) were used in order to evaluate parasite viability. The plates were incubated at 37 °C for 6 h and then the absorbance was determined at 595 nm. Benznidazole was the reference drug.

### 1.5. Leishmanicidal activity

Promastigote forms ( $2.5 \times 10^5$  parasites/well) were treated with EOEG (15.75  $\mu$ g/mL to 1000  $\mu$ g/mL). After incubation of 48h at 26 °C, resazurin solution (20  $\mu$ l) was added and the absorbance was determined at 595nm. Miltefosine that was used as a positive control.

### 1.6. Cytotoxicity evaluation

NCTC-929 were seeded (100  $\mu$ L;  $3 \times 10^4$  cells/well) in 96-well plates with of RPMI 1640 culture medium per well. Cells were grown overnight at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>. The medium was removed, and the new medium were added containing EGEO 15.75  $\mu$ g/mL to 1000  $\mu$ g/mL. Cell viability was evaluated using resazurin as described above. The toxicity to the fibroblast cell and the activity against the protozoan were compared by using the selectivity index (SI) ratio (IC<sub>50</sub> for NCTC-929 cells/IC<sub>50</sub> for protozoan).

### 1.7. Antioxidant potential

The antioxidant potential of EGEO were evaluated by the traditional methods of DPPH and ABTS radicals inhibition and phosphomolybdenum assay (referred as total antioxidant activity) (Blois 1958, Prieto et al. 1999, Re et al. 1999). Total antioxidant activity (%) was expressed as ascorbic acid equivalent, relative to 1mg/mL ascorbic acid to 1mg/mL EGEO.

### 1.8. Statistical analysis

The experiments were performed in triplicate with at least two independent repetition, data were presented as means  $\pm$  standard variation (SD) or percentages. Statistical analyses were performed using the software GraphPad Prism version 5.0. Data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey test. A p-value of <0.05 was considered as statistically significant. IC<sub>50</sub> values were determined by linear regression.

## References

- Apel MA, Sobral M, Henriques AT, Menut C, Bessi re JM. 2002. Chemical composition of the essential oils from southern Brazilian *Eugenia* species. Part IV: section *Racemosae*. *Journal of Essential Oil Research*. 14(4): 290-292.
- Blois MS. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*.181:1199.
- Prieto P, Pineda M, Aguilar M. 1999. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytical biochemistry*.269:337-341.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med*. May;26:1231-1237.

Table S1. Chemical composition of the essential oil of *Eugenia gracillima* Kiaersk.

Compound	Retention Index		Percentage composition(%) reported by this work	Percentage composition(%) reported by Apal et al., 2002
	Determined <sup>a</sup>	Literature <sup>b</sup>		
δ-elemene	1336	1335	6.06±0.08	-
α-cubebene	1345	1345	0.12±0.00	-
α-ylangene	1376	1373	0.50±0.01	-
isolekene	1375	1374	1.30±0.03	-
copaene	1377	1374	0.60±0.00	1.8
guaia-6,9-diene	1380	1379	0.68±0.04	-
β-bourbonene	1387	1387	0.71±0.00	0.2
β-cubebene	1388	1387	0.11±0.00	-
β-alemene	1390	1389	1.41±0.08	0.7
sativene	1392	1390	0.21±0.00	-
α-gurjunene	1410	1409	4.03±0.02	-
β-copaene	1432	1430	0.31±0.05	-
bergamotene	1433	1432	4.89±0.06	-
γ-alemene	1434	1434	0.73±0.00	-
α-guaiene	1437	1437	1.80±0.08	-
cadina-3,5-diene	1449	1448	0.26±0.09	-
α-humulene	1454	1452	1.64±0.11	0.5
alloaromadendrene	1458	1458	0.90±0.00	2.2
caryophyllene-9-epi-(α)	1461	1464	0.40±0.00	-
cumacrene	1470	1470	0.27±0.00	-
γ-muurolene	1478	1478	15.60±0.22	3.1
γ-amorphane	1482	1483	3.14±0.00	-
germacrene D	1483	1484	16.10±0.38	-
β-selinene	1490	1489	0.16±0.00	-
bicyclogermacrene	1501	1500	8.53±0.09	-
α-muurolene	1503	1500	0.73±0.00	0.6
β-guaiene	1504	1502	0.84±0.01	-
δ-cadinene	1524	1522	6.23±0.16	1.8
zonarene	1528	1528	0.93±0.00	-
α-cadinene	1537	1537	2.33±0.17	-
selina-3,7(11)-diene	1548	1545	0.15±0.00	-
elemol	1549	1548	0.61±0.00	-
germacrene B	1561	1559	7.43±0.62	-
spathulenol	1578	1577	0.67±0.00	5.9
thujopsan-2β-ol	1589	1588	0.29±0.00	-
globulol	1591	1590	1.03±0.05	8.7
1h-cycloprope-azulene-4-ol	1592	1592	1.01±0.10	-
viridiflorol	1593	1592	0.42±0.00	-
isopathulenol	1626	1625	1.25±0.09	3.3
torreyol	1644	1644	1.27±0.12	-
cubenol	1645	1645	3.58±0.19	-
α-cadinol	1656	1654	0.45±0.00	2.9
decanal	-	-	-	0.7
2-undecanone	-	-	-	0.2
β-caryophyllene	-	-	-	0.7
aromadendrene	-	-	-	2.2
γ-curcumene	-	-	-	2.9
viridiflorene	-	-	-	6.9
β-bisabolene	-	-	-	3.0
γ-cadinene	-	-	-	1.2
caryophyllene oxide	-	-	-	3.3
epi-globulol	-	-	-	6.8
10-epi-γ-sudesmol	-	-	-	4.8
γ-sudesmol	-	-	-	2.5
α-cadinol	-	-	-	3.1
14-hidroxi-α-muurolene	-	-	-	1.8
bicyclovetivenol	-	-	-	3.6
Total			99.68	75.4

Notes: <sup>a</sup>Retention indices calculated on RTX®-5MS from retention times in relation to those of a series of C<sub>7</sub>-C<sub>10</sub> n-alkanes; <sup>b</sup>Retention index reported in the literature - mass spectral libraries MassFinder 4, NIST08, Wiley Registry™ of Mass Spectral Data 9th Edition and with other published mass spectral data (Adams, 2007).

Table S2: Antioxidant activity of *Eugenia gracillima* essential oil

Sample	DPPH IC <sub>50</sub>	ABTS IC <sub>50</sub>	Total antioxidant activity (%)
	(mg/mL)	(mg/mL)	
EGEO	15.67 ± 1.31 <sup>b</sup>	15.16 ± 0.73 <sup>b</sup>	62.29 ± 5.56
BHT	0.0024 ± 0.0001 <sup>c</sup>	0.102 ± 0.028 <sup>c</sup>	ND*
Ascorbic acid	0.0087 ± 0.0044 <sup>c</sup>	0.0036 ± 0.0002 <sup>d</sup>	100

Notes: EGEO - *Eugenia gracillima* essential oil; ND\* - Not Determined; BHT - Butylated hydroxy toluene. Values in the column followed by a different letter superscript (a-d) are significantly different (p < 0.05) and values having same superscript are not statistically significant.

**Table S3.** Antiprotozoal activity and cytotoxicity of *Eugenia gracillima* essential oil.

Compound	Fibroblast	<i>L. braziliensis</i>		<i>L. infantum</i>		<i>T. cruzi</i>	
	IC <sub>50</sub> (µg/mL)	IC <sub>50</sub> (µg/mL)	SI	IC <sub>50</sub> (µg/mL)	SI	IC <sub>50</sub> (µg/mL)	SI
EGEO	5498±141.20	74.64±0.99	73.66	76.99±0.41	71.41	>1000	ND
Benznidazole	>100	ND	ND	ND	ND	10±0.58	ND
Miltefosine	>256	16±0.70	ND	8±0.14	ND	ND	ND

Notes: EGEO - *Eugenia gracillima* Kiaersk. essential oil; IC<sub>50</sub> - Concentration that inhibited 50% cellular growth; SI - selectivity index; ND - Not determined

3.3 ARTIGO 3 – Avaliação da propriedade antifúngica, interação com antifúngicos e mecanismo de ação do óleo essencial de *Eugenia stipitata* McVaugh.

Artigo será submetido ao periódico: *Medical mycology*



Fator de Impacto: 2.822

Classificação A2 no Qualis para Ciências Biológicas I

AVALIAÇÃO DA PROPRIEDADE ANTIFÚNGICA, INTERAÇÃO COM  
ANTIFÚNGICOS E MECANISMO DE AÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Eugenia  
stipitata* MCVAUGH.

Cícero Ramon Bezerra dos Santos<sup>1</sup>, Mariana Gomes Vidal Sampaio<sup>1</sup>, Lilian Cortez Sombra Vandesmet<sup>1</sup>, Saulo Almeida de Menezes<sup>1</sup>, Maria Tereza dos Santos Correia<sup>1</sup>, Márcia Vanusa da Silva<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Biochemistry Department, Biocience Center, Federal University of Pernambuco – UFPE, Recife, Pernambuco, Brazil.*

## RESUMO

A Candidíase é uma infecção causada por microrganismos oportunistas do gênero fúngico *Candida* que ocorrem frequentemente em pele e mucosas, havendo, entretanto, complicações comuns no meio hospitalar que levam a crescentes índices de mortalidade. Outra grande problemática diz respeito ao precário arsenal terapêutico disponível para o tratamento, associado ainda a toxicidade e variações na eficácia. Logo, há uma necessidade emergente na busca de novos agentes antifúngicos para combater as infecções por *Candida* spp.. Assim, neste estudo, foi avaliada a propriedade anti-*Candida* através da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM), o mecanismo de ação na presença de sorbitol e ergosterol exógeno e a propriedade moduladora pela determinação do Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF), com os antifúngicos fluconazol e anfotericina B, utilizando 08 cepas de *Candida* spp. (02 *C. albicans*, 02 *C. krusei*, 02 *C. parapsilosis* stricto sensu e 02 *C. tropicalis*) para todos os testes. Na análise antifúngica, obteve-se valores de CIM que variaram de 64 a 512 µg/mL e de CFM que estão entre 512 a > 1024 µg/ml. Na presença ou na ausência do sorbitol, os valores de CIM permaneceram inalterados. Já com o aumento da concentração exógena de ergosterol, os valores de CIM não mudaram. Os valores de ICIF para as interações com fluconazol, demonstraram que as mesmas foram sinérgicas para 87,5% (7/8) das cepas testadas e indiferentes às demais. Todas as combinações com anfotericina B resultaram em interações indiferentes. Os resultados sugerem que o OEEES demonstra uma propriedade antifúngica contra as cepas de *Candida* testadas com provável mecanismo de ação através da inibição da biossíntese de ergosterol. Além disso, foi obtido efeito sinérgico entre o óleo essencial e a fluconazol para a maioria das espécies, exceto para

uma cepa de *C. tropicalis*. Portanto, a presente pesquisa sugere a espécie de planta como uma possível fonte terapêutica alternativa, dada sua eficácia nos testes in vitro realizados.

**Palavras-chave:** *Candida*. Myrtaceae. Fluconazol.

## INTRODUÇÃO

As Candidíases são um grupo de doenças ocasionadas por algumas espécies do gênero fúngico *Candida*, dentre elas destacam-se as espécies de interesse para a clínica médica, como: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. krusei*, podendo ainda ser causadas por outras espécies. Essas infecções acometem um grupo de pessoas que frequentemente possuem uma debilidade imunológica permanente ou transitória e por isso tornam-se alvos deste microrganismo oportunista (SIDRIM; ROCHA, 2004).

Infecções por *Candida* spp. manifestam-se costumeiramente em pele e mucosas, entretanto há uma complicação desta enfermidade na qual passa a ser uma infecção fúngica invasiva. A Candidíase Invasiva (CI) é comumente observada no meio hospitalar em pacientes frágeis, internados em Unidades de Terapia Intensiva (UTI), com comorbidades crônicas e ampla exposição a antibioticoterapia (CORCIONE et al., 2018; JAHANSHIRI et al., 2018; MIRANDA-CADENA et al., 2018; SANGARÉ et al., 2018).

Um fato preocupante são as taxas de mortalidade dessa complicação que permanecem inalteradas e elevadas há anos. Assim sendo, a CI é uma das principais causas de mortalidade em todo o mundo, tornando-se, portanto, um problema de saúde pública persistente. Somando-se a isto, alguns estudos vêm demonstrando que as espécies de *Candida* tem uma grande capacidade de desenvolver resistência aos fármacos atualmente indicados e utilizados na clínica médica para o tratamento dessa enfermidade, além do mais a farmacoterapia é bastante limitada devido à dificuldade de se encontrar um fármaco eficaz e de baixa ou nenhuma toxicidade as células do hospedeiro (PFALLER; DIEKEMA, 2007; SILVA et al., 2012; MORACE; PERDONI; BORGHI, 2014; QUINDOS, 2014; NEVES-JUNIOR et al., 2015; SADEGHI et al., 2018; CHEW et al., 2019; EL-HOUSSAINI et al., 2019).

Devido as problemáticas em questão, a pesquisa por novos agentes terapêuticos antimicóticos para tratar as infecções por *Candida* spp. emerge no meio científico. Os princípios ativos dos produtos naturais destacam-se neste viés analítico, pois acredita-se que estes serão a solução para a problemática em questão. Observa-se que as plantas pertencentes à família Myrtaceae estão sendo cada vez mais estudadas, pois caracterizam-se por possuírem óleos

essenciais (Oes) com bioatividades comprovadas, incluindo antifúngica (ZIDA et al., 2017; FARAG et al., 2018; WELI et al., 2018; FIGUEIREDO et al., 2019).

A espécie *Eugenia stipitata* McVaugh., conhecida popularmente como “araçá-boi”, utilizada pelas populações tradicionais no tratamento de desordens de cunho urinário e/ou respiratório, é uma espécie aromática e seu óleo essencial é uma potencial fonte de moléculas com atividades biológicas (CORRÊA et al., 2011; NERI-NUMA et al., 2013; KUMAR et al., 2016; DE ARAÚJO et al., 2019). Assim, o objetivo deste estudo foi investigar a atividade antifúngica, o mecanismo de ação e a propriedade moduladora do óleo essencial das folhas de *Eugenia stipitata* McVaugh.

## MATERIAL E MÉTODOS

### ÁREA DE COLETA

As folhas da espécie *E. stipitata* foram coletadas em área de vegetação nativa, localizada na Serra dos Paus Dóias – Chapada do Araripe, município de Exu, PE (latitude 7°21’S, longitude 39°53’W e altitude 884m), no mês de maio do ano de 2017.

### MATERIAL BOTÂNICO

O material vegetal foi identificado pela Dra. Maria Arlene Pessoa da Silva do Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular da Universidade Regional do Cariri – URCA. Exsiccatas da espécie foram produzidas e depositadas no Herbário Caririense Dárdano de Andrade Lima da Universidade acima, sob o número 13.054.

### EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL

Para obtenção do óleo das folhas de *E. stipitata* (OEES), o material vegetal foi triturado em pequenos pedaços e submetido ao método de destilação por arraste à vapor (4500g, 3h). O OE obtido foi filtrado, pesado e, em seguida, o rendimento de óleo foi calculado em % (w/w). O OE foi então armazenado em um frasco escuro e refrigerados (at + 5 °C) até o uso.

### MICRORGANISMOS

Foram utilizadas 08 cepas de *Candida* spp. obtidas da American Type Culture

Collection (ATCC) e da Netherlands Collection – Central Bureau voor Schimmelcultures (CBS) – *C. albicans* ATCC 60193 e CBS 562; *C. tropicalis* ATCC 13803 e CBS 94; *C. krusei* ATCC 6258 e CBS 73; *C. parapsilosis stricto sensu* ATCC 22019 e CBS 604. Antes de cada experimentação, as cepas de *Candida* spp. foram cultivadas em ágar batata dextrose (PDA, Himedia, Índia) e incubadas a 35 °C por 24 horas (CLSI, 2008).

#### DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA E CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) do OE de *E. stipitata* foi determinada pela técnica de microdiluição, conforme descrito anteriormente pelo Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI, 2008). Assim, foram utilizadas placas de microdiluição de 96 poços com fundo em U. Alíquotas do meio de cultura foram adicionadas aos poços e em seguida o OE foi adicionado em diluições seriadas. Logo após, o inóculo fúngico ( $0,5 - 2,5 \times 10^3$  UFC/mL) foi adicionado e as placas foram incubadas por 48 horas a 35 °C. Os resultados foram lidos por observação visual de agregados celulares no fundo dos poços. A CIM foi definida como a menor concentração de óleo que inibiu o crescimento fúngico visível.

Anfotericina B e fluconazol (Sigma-Aldrich, São Paulo, SP) foram utilizados como controle positivo nos ensaios em concentrações variando de 0,4 a 16 µg/mL. Controles de viabilidade das cepas, esterilidade média, DMSO (dimetilsulfóxido) (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) utilizados para a preparação de antifúngicos foram realizados simultaneamente com o ensaio.

A Concentração Fungicida Mínima (CFM) foi determinada subculturando, em placas Ágar Sabouraud Dextrose (HIMEDIA Laboratories Pvt. Ltd., Mumbai, Índia), o conteúdo de todos os poços com ausência de crescimento fúngico visual e incubando-as a 35 °C por 48-72 horas. A CFM foi definida como a menor concentração do OE *E. stipitata* que inibiu o crescimento visível no meio sólido (SCORZONI et al., 2016).

A razão CFM/CIM foi calculada para determinar se o OE de *E. stipitata* tinha atividade fungistática (CFM/CIM  $\geq 4$ ) ou fungicida (CFM/CIM  $< 4$ ) (SIDDIQUI et al., 2013).

#### EFEITO DO OEEES NA PAREDE CELULAR DE *Candida* spp.

A técnica de microdiluição foi realizada na presença de sorbitol (D-sorbitol anidro) (INLAB, São Paulo, Brasil), um protetor osmótico, para determinar o mecanismo de ação do

OEES na parede celular das espécies de *Candida*. A técnica foi realizada seguindo os mesmos procedimentos descritos para determinação CIM. Para este ensaio, o inóculo foi preparado com sorbitol a uma concentração final de 0,8 M. As placas foram incubadas a 35 ° C e as leituras foram realizadas 24 h e 48 h após a incubação. A caspofungina foi utilizada como controle positivo neste ensaio em uma concentração inicial de 5 µg/mL (diacetato de caspofungina – Sigma-Aldrich, São Paulo – SP), devido à sua atividade conhecida na parede celular das leveduras. A CIM na presença de sorbitol foi definida como a menor concentração da substância que inibe o crescimento microbiano visível (ESCALANTE et al., 2008; FREIRES et al., 2014).

#### EFEITO DO OEES NA BIOSÍNTESE DE ERGOSTEROL EM *Candida* spp.

Os esteróis totais foram extraídos como descrito por Moran et al. (2007) com adaptações, para estimar o mecanismo de ação de OEES na biossíntese de ergosterol em *Candida* spp. A extração foi realizada após exposição ao OEES, fluconazol (controle positivo) e anfotericina B (controle negativo) em CIM/2, CIM/4 e CIM/8, por 48 horas. Após a exposição, os inóculos foram transferidos para os tubos Eppendorf e centrifugados a 12.000 × g por 5 min e os sedimentos celulares foram suspensos em 500 µl de KOH alcoólico (60% / 20%) e incubados por 1 hora a 95 ° C em um banho d'água. Após esse período, foram adicionados 600 µl de n-hexano para isolar os esteróis. Os tubos Eppendorf foram então centrifugados a 12.000 × g por 1 min, e toda a camada orgânica superior contendo os esteróis foi misturada com 500 µl de n-hexano. As leituras de absorvância da fase orgânica de cada amostra foram realizadas a 295 nm. A quantificação do ergosterol foi realizada por comparação com a curva padrão obtida com ergosterol comercial (Sigma-Aldrich, Alemanha).

#### ENSAIO DE LIGAÇÃO AO ERGOSTEROL

O ensaio foi realizado utilizando a técnica de microdiluição, como descrito anteriormente, na presença de ergosterol exógeno (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) em concentrações crescentes de 100, 200 e 400 µg/mL para determinar o mecanismo de ação do OEES frente *Candida* spp. por ligação ao ergosterol. As placas foram incubadas a 35° C e as leituras foram realizadas após 24-48 h (ESCALANTE et al., 2008; FREIRES et al., 2014). A anfotericina B foi usada como controle positivo devido à sua atividade conhecida nas membranas celulares de leveduras, ligando-se aos esteróis de membrana e alterando a permeabilidade da membrana (PERLIN, 2011; PIERCE et al., 2013). Também foi incluído um

controle com etanol a 96% e Tween 80, que foram utilizados para a preparação de soluções de ergosterol. A CIM na presença de ergosterol foi definida como a menor concentração da substância que inibe o crescimento fúngico visível.

## AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO DO OE COM ANTIFÚNGICOS

Para a avaliação da interação entre OE de *E. stipitata* e os antifúngicos, duas concentrações subinibitórias do OE (CIM/8 e CIM/16) foram utilizadas nas análises de cada isolado (SANTOS et al., 2018). A análise de suscetibilidade antifúngica foi realizada, conforme descrito anteriormente para a determinação da CIM, com a adição de anfotericina B ou fluconazol. Células planctônicas e sésseis foram incubadas na presença da combinação do OE de *E. stipitata* e antifúngicos e incubadas por 48 horas a 35 ° C. Os resultados foram lidos por observação do crescimento fúngico visual nos poços. A CIM foi definida como a menor concentração das combinações capaz inibir o crescimento fúngico visível. Posteriormente, calculou-se o Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF) para cada combinação do OE de *E. stipitata*, a fim de avaliar a interação medicamentosa, considerada sinérgica quando  $ICIF \leq 0,5$ , indiferente quando  $0,5 < ICIF \leq 4$  e antagonista quando  $ICIF > 4$  (ODDS, 2003).

## ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

Os dados foram expressos em média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Para os ensaios que possuíam três ou mais grupos e uma única avaliação das amostras, as diferenças obtidas entre os grupos foram submetidas à análise de variância (ANOVA) de fator único, seguindo-se do teste de Student-Newman-Keuls. Foram consideradas diferenças significativas valores de  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores de CIM do OEES e dos antifúngicos padrões frente *Candida* spp. estão ilustrados na Tabela 1. Para o OEES, os valores de CIM variaram de 64 a 512  $\mu\text{g/ml}$ , e os valores de CFM variaram de 512 a maiores que 1024  $\mu\text{g/ml}$ . A relação CFM/CIM encontrada para o OEES demonstrou um provável efeito fungistático contra as espécies de leveduras testadas.

Tabela 1 – Atividade antifúngica do óleo essencial de *Eugenia stipitata* frente espécies de *Candida*.

Espécies	Cepas	AMB	FLC	OEES		
		CIM	CIM	CIM	CFM	MFC/MIC
<i>Candida albicans</i>	ATCC 60193	1	2	128	512	4
	CBS 562	0.125	1	256	1024	4
<i>Candida krusei</i>	ATCC 6258	2	4	256	> 1024	-
	CBS 573	1	8	512	> 1024	-
<i>Candida parapsilosis</i> <i>stricto sensu</i>	ATCC 22019	1	2	64	1024	16
	CBS 6045	0.5	4	256	1024	4
<i>Candida tropicalis</i>	ATCC 13803	0.06	0.5	128	1024	8
	CBS 94	0.25	1	512	> 1024	-

Fonte: Autor, 2020. AMB: Anfotericina B. FLC: Fluconazol. CIM: Concentração Inibitória Mínima ( $\mu\text{g/ml}$ ). CFM: Concentração fungicida Mínima ( $\mu\text{g/ml}$ ). ATCC: American Type Collection Culture. CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures.

Após a avaliação da atividade antifúngica, continuamos a investigar possíveis mecanismos pelos quais a viabilidade das células fúngicas foram afetadas. Os resultados mostraram que a propriedade antifúngica do OEES não está relacionada às vias de biossíntese da parede celular, porque os resultados dos testes antifúngicos permaneceram inalterados na presença ou na ausência de um protetor osmótico (sorbitol) (Tabela 2).

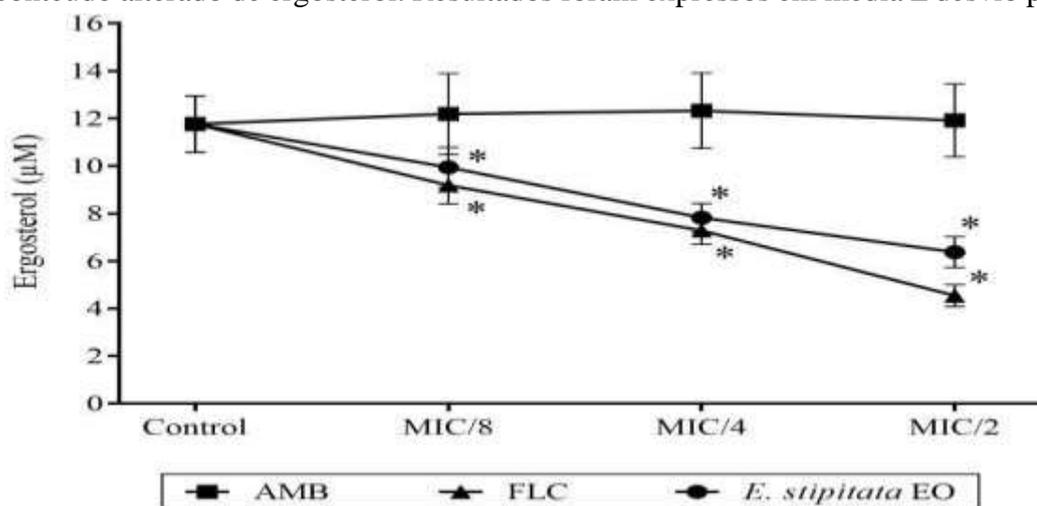
O conteúdo de ergosterol celular foi reduzido tanto pelo tratamento com fluconazol quanto após a exposição com OEES (Figura 3). No entanto, os valores de CIM de OEES não mudaram com o aumento da concentração exógena de ergosterol (Tabela 3), indicando que OEES não age por ligação ao ergosterol, mas por inibir a biossíntese do mesmo (Figura 1).

Tabela 2 – Efeito do óleo essencial de *Eugenia stipitata* em *Candida* spp. na biossíntese da parede celular (sorbitol)

CBS 94		Sem sorbitol	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Espécies	Condição	Concentrações do OEES (µg/ml)									
		2048	1024	512	256	128	64	32	16	8	4
<i>C. albicans</i>	Com sorbitol	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
ATCC 60193	Sem sorbitol	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>C. albicans</i>	Com sorbitol	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
CBS 562	Sem sorbitol	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. krusei</i>	Com sorbitol	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
ATCC 6258	Sem sorbitol	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. krusei</i>	Com sorbitol	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
CBS 573	Sem sorbitol	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. parapsilosis str. s.</i>	Com sorbitol	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
ATCC 22019	Sem sorbitol	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>C. parapsilosis str. s.</i>	Com sorbitol	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
CBS 6045	Sem sorbitol	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. tropicalis</i>	Com sorbitol	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
ATCC 13803	Sem sorbitol	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>C. tropicalis</i>	Com sorbitol	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+

Fonte: Autor, 2020. +, Crescimento fúngico. -, Sem crescimento fúngico. ATCC: American Type Collection Culture. CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures.

Figura 1 – Quantificação do conteúdo de ergosterol celular de *Candida* spp. após exposição a diferentes concentrações do OEES. A leitura foi realizada a 295 nm para detectar a concentração de ergosterol, usando AMB como controle negativo e FLC como controle positivo para o conteúdo alterado de ergosterol. Resultados foram expressos em média ± desvio padrão.



Fonte: Autor, 2020.

Tabela 3 – Efeito de diferentes concentrações de ergosterol exógeno na CIM do óleo essencial de *Eugenia stipitata* e anfotericina B contra *Candida* spp.

Cepas	CIM do OEES na ausência de ergosterol	CIM do OEES na presença de ergosterol			CIM da AMB na ausência de ergosterol	CIM da AMB na presença de ergosterol		
		100 µg/ml	200 µg/ml	400 µg/ml		100 µg/ml	200 µg/ml	400 µg/ml
<i>Candida albicans</i>								
ATCC 60193	128	128	256	128	1	8	32	64
CBS 562	256	256	256	256	0.125	1	2	16
<i>Candida krusei</i>								
ATCC 6258	256	256	256	512	2	4	32	64
CBS 573	512	256	512	512	1	2	4	64
<i>Candida parapsilosis stricto sensu</i>								
ATCC 22019	64	128	64	64	1	4	16	64
CBS 6045	256	256	256	256	0.5	4	16	32
<i>Candida tropicalis</i>								
ATCC 13803	128	128	128	128	0.06	1	2	8
CBS 94	512	512	512	256	0.25	2	16	16

Fonte: Autor, 2020. OEES: Óleo essencial de *E. stipitata*. AMB: Anfotericina B. CIM: Concentração Inibitória Mínima (µg/ml). ATCC: American Type Collection Culture. CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures.

Foi avaliada também as interações entre OE de *E. stipitata* e antifúngicos. As combinações do OEES com anfotericina B foram indiferentes para todas as cepas. No entanto, combinações com fluconazol foram sinérgicas em 87,5% (7/8) das cepas testadas, na qual foram observadas reduções na CIM em até 16 vezes. Nenhuma interação antagonista foi observada (Tabela 4)

Tabela 4 – Interação farmacológica entre o óleo essencial de *Eugenia stipitata* e antifúngicos contra *Candida* spp.

Espécies	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ )					ICIF	
	Drogas isoladas			Drogas combinadas			
	OE	AMB	FLC	OE / AMB	OE / FLC	OE + AMB	OE + FLC
<i>C. albicans</i>							
ATCC 60193	128	1	2	1256/2	8 /0,25	1,0 <sup>I</sup>	0,19 <sup>S</sup>
CBS 562	256	0,125	1	128 / 0,25	32 / 0,125	2,5 <sup>I</sup>	0,25 <sup>S</sup>
<i>C. krusei</i>							
ATCC 6258	256	2	4	128 / 2	32 / 0,5	1,5 <sup>I</sup>	0,25 <sup>S</sup>
CBS 573	512	1	8	512 / 2	128 / 1	3,0 <sup>I</sup>	0,25 <sup>S</sup>
<i>C. parapsilosis</i>							
<i>str. s.</i>							
ATCC 22019	64	1	2	128 / 0,5	8 / 0,125	2,5 <sup>I</sup>	0,19 <sup>S</sup>
CBS 6045	256	0,5	4	256 / 1	16 / 0,25	3,5 <sup>I</sup>	0,13 <sup>S</sup>
<i>C. tropicalis</i>							
ATCC 13803	128	0,06	0,5	64 / 0,125	64/ 1	2,5 <sup>I</sup>	2,5 <sup>I</sup>
CBS 94	512	0,25	1	32 / 0,5	64 / 0.125	2,1 <sup>I</sup>	0,3 <sup>S</sup>

Fonte: Autor, 2020. OE: Óleo essencial de *E. stipitata*. AMB: Anfotericina B. FLC: Fluconazol. CIM: Concentração Inibitória Mínima ( $\mu\text{g/mL}$ ). ICIF: Índice de Concentração Inibitória Fracionada. ATCC: American Type Collection Culture. CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures. S: Sinérgica. I: Indiferente.

Devido a problemática envolvida na farmacoterapia das infecções fúngicas, a pesquisa por novos ativos com produtos naturais vem ganhando destaque no meio científico. Somando-se a isso, os agentes antifúngicos naturais têm, em geral, menor custo, possuem menos efeitos colaterais e podem representar terapias alternativas para a candidíase (SILVA et al., 2012; ASDADI et al., 2015). Além do mais, os Oes são fundamentais na pesquisa por novos medicamentos, uma vez que são biodegradáveis e possuem vários compostos bioativos atuando sinergicamente (FIGUEIREDO et al., 2008).

O presente estudo é de caráter inédito para avaliação da propriedade anti-*Candida*, moduladora e mecanismo de ação do OEES. Para mais, poucos estudos foram realizados com o OE de plantas do gênero *Eugenia* para essas atividades. Assim, a comparação dos dados tornou-se dificultosa.

Em uma pesquisa realizada com o óleo essencial de *Eugenia caryophyllata*, testado frente a espécie de *Candida albicans*, apresentou CIM de 0,50  $\mu\text{g/mL}$  (RAHIMIFARD et al.,

2015). Em outros estudos o OE de *E. caryophyllata* foi capaz de inibir o crescimento de *C. albicans*, *C. guilliermondii*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. utilis*, *C. valida*, *C. parapsilosis*, *C. dubliniensis* e *C. sake* (KOUIDHI; ZMANTAR; BAKHROUF, 2010). No estudo de Bazzaz et al. (2018) com nanopartículas lipídicas sólidas contendo o OE de *E. caryophyllata*, a CIM frente as cepas de *C. albicans* foi de 0,25 µg/mL. Os estudos acima citados corroboram com os resultados obtidos nessa pesquisa, pois o OEES, mesmo que em concentrações mais altas, também foi capaz de inibir o crescimento fúngico de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*.

O OE das folhas de *Eugenia dysenterica* não foi capaz de inibir o crescimento fúngico em concentrações de até 1000 mg/mL contra qualquer uma das cepas de *Candida* testadas. (COSTA et al., 2000).

Lago e colaboradores (2011) realizaram uma pesquisa com o OE de *E. uniflora* na qual a avaliação da atividade antifúngica exibiu valores de CIM que variaram de 0,22 a 3,75 µg/mL contra as espécies de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. grubii* e *C. gattii*. Outro estudo realizado com o OE de *E. uniflora* demonstrou promissora atividade antifúngica, apresentando valores de CIM variando de 93,7 a 312,5 µg/mL frente as espécies de *C. albicans*, *C. globosa*, *C. guilhermondi*, *C. parapsilosis*, *C. lipolytica* e *C. laurenthi* (VICTORIA et al., 2012).

Santos e colaboradores (2018) conduziram um estudo para demonstrar a propriedade antifúngica do OE das folhas de *Eugenia uniflora* contra *Candida albicans*, *Candida krusei* e *Candida tropicalis*. Nos ensaios, o OE foi capaz de reduzir apenas o número de células fúngicas em altas concentrações. Os resultados dessa pesquisa não mostraram efeitos de atividade antifúngica promissora. Entretanto, outros ensaios foram realizados para verificar o efeito do OE de *E. uniflora* sobre a morfologia das células, assim foi provocado um estresse fúngico para que houvesse a formação de hifas e pseudohifas que atuam na busca de nutrientes. Nos testes, foi possível observar que o OE inibiu o crescimento das estruturas filamentosas de *C. albicans* em todas as concentrações e somente inibiu *C. tropicalis* na concentração mais alta. A combinação do OE com fluconazol resultou em interações de indiferença e antagonismo.

O presente estudo resultou em interações, em sua maioria, sinérgicas com o fluconazol, que se distingue do estudo acima citado. Estes resultados diferentes podem estar associados as diferenças na composição química dos Oes. Possivelmente, essa pesquisa é umas das precursoras na análise de interações de Oes do gênero *Eugenia* com os antifúngicos fluconazol e anfotericina B. Apesar disso, outros estudos com Oes da família Myrtaceae já foram relatados e resultaram em interações sinérgicas com o fluconazol, como o estudo de Macêdo et al. (2018) e Macêdo et al. (2019).

Em relação ao mecanismo de ação dos Oes com atividade anti-*Candida*, sabe-se que ainda não é completamente compreendido, pois este é descrito por diversas vias no meio científico, podendo inibir a biossíntese da membrana celular (ergosterol), alterar a estrutura (glucano, quitina e manano) e integridade da membrana, alterar o ciclo do ácido cítrico, inibir da síntese de ATP nas mitocôndrias e inibir as bombas de efluxo (AHMAD; KHAN; MANZOOR, 2013; CHEN et al., 2013; FREIRES et al., 2014; İŞCAN; İŞCAN; DEMIRCI, 2016; OLIVEIRA et al., 2016; NAZZARO et al., 2017).

Em um estudo com o OE de *E. caryophyllus* para investigar seu mecanismo de ação, na presença de sorbitol e utilizando cepas de *C. albicans* e *C. glabrata*, os valores de CIM para o óleo essencial diminuíram significativamente. Já ao adicionar o ergosterol exógeno, observou-se que os valores de CIM aumentaram (GUCWA et al., 2018). Esses resultados diferem do presente estudo, pois, como visto anteriormente, os resultados sugerem que o mecanismo da propriedade anti-*Candida* do OEES se dar por inibição da biossíntese de ergosterol. Poucos estudos foram realizados com Oes do gênero *Eugenia* para pesquisa de mecanismo de ação da propriedade anti-*Candida*, entretanto, já existem relatos de inibição da biossíntese do ergosterol associada a Oes de outras espécies, como no estudo de Khan e colaboradores (2010) e Cardoso e colaboradores (2016).

## CONCLUSÃO

O OE de *Eugenia stipitata* McVaugh utilizado nesse estudo apresentou uma relevante atividade antifúngica frente as espécies de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*. Esse potencial antifúngico do OEES está possivelmente ligado a inibição da biossíntese do ergosterol. Ademais, o óleo essencial interagiu sinergicamente com o antifúngico fluconazol para a maioria das cepas, exceto para uma das cepas de *C. tropicalis*. Já com o antimicótico anfotericina B, as combinações resultaram em interações indiferentes para todas as cepas. Portanto, o OE de *E. stipitata* apresentou-se como um agente terapêutico potencialmente benéfico frente as espécies do gênero *Candida*, revelando a importância de estudos como este utilizando espécies do gênero *Eugenia*, uma vez que são muito utilizadas de forma empírica para tratar uma variedade de enfermidades no território brasileiro.

## REFERÊNCIAS

AHMAD, A.; KHAN, A.; MANZOOR, N. Reversal of efflux mediated antifungal resistance underlies synergistic activity of two monoterpenes with fluconazole. **European Journal of**

**Pharmaceutical Sciences**, v. 48, n. 1-2, p. 80-86, 2013.

ALVES, P. M.; LEITE, P. H. A. S.; PEREIRA, J. V.; PEREIRA, L. F.; PEREIRA, M. S.; HIGINO, J. S.; LIMA, E. O. Atividade antifúngica do extrato de *Psidium guajava* Linn.(goiabeira) sobre leveduras do gênero *Candida* da cavidade oral: uma avaliação in vitro. **Rev Bras Farmacogn**, v. 16, n. 2, p. 192-196, 2006.

ARMIJOS, C.; VALAREZO, E.; CARTUCHE, L.; ZARAGOZA, T.; FINZI, P. V.; MELLERIO, G. G.; VIDARI, G. Chemical composition and antimicrobial activity of *Myrcianthes fragrans* essential oil, a natural aromatizer of the traditional Ecuadorian beverage colada morada. **Journal of ethnopharmacology**, v. 225, p. 319-326, 2018.

ASDADI, A.; HAMDOUCH, A.; OUKACHA, A.; MOUTAJ, R.; GHARBY, S.; HARHAR, H.; EL HADEK, M.; CHEBLI, B.; HASSANI, L. I. Study on chemical analysis, antioxidant and in vitro antifungal activities of essential oil from wild *Vitex agnus-castus* L. seeds growing in area of Argan Tree of Morocco against clinical strains of *Candida* responsible for nosocomial infections. **Journal de mycologie medicale**, v. 25, n. 4, p. e118-e127, 2015.

BAZZAZ, B. S. F.; KHAMENEH, B.; NAMAZI, N.; IRANSHAHI, M.; DAVOODI, D.; GOLMOHAMMADZADEH, S. Solid lipid nanoparticles carrying *Eugenia caryophyllata* essential oil: the novel nanoparticulate systems with broad-spectrum antimicrobial activity. **Letters in applied microbiology**, v. 66, n. 6, p. 506-513, 2018.

CAMACHO-HERNÁNDEZ, I. L.; CISNEROS-RODRIGUEZ, C.; URIBE-BELTRÁN, M. J.; RIOS-MORGAN, A.; DELGADO-VARGAS, F. Antifungal activity of fruit pulp extract from *Psidium sartorianum*. **Fitoterapia**, v. 75, n. 3-4, p. 401-404, 2004.

CARDOSO, N. N.; ALVIANO, C. S.; BLANK, A. F.; ROMANOS, M. T. V.; FONSECA, B. B.; ROZENTAL, S.; ALVIANO, D. S. Synergism effect of the essential oil from *Ocimum basilicum* var. Maria Bonita and its major components with fluconazole and its influence on ergosterol biosynthesis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2016, 2016.

CHEN, Y.; ZENG, H.; TIAN, J.; BAN, X.; MA, B.; WANG, Y. Antifungal mechanism of essential oil from *Anethum graveolens* seeds against *Candida albicans*. **Journal of medical microbiology**, v. 62, n. 8, p. 1175-1183, 2013.

CHEW, K. L.; OCTAVIA, S.; LIN, R. T. P.; YAN, G. Z.; TEO, J. W. P. Delay in effective therapy in anidulafungin-resistant *Candida tropicalis* fungaemia: Potential for rapid prediction of antifungal resistance with whole-genome-sequencing. **Journal of global antimicrobial resistance**, v. 16, p. 105-107, 2019.

CLSI. **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard – Third Edition**. CLSI document M27A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards, 2008.

CORCIONE, S.; ANGILLETTA, R.; RAVIOLO, S.; FILIPPINI, C.; FOSSATI, L.; DI PERRI, G.; CAVALLO, R.; DE ROSA, F. G. Epidemiology and risk factors for mortality in bloodstream infection by CP-Kp, ESBL-E, *Candida* and CDI: a single center retrospective study. **European journal of internal medicine**, v. 48, p. 44-49, 2018.

CORRÊA, L. C.; SANTOS, C. A. F.; VIANELLO, F.; LIMA, G. P. P. Antioxidant content in guava (*Psidium guajava*) and araca (*Psidium* spp.) germplasm from different Brazilian regions. **Plant Genetic Resources**, v. 9, n. 3, p. 384-391, 2011.

CORREIA, A. F.; SILVEIRA, D.; FONSECA-BAZZO, Y. M.; MAGALHÃES, P. O.; FAGG, C. W.; DA SILVA, E. C.; NÓBREGA, Y. K. M. Activity of crude extracts from Brazilian cerrado plants against clinically relevant *Candida* species. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 16, n. 1, p. 203, 2016.

COSTA, T. R.; FERNANDES, O. F.; SANTOS, S. C.; OLIVEIRA, C. M.; LIAO, L. M.; FERRI, P. H.; ROSÁRIO, R. S. M. Antifungal activity of volatile constituents of *Eugenia dysenterica* leaf oil. **Journal of ethnopharmacology**, v. 72, n. 1-2, p. 111-117, 2000.

DE ARAÚJO, F. F.; NERI-NUMA, I. A.; FARIAS, D. P.; DA CUNHA, G. R. M. C.; PASTORE, G. M. Wild Brazilian species of *Eugenia* genera (Myrtaceae) as an innovation hotspot for food and pharmacological purposes. **Food Research International**, v. 121, p. 57-72, 2019.

EL-HOUSSAINI, H. H.; ELNABAWY, O. M.; NASSER, H. A.; ELKHATIB, W. F. Correlation between antifungal resistance and virulence factors in *Candida albicans* recovered from vaginal specimens. **Microbial pathogenesis**, v. 128, p. 13-19, 2019.

ESCALANTE, A.; GATTUSO, M.; PÉREZ, P.; ZACCHINO, S. Evidence for the mechanism of action of the antifungal phytolaccoside B isolated from *Phytolacca tetramera* Hauman. **J. Nat. Prod.**, v. 71, n. 10, p. 1720–1725, 2008.

FARAG, N. F.; EL-AHMADY, S. H.; ABDELRAHMAN, E. H.; NAUMANN, A.; SCHULZ, H.; AZZAM, S. M.; EL-KASHOURY, E. S. A. Characterization of essential oils from Myrtaceae species using ATR-IR vibrational spectroscopy coupled to chemometrics. **Industrial crops and products**, v. 124, p. 870-877, 2018.

FIGUEIREDO, A. C.; BARROSO, J. G.; PEDRO, L. G.; SCHEFFER, J. C. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 23, p. 213-226, 2008.

FIGUEIREDO, P. L. B.; PINTO, L. C.; DA COSTA, J. S.; DA SILVA, A. R. C.; MOURÃO, R. H. V.; MONTENEGRO, R. C.; DA SILVA, J. K. R.; MAIA, J. G. S. Composition, antioxidant capacity and cytotoxic activity of *Eugenia uniflora* L. chemotype-oils from the Amazon. **Journal of ethnopharmacology**, v. 232, p. 30-38, 2019.

FREIRES, I. DE A.; MURATA, R. M.; FURLETTI, V. F.; SARTORATTO, A.; DE ALENCAR, S. M.; FIGUEIRA, G. M.; DE OLIVEIRA RODRIGUES, J. A.; DUARTE, M. C. T.; ROSALEN, P. L. *Coriandrum sativum* L. (coriander) essential oil: antifungal activity and mode of action on *Candida* spp., and molecular targets affected in human whole-genome expression. **PloS One**, v. 9, n. 6, p. e99086, 2014.

GUCWA, K.; MILEWSKI, S.; DYMERSKI, T.; SZWEDA, P. Investigation of the antifungal activity and mode of action of *Thymus vulgaris*, *Citrus limonum*, *Pelargonium graveolens*, *Cinnamomum cassia*, *Ocimum basilicum*, and *Eugenia caryophyllus* essential oils. **Molecules**, v. 23, n. 5, p. 1116, 2018.

- GULLO, F. P.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; MENDES-GIANNINI, M. J. S.; MARTINS, M. B. G.; CAMARGO, F. R.; HENRICH, S. V.; MOREIRA, R. R. D. Essential oils and major compounds of *Hedychium coronarium* Koenig (Zingiberaceae) against pathogenic yeast of *Candida* and *Cryptococcus* genus. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, v. 37, n. 1, 2016.
- HO, C. L.; HSU, K. P.; TSENG, Y. H.; LIAO, P. C.; WANG, E. I. C.; JEYASHOKE, N.; SU, Y. C. Composition and antifungal activities of the leaf essential oil of *Litsea coreana* from Taiwan. **Natural Product Communications**, v. 5, n. 10, p. 1934578X1000501033, 2010.
- HO, C. L.; LIAO, P. C.; WANG, E. I. C.; SU, Y. C. Composition and antifungal activities of the leaf essential oil of *Neolitsea parvigemma* from Taiwan. **Natural product communications**, v. 6, n. 9, p. 1934578X1100600935, 2011.
- İŞCAN, G.; İŞCAN, A.; DEMIRCI, F. Anticandidal effects of thymoquinone: Mode of action determined by transmission electron microscopy (TEM). **Natural product communications**, v. 11, n. 7, p. 977-978, 2016.
- JAHANSHIRI, Z.; MANIFAR, S.; MOOSA, H.; ASGHARI-PASKIABI, F.; MAHMOODZADEH, H.; SHAMS-GAHFAROKHI, M.; RAZZAGHI-ABYANEH, M. Oropharyngeal candidiasis in head and neck cancer patients in Iran: Species identification, antifungal susceptibility and pathogenic characterization. **Journal de mycologie medicale**, v. 28, n. 2, p. 361-366, 2018.
- KARMELING, J.P.; VERLUIJS, C.; SCHAUER, R. **Carbohydrate R.**, v.41, p. 7-17, 1975.
- KHAN, A.; AHMAD, A.; AKHTAR, F.; YOUSUF, S.; XESS, I.; KHAN, L. A.; MANZOOR, N. *Ocimum sanctum* essential oil and its active principles exert their antifungal activity by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity. **Research in microbiology**, v. 161, n. 10, p. 816-823, 2010.
- KIM, S.; LEE, S.; HONG, C.; CHO, S.; PARK, M.; CHOI, I. Antifungal effect of elemol and eudesmol from *Cryptomeria japonica* essential oil against *Trichophyton rubrum*. **Academia Journal of Agricultural Research**, v. 4, n. 8, p. 511-517, 2016.
- KOUIDHI, B.; ZMANTAR, T.; BAKHROUF, A. Anticariogenic and cytotoxic activity of clove essential oil (*Eugenia caryophyllata*) against a large number of oral pathogens. **Annals of microbiology**, v. 60, n. 4, p. 599-604, 2010.
- KUMAR, B.; SMITA, K.; DEBUT, A.; CUMBAL, L. Extracellular green synthesis of silver nanoparticles using Amazonian fruit Araza (*Eugenia stipitata* McVaugh). **Transactions of Nonferrous Metals Society of China**, v. 26, n. 9, p. 2363-2371, 2016.
- LAGO, J. H. G.; SOUZA, E. D.; MARIANE, B.; PASCON, R.; VALLIM, M. A.; MARTINS, R. C. C.; SARTORELLI, P. Chemical and biological evaluation of essential oils from two species of Myrtaceae—*Eugenia uniflora* L. and *Plinia trunciflora* (O. Berg) Kausel. **Molecules**, v. 16, n. 12, p. 9827-9837, 2011.
- LI, S.; SHI, H.; CHANG, W.; LI, Y.; ZHANG, M.; QIAO, Y.; LOU, H. Eudesmane sesquiterpenes from *Chinese liverwort* are substrates of Cdrs and display antifungal activity by targeting Erg6 and Erg11 of *Candida albicans*. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 25, n.

20, p. 5764-5771, 2017.

MACÊDO, D. G.; SOUZA, M. M. A.; MORAIS-BRAGA, M. F. B.; COUTINHO, H. D. M.; DOS SANTOS, A. T. L.; DA CRUZ, R. P.; DA COSTA, J. G. M.; RODRIGUES, F. F. G.; QUINTANS-JUNIOR, L. J.; ALMEIDA, J. R. G. S.; DE MENEZES, I. R. A. Effect of seasonality on chemical profile and antifungal activity of essential oil isolated from leaves *Psidium salutare* (Kunth) O. Berg. **PeerJ**, v. 6, p. e5476, 2018.

MACÊDO, D. G.; SOUZA, M. M. A.; MORAIS-BRAGA, M. F. B.; COUTINHO, H. D. M.; DOS SANTOS, A. T. L.; MACHADO, A. J. T.; RODRIGUES, F. F. G.; DA COSTA, J. G. M.; DE MENEZES, I. R. A. et al. Seasonality influence on the chemical composition and antifungal activity of *Psidium myrtilloides* O. Berg. **South African Journal of Botany**, v. 128, p. 9-17, 2019.

MIRANDA-CADENA, K.; MARCOS-ARIAS, C.; MATEO, E.; AGUIRRE, J. M.; QUINDÓS, G.; ERASO, E. Prevalence and antifungal susceptibility profiles of *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and their close-related species in oral candidiasis. **Archives of oral biology**, v. 95, p. 100-107, 2018.

MORACE, G.; PERDONI, F.; BORGHI, E. Antifungal drug resistance in *Candida* species. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 2, n. 4, p. 254-259, 2014.

MORAIS-BRAGA, M. F. B.; CARNEIRO, J. N.; MACHADO, A. J.; SALES, D. L.; BRITO, D. I.; ALBUQUERQUE, R. S.; BOLIGON, A. A.; ATHAYDE, M. L.; CALIXTO JÚNIOR, J. T.; SOUZA, D. S. L.; LIMA, E. O.; MENEZES, I. R. A.; COSTA, J. G. M.; FERREIRA, F. S.; COUTINHO, H. D. M. High-performance liquid chromatography-diode array detector, fungistatic, and anti-morphogenical analysis of extracts from *Psidium brownianum* Mart. ex DC. Against yeasts of the genus *Candida*. **International Journal of Food Properties**, v. 19, n. 8, p. 1837-1851, 2016<sup>a</sup>.

MORAIS-BRAGA, M. F. B.; SALES, D. L.; CARNEIRO, J. N. P.; MACHADO, A. J. T.; DOS SANTOS, A. T. L.; DE FREITAS, M. A.; MARTINS, G. M. A. B.; LEITE, N. F.; DE MATOS, Y. M. L. S.; TINTINO, S. R.; SOUZA, D. S. L.; MENEZES, I. R. A.; RIBEIRO-FILHO, J.; COSTA, J. G. M.; COUTINHO, H. D. M. *Psidium guajava* L. and *Psidium brownianum* Mart ex DC.: Chemical composition and anti-*Candida* effect in association with fluconazole. **Microbial pathogenesis**, v. 95, p. 200-207, 2016<sup>b</sup>.

MORAN, G. P.; PINJON, E.; COLEMAN, D. C.; SULLIVAN, D. J. Analysis of drug resistance in pathogenic fungi. In: KAVANAGH, K. (Ed.). **Medical mycology: cellular and molecular techniques**. 1. ed. Chichester, England: John Wiley & Sons, p. 93-113, 2007.

NAZZARO, F.; FRATIANNI, F.; COPPOLA, R.; DE FEO, V. Essential Oils and Antifungal Activity. **Pharmaceuticals**, v. 10, n. 4, p. 86-106, 2017.

NERI-NUMA, I. A.; CARVALHO-SILVA, L. B.; MORALES, J. P.; MALTA, L. G.; MURAMOTO, M. T.; FERREIRA, J. E. M.; DE CARVALHO, J. E.; RUIZ, A. L. T. G.; MARÓSTICA JUNIOR, M. R.; PASTOREA, G. M. Evaluation of the antioxidant, antiproliferative and antimutagenic potential of araçá-boi fruit (*Eugenia stipitata* Mc Vaugh—Myrtaceae) of the Brazilian Amazon Forest. **Food Research International**, v. 50, n. 1, p. 70-76, 2013.

NEVES-JUNIOR, A.; CARTÁGENES-PINTO, A. C.; ROCHA, D. A.; SÁ, L. F.; JUNQUEIRA, M. D. L.; FERREIRA-PEREIRA, A. Prevalence and fluconazole susceptibility profile of *Candida* spp. clinical isolates in a Brazilian tertiary hospital in Minas Gerais, Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 87, n. 2, p. 1349-1359, 2015.

ODDS, F. C. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 52, n. 1, p. 1, 2003.

OLIVEIRA, L. B. S.; BATISTA, A. H. M.; FERNANDES, F. C.; SALES, G. W. P.; NOGUEIRA, N. A. P. Atividade antifúngica e possível mecanismo de ação do óleo essencial de folhas de *Ocimum gratissimum* (Linn.) sobre espécies de *Candida*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, n. 2, p. 511-523, 2016.

PERIC, M.; RAJKOVIC, K.; LEMIC, A. M.; ZIVKOVIC, R.; ARSENIJEVIC, V. A. Development and validation of mathematical models for testing antifungal activity of different essential oils against *Candida* species. **Archives of Oral Biology**, v. 98, p. 258-264, 2019.

PERLIN, D. S. Current perspectives on echinocandin class drugs. **Future Microbiol.**, v. 6, n. 4, p. 441-457, 2011.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. **Clinical microbiology reviews**, v. 20, n. 1, p. 133-163, 2007.

PIERCE, C. G.; SRINIVASAN, A.; UPPULURI, P.; RAMASUBRAMANIAN, A. K.; LOPEZ-RIBOT, J. L. Antifungal therapy with an emphasis on biofilms. **Curr. Opin. Pharmacol.**, v. 13, n. 5, p. 726-730, 2013.

QUINDÓS, G. Epidemiology of candidaemia and invasive candidiasis. A changing face. **Revista iberoamericana de micologia**, v. 31, n. 1, p. 42-48, 2014.

RAHIMIFARD, N.; SHOEIBI, S.; PAKZAD, S. R.; HAJIMEHDIPOOR, H.; SABZEVARI, O.; AJDARY, S. Antifungal activity of the essential oil of *Eugenia caryophyllata* on *Candida albicans*, *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus*. **Biomedical and Pharmacology Journal**, v. 1, n. 1, p. 43-46, 2015.

SADEGHI, G.; EBRAHIMI-RAD, M.; MOUSAVI, S. F.; SHAMS-GHAHFAROKHI, M.; RAZZAGHI-ABYANEH, M. Emergence of non-*Candida albicans* species: epidemiology, phylogeny and fluconazole susceptibility profile. **Journal de mycologie medicale**, v. 28, n. 1, p. 51-58, 2018.

SAMPAIO, M. G. V.; SANTOS, C. R. B.; VANDESMET, L. C. S.; SANTOS, B. S.; SANTOS, I. B. S.; CORREIA, M. T. S.; MARTINS, A. L. B.; SILVA, L. C. N.; MENEZES, I. R. A.; GOMEZ, M. C. V.; SILVA, M. V. Chemical composition, antioxidant and antiprotozoal activity of *Eugenia gracillima* Kiaersk. leaves essential oil. **Natural product research**, p.1-5, 2019.

SANGALLI, J.; JARDIM JÚNIOR, E. G.; BUENO, C. R. E.; JACINTO, R. C.; SIVIERI-ARAÚJO, G.; GOMES FILHO, J. E.; CINTRA, L. T. A.; DEZAN JUNIOR, E. Antimicrobial activity of *Psidium cattleianum* associated with calcium hydroxide against *Enterococcus*

faecalis and *Candida albicans*: an in vitro study. **Clinical oral investigations**, v. 22, n. 6, p. 2273-2279, 2018.

SANGARÉ, I.; SIRIMA, C.; BAMBA, S.; ZIDA, A.; CISSÉ, M.; BAZIÉ, W. W.; SANOU, S.; DAO, B.; MENAN, H.; GUIGUEMDE, R. T. Prevalence of vulvovaginal candidiasis in pregnancy at three health centers in Burkina Faso. **Journal de mycologie medicale**, v. 28, n. 1, p. 186-192, 2018.

SANTOS, J. F. S.; ROCHA, J. E.; BEZERRA, C. F.; DO NASCIMENTO SILVA, M. K.; DE MATOS, Y. M. L. S.; DE FREITAS, T. S.; DOS SANTOS, A. T. L.; DA CRUZ, R. P.; MACHADO, A. J. T.; RODRIGUES, T. H. S. Chemical composition, antifungal activity and potential anti-virulence evaluation of the *Eugenia uniflora* essential oil against *Candida* spp. **Food Chem.**, v. 261, p. 233–239, 2018.

SANTOS, C. R. B.; SILVA, M. V. **Avaliação fitoquímica e antiparasitária do óleo essencial de *Eugenia stipitata* McVaugh**. 2018. 84f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Centro de Biociências, Universidade Federal do Pernambuco. Pernambuco, 2018.

SARDI, J. D. C. O.; FREIRES, I. A.; LAZARINI, J. G.; INFANTE, J.; DE ALENCAR, S. M.; ROSALEN, P. L. Unexplored endemic fruit species from Brazil: Antibiofilm properties, insights into mode of action, and systemic toxicity of four *Eugenia* spp. **Microbial pathogenesis**, v. 105, p. 280-287, 2017.

SCORZONI, L.; SANGALLI-LEITE, F.; DE LACORTE SINGULANI, J.; COSTA-ORLANDI, C. B.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; MENDES-GIANNINI, M. J. S. Searching new antifungals: The use of in vitro and in vivo methods for evaluation of natural compounds. **J. Microbiol. Methods**, v. 123, p. 68–78, 2016.

SIDDIQUI, Z. N.; FAROOQ, F.; MUSTHAFI, T. N. M.; AHMAD, A.; KHAN, A. U. Synthesis, characterization and antimicrobial evaluation of novel halopyrazole derivatives. **J. Saudi Chem. Soc.**, v. 17, n. 2, p. 237–243, 2013.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Guanabara Koogan, 2004.

SILVA, S.; NEGRI, M.; HENRIQUES, M.; OLIVEIRA, R.; WILLIAMS, D. W.; AZEREDO, J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. **FEMS microbiology reviews**, v. 36, n. 2, p. 288-305, 2012.

SILVA, S.; NEGRI, M.; HENRIQUES, M.; OLIVEIRA, R.; WILLIAMS, D. W.; AZEREDO, J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. **FEMS microbiology reviews**, v. 36, n. 2, p. 288-305, 2012.

SILVA-ROCHA, W. P.; LEMOS, V. L. B.; FERREIRA, M. R. A.; SOARES, L. A. L.; SVIDZISNKI, T. I. E.; MILAN, E. P.; CHAVES, G. M. Effect of the crude extract of *Eugenia uniflora* in morphogenesis and secretion of hydrolytic enzymes in *Candida albicans* from the oral cavity of kidney transplant recipients. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 15, n. 1, p. 6, 2015.

SOUZA, L. B.; SILVA-ROCHA, W. P.; FERREIRA, M. R.; SOARES, L. A. L.; SVIDZINSKI, T. I.; MILAN, E. P.; CHAVES, G. M. Influence of *Eugenia uniflora* extract on adhesion to human buccal epithelial cells, biofilm formation, and cell surface hydrophobicity of *Candida* spp. from the oral cavity of kidney transplant recipients. **Molecules**, v. 23, n. 10, p. 2418, 2018.

VICTORIA, F. N.; LENARDÃO, E. J.; SAVEGNAGO, L.; PERIN, G.; JACOB, R. G.; ALVES, D.; NASCENTE, P. S. 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.

WAIKEDRE, J.; VITTURO, C. I.; MOLINA, A.; THEODORO, P. N. E. T.; SILVA, M. R. R.; ESPINDOLA, L. S.; FOURNET, A. Antifungal activity of the essential oils of *Callitris neocaledonica* and *C. sulcata* heartwood (Cupressaceae). **Chemistry & biodiversity**, v. 9, n. 3, p. 644-653, 2012.

WELI, A.; AL-KAABI, A.; AL-SABAHI, J.; SAID, S.; HOSSAIN, M. A.; AL-RIYAMI, S. Chemical composition and biological activities of the essential oils of *Psidium guajava* leaf. **Journal of King Saud University-Science**, v. 1, p. 1-6, 2018.

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**, v. 8, n. 5, p. 1-16, 2016.

XIE, C.; SUN, L.; MENG, L.; WANG, M.; XU, J.; BARTLAM, M.; GUO, Y. Sesquiterpenes from *Carpesium macrocephalum* inhibit *Candida albicans* biofilm formation and imorphism. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 25, n. 22, p. 5409-5411, 2015.

ZIDA, A.; BAMBA, S.; YACOUBA, A.; OUEDRAOGO-TRAORE, R.; GUIGUEMDÉ, R. T. Anti-*Candida albicans* natural products, sources of new antifungal drugs: A review. **Journal de mycologie medicale**, v. 27, n. 1, p. 1-19, 2017.

## 4 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nesse estudo permitem concluir que:

- Os constituintes mais abundantes do OE de *Eugenia stipitata* (OEES) analisado foram  $\beta$ -eudesmol (15,28%),  $\gamma$ -eudesmol (10,85%), elemol (10,21%), óxido de cariofileno (6,5%), cloveno (6,18%) e espatulenol (6,14%);
- O OEES apresentou uma relevante atividade antifúngica frente as espécies de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*. Os valores de MIC variaram de 64 a 512  $\mu\text{g/ml}$ , e os valores de CFM variaram de 512 a maiores que 1024  $\mu\text{g/ml}$ . A relação CFM/CIM encontrada para o OEES demonstrou um provável efeito fungistático contra as espécies de leveduras testadas;
- O potencial antifúngico do OEES está possivelmente ligado a inibição da biossíntese do ergosterol;
- As combinações do OEES com anfotericina B foram indiferentes para todas as cepas. No entanto, combinações com fluconazol foram sinérgicas em 87,5% (7/8) das cepas testadas, na qual foram observadas reduções na CIM em até 16 vezes;
- O OEES apresentou atividade Leishmanicida, porém não apresentou efeito antiparasitário relevante frente as formas epimastigotas de *T. cruzi*;
- O OEES apresentou atividade antibacteriana dependente do tipo. As bactérias Gram-positivas foram mais susceptíveis à ação do óleo;
- O OEES da pesquisa apresentou moderada citotoxicidade frente a fibroblastos;
- Foi o primeiro relato de atividade antiparasitária do OE extraído das folhas de *Eugenia stipitata* e a primeira caracterização química do óleo dessa espécie encontrada no Brasil;
- Os constituintes químicos majoritários do OE de *Eugenia gracillima* (OEEG) extraídos do bioma Caatinga foram: germacreno D (16,10%),  $\gamma$ muuroleno (15,60%), biciclogermacreno (8,53%), germacreno B (7,43%),  $\Delta$ -cadieno (6,23%) e  $\Delta$ -elemeno (6,06%);
- O OEEG apresentou atividade leishmanicida contra as formas promastigotas de *Leishmania braziliensis* e *Leishmania infantum*;
- O OEEG não possui potencial antiparasitário relevante frente às formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*;

- O OEEG não apresentou citotoxicidade em concentrações abaixo de 62,5 µg/mL frente a fibroblastos;
- A atividade antioxidante do OEEG, através do método fosfomolibdênio, foi considerada moderada (62,29%).

## REFERÊNCIAS

- ABDOLLAHY, F.; ZIAEI, H.; SHABANKHANI, B.; AZADBAKHT, M. Effect of essential oil and methanolic extract of *Myrtus communis* on *Trichomonas vaginalis*. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, p. 35-35, 2010.
- ABE, F.; NAGAFUJI, S.; YAMAUCHI, T.; OKABE, H.; MAKI, J.; HIGO, H.; AKAHANE, H.; AGUILAR, A.; JIMÉNEZ-ESTRADA, M.; REYES-CHILPA, R. Trypanocidal Constituents in Plants 1. Evaluation of Some Mexican Plants for Their Trypanocidal Activity and Active Constituents in Guaco, Roots of *Aristolochia taliscana*. **Biol. Pharm. Bull**, v. 25, n. 9, p. 1188–1191, 2002.
- ABÍLIO, V. M. F., MESQUITA, B. S.; SILVA, E. D.; CARVALHO, F. V. Q.; MACÊDO, L. L. A.; CASTRO, R. D. Antifungal activity of natural products indicated by herb sellers (raizeiros) for the treatment of oral candidiasis. **Revista Cubana de Estomatología**, v. 51, n. 3, p. 259-269, 2014.
- ALIZADEH, B.H.; FOROUMADI, A.; ARDESTANI, S.K.; POORRAJAB, F.; SHAFIEE, A. Leishmanicidal evaluation of novel synthetic chromenes. **Arch Pharm**, v. 341, p. 787–793, 2008.
- ALMEIDA, M. Z. **Plantas medicinais**. 3. ed. Bahia: EDUFBA, 2011.
- ALVES, E. S.; TRESMONDI, F.; LONGUI, E. L. Structural analysis of leaves of *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) collected in rural and urban areas, SP, Bras. **Acta Botânica Brasileira**, Belo Horizonte (MG), v. 22, p. 241-248, 2008.
- AMORIM, A. C.; LIMA, C. K.; HOVELL, A. M.; MIRANDA, A. L.; REZENDE, C. M. Antinociceptive and hypothermic evaluation of the leaf essential oil and isolated terpenoids from *Eugenia uniflora* L. (Brazilian Pitanga). **Phytomedicine**, v. 16, n. 10, p. 923-928, 2009.
- ANDRADE, D. V.; GOLLOB, K. J.; DUTRA, W. O. Acute Chagas disease: new global challenges for an old neglected disease. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 2014.
- ANDRADE, J. S.; RIBEIRO, F. C. F.; ARAGÃO, C. G.; FERREIRA, S. A. N. Adequação tecnológica de frutos da Amazônia: licor de araçá-boi (*Eugenia stipitata*) McVaugh. **Acta Amazonica**, v. 27, n. 4, p. 273-278, 1997.
- ANDRADE, S. F.; CARDOSO, L.G.V.; CARVALHO, B, J.C.T.; BASTOS, C, J.K. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of extract, fractions and populnic acid from bark wood of *Austroplenckia populnea*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, p. 464–471, 2007.
- ARANHA, E. S. P.; AZEVEDO, S. G.; REIS, G. G.; LIMA, E. S.; MACHADO, M. B.; VASCONCELLOS, M. C. Essential oils from *Eugenia* spp.: In vitro antiproliferative potential with inhibitory action of metalloproteinases. **Industrial Crops and Products**, v. 141, p. 111736, 2019.
- ARAÚJO, D. R. D.; LUCENA, E.; GOMES, J. P.; FIGUEIRÊDO, R.; SILVA, C. P. D. Characterization of ripening stages of myrtle fruit. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 38, n. 2, 2016.

ARAÚJO, F. F.; NERI-NUMA, I. A.; FARIAS, D. P.; DA CUNHA, G. R. M. C.; PASTORE, G. M. Wild Brazilian species of *Eugenia* genera (Myrtaceae) as an innovation hotspot for food and pharmacological purposes. **Food Research International**, v. 121, p. 57-72, 2019.

ARAÚJO-JORGE, T. C.; CASTRO, S. L. **Doença de Chagas: manual para experimentação animal**. SciELO-Editora FIOCRUZ, p. 368, 2000.

BADKE, M. R.; BUDÓ, M. L. D.; DA SILVA, F. M.; RESSEL, L. B. Plantas medicinais: o saber sustentado na prática do cotidiano popular. **Escola Anna Nery Revista de Enfermagem**, v. 15, n. 1, p. 132-139, 2011.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils—a review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446-475, 2008.

BALDEMIR, A.; KARAMAN, Ü.; ILGUN, S.; KAÇMAZ, G.; DEMIRCI, B. Antiparasitic efficacy of *Artemisia ludoviciana* Nutt. (Asteraceae) essential oil for *Acanthamoeba castellanii*, *Leishmania infantum* and *Trichomonas vaginalis*. **Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research**, v. 52, n. 3, p. 416-425, 2018.

BARBEDO, L. S.; SGARBI, D. B. G. Candidíase. **J Bras Doenças Sex Transm**, v. 22, n. 1, p. 22-38, 2010.

BARRIO, A. G.; NOGAL-RUIZ, J. J.; MONTERO-PEREIRA, D.; RODRÍGUEZ GALLEGU, E.; ROMERO-FERNÁNDEZ, E.; ESCARIO, J. A. Biological variability in clinical isolates of *Trichomonas vaginalis*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 893-896, 2002.

BAZZAZ, B. S. F.; KHAMENEH, B.; NAMAZI, N.; IRANSHAHI, M.; DAVOODI, D.; GOLMOHAMMADZADEH, S. Solid lipid nanoparticles carrying *Eugenia caryophyllata* essential oil: the novel nanoparticulate systems with broad-spectrum antimicrobial activity. **Letters in applied microbiology**, v. 66, n. 6, p. 506-513, 2018.

BEZERRA, I. C. F.; RAMON, R. T. M.; FERREIRA, M. R. A.; SOARES, L. A. L. Chromatographic profiles of extractives from leaves of *Eugenia uniflora*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 28, n. 1, 2017.

BEZERRA, J. E. F.; LEDERMAN, I. E.; SILVA-JUNIOR, J. F.; PROENÇA, C. E. B. Araçá. In: VIEIRA, R. F.; COSTA, T. S. A.; SILVA, D. B.; SANO, S. M.; FERREIRA, F. R. (Org.). **Frutas nativas da região Centro-Oeste do Brasil**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2006. p. 42-62.

BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, v. 32, p. 588-594, 2009.

BOATTO, H. F.; MORAES, M. S. D.; MACHADO, A. P.; GIRÃO, M. J. B. C.; FISCHMAN, O. Correlação entre os resultados laboratoriais e os sinais e sintomas clínicos das pacientes com candidíase vulvovaginal e relevância dos parceiros sexuais na manutenção da infecção em São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 29, n. 2, p. 80-84, 2007.

BONNEY, K. M.; ENGMAN, D. M. Chagas heart disease pathogenesis: One mechanism or

many. **NIH Public Access.**, v. 8, n. 6, p. 510–518, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Direção de Administração e Finanças. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. **RENISUS - Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS.** 1p, 2009b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 886, de 20 de Abril de 2010. Institui a Farmácia Viva no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS). **Diário Oficial da União**, Brasília, de 22/04/2010, n. 75, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos.** Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 60 p.

BRASIL. Portaria nº 2.982 de 26 de Novembro de 2009. Aprova as normas de execução e de financiamento da assistência farmacêutica na atenção básica em saúde. **Diário Oficial da União**, Brasília, de 30/11/2009, seção 1, p. 771-773, 2009a.

BRAVO, R. S.; GIRALDO, P. C.; CARVALHO, N. S.; GABIATTI, J. R.; VAL, I. C. C.; GIRALDO, H. P. D.; PASSOS, M. D. L. Tricomoníase vaginal: o que se passa?. **DST-Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 2, p. 73-80, 2010.

CAGGIANO, G.; CORETTI, C.; BARTOLOMEO, N.; LOVERO, G.; DE GIGLIO, O.; MONTAGNA, M. T. *Candida* bloodstream infections in Italy: changing epidemiology during 16 years of surveillance. **BioMed research international**, v. 2015, p. 1-9, 2015.

CALIXTO, J. B.; SIQUEIRA JUNIOR, J. M. Desenvolvimento de medicamentos no Brasil: desafios. **Gazeta médica da Bahia**, v. 78, n. 1, 2008.

CARNEIRO, F. M.; SILVA, M. J. P. D.; BORGES, L. L.; ALBERNAZ, L. C.; COSTA, J. D. P. Tendências dos estudos com plantas medicinais no Brasil. **Revista Sapiência: Sociedade, Saberes e Práticas Educacionais**, v. 3, p. 44-75, 2014.

CARNEIRO, N. S.; ALVES, C. C. F.; ALVES, J. M.; EGEEA, M. B.; MARTINS, C. H. G.; SILVA, T. S.; BRETANHA, L. C.; BALLESTE, M. P.; MICKE, G. A.; SILVEIRA, E. V.; MIRANDA, M. L. D. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of essential oils from leaves and flowers of *Eugenia klotzschiana* Berg (Myrtaceae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 89, n. 3, p. 1907-1915, 2017.

CARNEIRO, N. S.; ALVES, J. M.; ALVES, C. C. F.; ESPERANDIM, V. R.; MIRANDA, M. L. D. Óleo essencial das flores de *Eugenia klotzschiana* (Myrtaceae): composição química e atividades tripanocida e citotóxica in vitro. **Rev Virtual Quim**, v. 9, p. 1381-1392, 2017.

CARVALHO, A. C. B. **Plantas medicinais e fitoterápicos: regulamentação sanitária e proposta de modelo de monografia para espécies vegetais oficializadas no Brasil.** 2011. 318 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências da Saúde, Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2011.

CASTRO, M. R.; VICTORIA, F. N.; OLIVEIRA, D. H.; JACOB, R. G.; SAVEGNAGO, L.;

ALVES, D. Essential oil of *Psidium cattleianum* leaves: antioxidant and antifungal activity. **Pharmaceutical biology**, v. 53, n. 2, p. 242-250, 2015.

CHAMORRO-DE-VEGA, E.; GIL-NAVARRO, M.; PEREZ-BLANCO, J. Tratamiento de la vaginitis refractaria por *Candida krusei* con anfotericina B tópica. **Medicina Clínica**, [s.l.], v. 147, n. 12, p.565-566, dez. 2016.

CHÁVES-FLORES, W. B.; CLEMENTE, C. R. Considerações sobre o araçá-boi (*Eugenia stipitata* McVaugh, Myrtaceae) na Amazônia Brasileira. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA. Florianópolis, 1984. **Anais...** Florianópolis: SBF, 1984. p. 167-177.

CHEN, Y.; CHENG, I. L.; LAI, C. C.; TANG, H. J. Echinocandins versus amphotericin B against invasive candidiasis in children and neonates: a meta-analysis of randomized controlled trials. **International journal of antimicrobial agents**, v. 53, p. 789-794, 2019.

CORCIONE, S.; ANGILLETTA, R.; RAVIOLO, S.; FILIPPINI, C.; FOSSATI, L.; PERRI, G.; CAVALLO, R.; ROSA, F. G. Epidemiology and risk factors for mortality in bloodstream infection by CP-Kp, ESBL-E, *Candida* and CDI: A single center retrospective study. **European Journal Of Internal Medicine**, [s.l.], v. 48, p.44-49, 2018.

CORZO-LEÓN, D. E.; PERALES-MARTÍNEZ, D.; MARTIN-ONRAET, A.; RIVERA-MARTÍNEZ, N.; CAMACHO-ORTIZ, A.; VILLANUEVA-LOZANO, H. Monetary costs and hospital burden associated with the management of invasive fungal infections in Mexico: a multicenter study. **The Brazilian Journal Of Infectious Diseases**, [s.l.], v. 22, n. 5, p.360-370, set. 2018.

COSTA, M. F.; JESUS, T. I.; LOPES, B. R. P.; ANGOLINI, C. F. F.; MONTAGNOLLI, A.; GOMES, L. P.; PEREIRA, G. S.; RUIZ, A. L. T. G.; CARVALHO, J. E.; EBERLIN, M. N.; SANTOS, C.; TOLEDO, K. A. *Eugenia aurata* and *Eugenia punicifolia* HBK inhibit inflammatory response by reducing neutrophil adhesion, degranulation and NET release. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 16, n. 1, p. 403, 2016.

COSTA, V. G.; QUESADA, R. M. B.; ABE, A. T. S.; FURLANETO-MAIA, L.; FURLANETO, M. C. Nosocomial bloodstream *Candida* infections in a tertiary-care hospital in South Brazil: a 4-year survey. **Mycopathologia**, v. 178, n. 3-4, p. 243-250, 2014.

COSTA, W. K.; OLIVEIRA, J. R. S.; OLIVEIRA, A. M.; SILVA SANTOS, I. B.; CUNHA, R. X.; DE FREITAS, A. F. S.; SILVA, J. W. L. M.; SILVA, V. B. G.; AGUIAR, J. C. R. O. F.; SILVA, A. G.; NAVARRO, D. M. D. A. F.; LIMA, V. L. M.; SILVA, M. V. Essential oil from *Eugenia stipitata* McVaugh leaves has antinociceptive, anti-inflammatory and antipyretic activities without showing toxicity in mice. **Industrial Crops and Products**, v. 144, p. 112059, 2020.

DAMETTO, A. C.; AGUSTONI, D.; MOREIRA, T. F.; PLAZA, C. V.; PRIETO, A. M.; SILVA, T. G. A.; SOUZA, F. O.; BORALLE, N.; SORBO, J. M.; SILVA, D. H. S.; SOARES, C. P. Chemical composition and in vitro chemoprevention assessment of *Eugenia jambolana* Lam. (Myrtaceae) fruits and leaves. **Journal of Functional Foods**, v. 36, p. 490-502, 2017.

D'ANGELIS, A. S. R.; NEGRELLE, R. R. B. Pimenta pseudocaryophyllus (Gomes) Landrum: aspectos botânicos, ecológicos, etnobotânicos e farmacológicos. **Rev. bras. Plantas med**, v.

16, n. 3, p. 607-617, 2014.

DASSONI, F.; ABEBE, Z.; NAAFS, B.; MORRONE, A. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis resembling borderline-tuberculoid leprosy: a new clinical presentation?. **Acta Dermato-Venereologica**, v. 93, p. 74-77, 2013.

DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. **Plantas Medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2. ed. São Paulo: Editora Unesp, 2002.

DIDWANIA, N.; SHADAB, M.; SABUR, A.; ALI, N. Alternative to Chemotherapy - the unmet demand against leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 1-12, 2017.

DIEZMANN, S.; COX, C. J.; SCHÖNIAN, G.; VILGALYS, R. J.; MITCHELL, T. G. Phylogeny and evolution of medical species of *Candida* and related taxa: a multigenic analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 12, p. 5624-5635, 2004.

DINIZ, L. F. B.; SOUZA, C. D. F.; CARMO, R. F. D. Epidemiology of human visceral leishmaniasis in the urban centers of the lower-middle São Francisco Valley, Brazilian semiarid region. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 51, n. 4, p. 461-466, 2018.

DONADO-PESTANA, C. M.; SANTOS-DONADO, P. R.; DAZA, L. D.; BELCHIOR, T.; FESTUCCIA, W. T.; GENOVESE, M. I. Cagaita fruit (*Eugenia dysenterica* DC.) and obesity: Role of polyphenols on already established obesity. **Food Research International**, v. 103, p. 40-47, 2018.

DORLO, T. P.; RIJAL, S.; OSTYN, B.; DE VRIES, P. J.; SINGH, R.; BHATTARAI, N.; URANW, S.; DUJARDIN, J.; BOELAERT, M.; BEIJNEN, J. H.; HUITEMA, A. D. R. Failure of miltefosine in visceral leishmaniasis is associated with low drug exposure. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 210, p. 146-153, 2014.

DUSCHAK, V. G.; COUTO, A. S. An insight on targets and patented drugs for chemotherapy of Chagas disease. **Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery**, v. 2, n. 1, p. 19-51, 2007.

EDRIS, A. E. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. **Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives**, v. 21, n. 4, p. 308-323, 2007.

ELDIN, H. M. E.; BADAWY, A. F. In vitro anti-*Trichomonas vaginalis* activity of *Pistacia lentiscus* mastic and *Ocimum basilicum* essential oil. **Journal of parasitic diseases**, v. 39, n. 3, p. 465-473, 2015.

EMBRAPA. **Avaliação do desempenho do araçá-boi (*Eugenia stipitata* McVaugh) na região de Manaus, AM**, 1996. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/665438/avaliacao-do-desempenho-do-araca-boi-eugenia-stipitatamcvaugh-na-regiao-de-manaus-am>> Acesso em: 27 de dezembro de 2019.

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 components. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 105, p. 184-190, 2010.

FERNÁNDEZ-TRUJILLO, J. P.; HERNÁNDEZ, M. S.; CARRILLO, M.; BARRERA, J. Arazá (*Eugenia stipitata* McVaugh). In: YAHIA, E. M. (Org.). **Postharvest Biology and Technology of Tropical and Subtropical Fruits**. England: Woodhead Publishing, 2011. p. 98-117.

FERRAZ, M. L.; GAZZINELLI, R. T.; ALVES, R. O.; URBINA, J. A.; ROMANHA, A. J. The anti-*Trypanosoma cruzi* activity of posaconazole in a murine model of acute Chagas' Disease is less dependent on gamma interferon than that of benznidazole. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 51, p. 1359-1364, 2007.

FERREIRA, E. I. Planejamento de fármacos na área de doença de chagas: avanços e desafios. **Revista Virtual de Química**, v.4, p. 225, 2012.

FIDELIS-DE-OLIVEIRA, P.; APARECIDA-CASTRO, S.; SILVA, D. B.; MORAIS, I. B. M.; MIRANDA, V. H. M.; GOBBI, J. I.; BISPO-DA-SILVA, L. B. Hypotensive effect of *Eugenia dysenterica* leaf extract is primarily related to its vascular action: The possible underlying mechanisms. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 251, p. 112520, 2020.

FIGUEIREDO, A. C.; BARROSO, J. G.; PEDRO, L. G.; SCHEFFER, J. C. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 23, p. 213-226, 2008.

FIGUEIREDO, P. L. B.; PINTO, L. C.; COSTA, J. S.; SILVA, J. S.; MOURÃO, R. H. V.; MONTENEGRO, R. C.; SILVA, J. K. R.; MAIA, J. G. S. Composition, antioxidant capacity and cytotoxic activity of *Eugenia uniflora* L. chemotype-oils from the Amazon. **Journal of ethnopharmacology**, v. 232, p. 30-38, 2019.

FRANCO, L. L. **As Incríveis 50 Frutas com Poderes Medicinais**. Editora Lobo, 2001.

FREIRE, I. C. M.; PÉREZ, A. L. A. L.; CARDOSO, A. M. R.; MARIZ, B.; ALMEIDA, L.; CAVALCANTI, Y. W.; PADILHA, W. W. N. Atividade antibacteriana de Óleos Essenciais sobre *Streptococcus mutans* e *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, p. 372-377, 2014.

GALENO, D. M. L.; CARVALHO, R. P.; BOLETI, A. P. A.; LIMA, A. S.; DE ALMEIDA, P. D. O.; PACHECO, C. C.; DE SOUZA, T. P.; LIMA, E. S. Extract from *Eugenia punicifolia* is an antioxidant and inhibits enzymes related to metabolic syndrome. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 172, n. 1, p. 311-324, 2014.

GHORBANI, M.; FARHOUDI, R. Leishmaniasis in humans: drug or vaccine therapy?. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 12, p. 25-40, 2018.

GIACOBBO, C. L.; ZANUZO, M.; CHIM, J.; FACHINELLO, J. C. Avaliação do teor de vitamina C em diferentes grupos de araçá-comum. **Current Agricultural Science and Technology**, v. 14, n. 1, p. 155-159, 2008.

GIARETTA, A.; TULER, A. C.; SOUZA, M. C.; VALDEMARIN, K. S.; MAZINE, F. F.; PEIXOTO, A. L. Diversidade de Myrtaceae na floresta Natural Vale. In: ROLIM, S. G.;

MENEZES, L. F. T.; SRBEK-ARAUJO, A. C. (Org.). **Floresta Atlântica de Tabuleiro: diversidade e endemismos na reserva Natural Vale**. Belo Horizonte: Rupestre, 2016. p. 247-257.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de epidemiologia**, v. 7, p. 338-349, 2004.

GOVAERTS, R.; SOBRAL, M.; ASHTON. LANDRUM, L. R.; MATSUMOTO, K.; MAZINE, F. F.; LUGHADHA, E. N.; PROENÇA, C.; SOARES-SILVA, L. H.; WILSON, P. G.; LUCAS, E. **World Checklist of Myrtaceae**. Kew: Royal Botanic Garden, 2008. 455 p.

GRAMA, D. F. **Prevalência e fatores de risco para Trichomonas vaginalis em mulheres atendidas em unidades de saúde pública no município de Uberlândia-MG e comparação entre técnicas de diagnóstico**. 2011. Dissertação (Mestre em Imunologia e Parasitologia Aplicada) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais, 2011.

GRATTAPAGLIA, D.; VAILLANCOURT, R. E.; SHEPHERD, M.; THUMMA, B. R.; FOLEY, W.; KÜLHEIM, C.; POTTS, B. M.; MYBURG, A. A. Progress in Myrtaceae genetics and genomics: *Eucalyptus* as the pivotal genus. **Tree Genetics & Genomes**, v. 8, p. 463-508, 2012.

HO, C. L.; LIAO, P. C.; WANG, E. I. C.; SU, Y. C. Composition and antifungal activities of the leaf essential oil of *Neolitsea parvigemma* from Taiwan. **Natural product communications**, v. 6, n. 9, p. 1934578X1100600935, 2011.

HOBBS, M. M.; LAPPLE, D. M.; LAWING, L. F.; SCHWEBKE, J. R.; COHEN, M. S.; SWYGARD, H.; ATASHILI, J.; LEONE, P. A.; MILLER, W. C.; SEÑA, A. C. Methods for detection of *Trichomonas vaginalis* in the male partners of infected women: implications for control of trichomoniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 11, p. 3994-3999, 2006.

IGBINWEKA, O. O.; AGHEDO, F. I.; IDUSUYI, O.; HUSSAIN, N. A. Evaluating the efficacy of topical silver nitrate and intramuscular antimonial drugs in the treatment of cutaneous leishmaniasis in Sokoto, Nigeria. **African Journal of Clinical and Experimental Microbiology**, v. 13, p. 90-97, 2012.

INTERNATIONAL UNIVERSITY STUDY CENTER - IUSC. Guia Ilustrada de Plantas Medicinales. **PROFIN**, p. 62, 2011.

JAHANSHIRI, Z.; MANIFAR, S.; MOOSA, H.; ASCHARI-PASKIABI, F.; MAHMOODZADEH, H.; SHAMS-GAHFAROKHI, M.; RAZZAGHI-ABY ANEH, M. Oropharyngeal candidiasis in head and neck cancer patients in Iran: Species identification, antifungal susceptibility and pathogenic characterization. **Journal de mycologie medicale**, v.28, n. 2, p. 361-366, 2018.

KAMHAWI, S. The yin and yang of leishmaniasis control. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, p. 1-6, 2017.

KAUFFMANN, C.; ETHUR, E. M.; AROSSI, K.; HOEHNE, L.; FREITAS, E. M.; MACHADO, G. M. C.; CAVALHEIRO, M. M. C.; FLACH, A.; COSTA, L. A. M. A.;

GNOATTO, S. C. B. 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.

KAUFFMANN, C.; ETHUR, E. M.; BUHL, B.; SCHEIBEL, T.; MACHADO, G. M.; CAVALHEIRO, M. M. Potential antileishmanial activity of essential oils of native species from southern Brazil. **Environment and Natural Resources Research**, v. 6, p. 18-25, 2016.

KIM, S.; LEE, S.; HONG, C.; CHO, S.; PARK, M.; CHOI, I. Antifungal effect of elemol and eudesmol from *Cryptomeria japonica* essential oil against *Trichophyton rubrum*. **Academia Journal of Agricultural Research**, v. 4, n. 8, p. 511-517, 2016.

KIRKCALDY, R.D., AUGOSTINI, P., ASBEL, L.E., BERNSTEIN, K.T., KERANI, R.P., METTENBRINK, C.J., PATHELA, P., SCHWEBKE, J.R., SECOR, W.E., WORKOWSKI, K.A. *Trichomonas vaginalis* antimicrobial drug resistance in US cities, STD Surveillance Network, 2009–2010. **Emerg. Infect. Dis.** v. 18, p. 939, 2012.

KONATÉ, A.; BARRO-KIKI, P. C. M.; KASSI, K. F.; ANGORA, K. E.; VANGA-BOSSON, H.; DJOHAN, V.; BÉDIA-TANOHA, A. V.; MIÉZANA, A. J. S.; YAVOA, W.; MENANAB, E. I. H. Oropharyngeal candidiasis prevalence among HIV-infected patients at the teaching hospital of Treichville (Abidjan, Côte d'Ivoire). **Journal de mycologie medicale**, v. 27, n. 4, p. 549-553, 2017.

KONDRASHIN, A.V.; BARANOVA, A.M.; MOROZOVA, L.F.; STEPANOVA, E.V. Global trends in malaria control. Progress and topical tasks in malaria control programs. **Med Parazitol**, v. 3, n. 8, 2011.

KOUIDHI, B.; ZMANTAR, T.; BAKHROUF, A. Anticariogenic and cytotoxic activity of clove essential oil (*Eugenia caryophyllata*) against a large number of oral pathogens. **Annals of microbiology**, v. 60, n. 4, p. 599-604, 2010.

LAGO, J. H. G.; SOUZA, E. D.; MARIANE, B.; PASCON, R.; VALLIM, M. A.; MARTINS, R. C. C.; SARTORELLI, P. Chemical and biological evaluation of essential oils from two species of Myrtaceae—*Eugenia uniflora* L. and *Plinia trunciflora* (O. Berg) Kausel. **Molecules**, v. 16, n. 12, p. 9827-9837, 2011.

LAZARINI, J. G.; SARDI, J. C. O.; FRANCHIN, M.; NANI, B. D.; FREIRES, I. A.; INFANTE, J.; PASCHOAL, J. A. R.; ALENCAR, S. M.; ROSALENA, P. L. Bioprospection of *Eugenia brasiliensis*, a Brazilian native fruit, as a source of anti-inflammatory and antibiofilm compounds. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 102, p. 132-139, 2018.

LEHKER, M. W.; ALDERETE, J. F. Biology of trichomonosis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 13, p. 37-45, 2000.

LEITE, P. E. C.; LIMA-ARAÚJO, K. G.; FRANÇA, G. R.; LAGROTA-CANDIDO, J.; SANTOS, W. C.; QUIRICO-SANTOS, T. Implant of polymer containing pentacyclic triterpenes from *Eugenia puniceifolia* inhibits inflammation and activates skeletal muscle remodeling. **Archivum immunologiae et therapiae experimentalis**, v. 62, n. 6, p. 483-491,

2014.

LI, Y.; XU, J.; YUAN, C.; MA, H.; LIU, T.; LIU, F.; SEERAM, N. P.; MU, Y.; HUANG, X.; LI, L. Chemical composition and anti-hyperglycaemic effects of triterpenoid enriched *Eugenia jambolana* Lam. berry extract. **Journal of Functional Foods**, v. 28, p. 1-10, 2017.

LIMA, T. B.; SILVA, O. N.; OLIVEIRA, J. T. A.; VASCONCELOS, I. M.; SCALABRIN, F. B.; ROCHA, T. L.; GROSSI-DE-SÁ, M. F.; SILVA, L. P.; GUADAGNIN, R. V.; QUIRINO, B. F.; CASTRO, C. F. S.; LEONARDECZ, E.; FRANCO, O. L. Identification of *E. dysenterica* laxative peptide: A novel strategy in the treatment of chronic constipation and irritable bowel syndrome. **Peptides**, v. 31, n. 8, p. 1426-1433, 2010.

LIMA, I. D. O.; OLIVEIRA, R. D. A. G.; LIMA, E. D. O.; FARIAS, N. M. P.; SOUZA, E. L. D. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 2, p. 197-201, 2006.

LÔBO, K. M. S.; ATHAYDE, A. C. R.; SILVA, A. M. A.; RODRIGUES, F. F. G.; LÔBO, I. S.; BEZERRA, D. A. C.; COSTA, J. G. M. Avaliação da atividade antibacteriana e 63 prospecção fitoquímica de *Solanum paniculatum* Lam. e *Operculina hamiltonii* (G. Don) D. F. Austin & Staples, do semi-árido paraibano. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v.12, n.2, p.227- 233, 2010.

LORENZI, H. C.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002.

LUCENA, E. M. P.; MAJOR, I.; BONILIA, O. H. **Frutas da caatinga cearense**. Fortaleza: EdUECE, 2015. 156 p.

LUCHESSI, A. D.; MARÇAL, B. F.; ARAÚJO, G. F.; ULIANA, L. Z.; ROCHA, M. R. G.; PINTO, T. J. A. Monitoração de propaganda e publicidade de medicamentos: âmbito de São Paulo. **Revista Farmacêutica de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 3, 2005.

MACÊDO, D. G.; SOUZA, M. M. A.; MORAIS-BRAGA, M. F. B.; COUTINHO, H. D. M.; SANTOS, A. T. L. dos; CRUZ, R. P. da; COSTA, J. G. M. da; RODRIGUES, F. F. G.; QUINTANS-JUNIOR, L. J.; ALMEIDA, J. R. G. S.; MENEZES, I. R. A. de. Effect of seasonality on chemical profile and antifungal activity of essential oil isolated from leaves *Psidium salutare* (Kunth) O. Berg. **PeerJ**, v. 6, p. e5476, 2018.

MACHADO, E. R.; SOUZA, L. P. Tricomoniase: Assistência de enfermagem na prevenção e controle. **Ensaio e ciência: Ciências biológicas, agrárias e da saúde**, São Paulo, v. 16, n. 4, p. 229-243, 2012.

MACIEL, G. P.; TASCA, T.; CARLI, G. A. Aspectos clínicos, patogênese e diagnóstico de *Trihomonas vaginallis*. **Jornal brasileiro de patologia e medicina laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 40, n. 3, p. 152-160, junho-2004.

MAIA-ELKHOURY, A. N. S.; ALVES, W. A.; SOUSA-GOMES, M. L. D.; SENA, J. M. D.; LUNA, E. A. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. *Cad Saude Publica*, v. 24, n. 12, p. 2941-7, 2008.

- MARRA, A. R.; CAMARGO, L. F. A.; PIGNATARI, A. C. C.; SUKIENNIK, T.; BEHAR, P. R. P.; MEDEIROS, E. A. S.; RIBEIRO, J.; GIRÃO, E.; CORREA, L.; GUERRA, C.; BRITES, C.; PEREIRA, C. A. P.; CARNEIRO, I.; REIS, M.; DE SOUZA, M. A.; TRANCHESI, R.; BARATA, C. U.; M B. EDMOND, M. B. Nosocomial bloodstream infections in Brazilian hospitals: analysis of 2,563 cases from a prospective nationwide surveillance study. **Journal of clinical microbiology**, v. 49, n. 5, p. 1866-1871, 2011.
- MARTÍNEZ-DÍAZ, R. A.; IBÁÑEZ-ESCRIBANO, A.; BURILLO, J.; HERAS, L. D. L.; PRADO, G. D.; AGULLÓ-ORTUÑO, M. T.; GONZÁLEZ-COLOMA, A. Trypanocidal, trichomonocidal and cytotoxic components of cultivated *Artemisia absinthium* Linnaeus (Asteraceae) essential oil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 110, p. 693-699, 2015.
- MATTHAIYOU, D. K.; CHRISTODOULOPOULOU, T.; DIMOLOPOULOS, G. How to treat fungal infections in ICU patients. **BMC Infectious Diseases**, v. 15, p. 205-213, 2015.
- MCKERROW, J. H.; DOYLE, P. S.; ENGEL, J. C.; PODUST, L. M.; ROBERTSON, S. A.; FERREIRA, R.; SAXTON, T.; ARKIN, M.; KERR, I.D.; BRINEN, L.S.; CRAIK, C.S. Two approaches to discovering and developing new drugs for Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 263-269, 2009.
- MCVAUGH, R. Tropical American Myrtaceae. **Fieldiana Botany**, v. 29, n. 3, p. 145-228, 1956.
- MEDEIROS, J. R.; MEDEIROS, N.; MEDEIROS, H.; DAVIN, L. B.; LEWIS, N. G. Composition of the bioactive oils from the leaves of *Eugenia stipitata* McVaugh ssp. *sororia* from the Azores. **Journal of Essential Oil Research**, v. 15, p. 293-295, 2003.
- MELO, A. P. V.; ZUZA-ALVES, D. L.; DA SILVA-ROCHA, W. P.; DE SOUSA, L. F. C.; FRANCISCO, E. C.; MEDO, A. S. A.; CHAVES, G. M. Virulence factors of *Candida* spp. obtained from blood cultures of patients with candidemia attended at tertiary hospitals in Northeast Brazil. **Journal de mycologie medicale**, v. 1, p. 1-8, 2019.
- MICHELIN, D. C. **Estudo químico-farmacológico de *Operculina macrocarpa* (L.) urb. (Convolvulaceae)**. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2008.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE (BR). SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Doença de Chagas aguda no Brasil: série histórica de 2000 a 2013. **Bol Epidemiol**, v. 46, n. 21, p. 1-9, 2015.
- MIRANDA, M. L. D.; ALVES, C.; ALVES, J.; ESPERANDIM, V.; CARNEIRO, N. Óleo essencial das flores de *Eugenia klotzschiana* (Myrtaceae): sua composição química e atividades tripanocida e citotóxica in vitro. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 3, 2017.
- MIRANDA-CADENA, K.; MARCOS-ARIAS, C.; MATEO, E.; AGUIRRE, J. M.; QUINDÓS, G.; ERASO, E. Prevalence and antifungal susceptibility profiles of *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and their close-related species in oral candidiasis. **Arch Oral Biol.**, v. 95, p.100- 107, 2018.
- MITROPOULOS, P.; KONIDAS, P.; DURKIN-KONIDAS, M. New World cuta-neous

leishmaniasis: updated review of current and future diagnosis and treatment. **J Am Acad Dermatol**, v. 63, p. 309–322, 2010.

MONTEIRO, S. C.; BRANDELLI, C. L. C. **Farmacobotânica: Aspectos Teóricos e Aplicação**. Artmed Editora, 2017.

MONZOTE, L.; MONTALVO, A. M.; ALMANONNI, S.; SCULL, R.; MIRANDA, M.; ABREU, J. Activity of the essential oil from *Chenopodium ambrosioides* grown in Cuba against *Leishmania amazonensis*. **Chemotherapy**, v. 52, n. 3, p. 130-136, 2006.

MORENO, M. A.; ZAMPINI, I. C.; COSTAMAGNA, M. S.; SAYAGO, J. M.; ORDÓÑEZ, R. M.; ISLA, M. I. Phytochemical composition and antioxidant capacity of *Psidium guajava* fresh fruits and flour. **Food and Nutrition Science**, v. 5, 2014.

MUKHERJEE, P. K.; SAHA, K.; MURUGESAN, T.; MANDAL, S. C.; PAL, M.; SAHA, B. P. SCREENING of anti-diarrhoeal profile of some plant extracts of a specific region of West Bengal, India. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 60, p. 85-89, 1998.

NEVES, I. A.; REZENDE, S. R. F.; KIRK, J. M.; PONTES, E. G.; DE CARVALHO, M. G. Composition and Larvicidal Activity of Essential Oil of *Eugenia candolleana* DC. (Myrtaceae) against *Aedes aegypti*. **Rev. Virtual Quimica**, v. 9, n. 6, p. 2305-2315, 2017.

NIETO, G. Biological activities of three essential oils of the Lamiaceae family. **Medicines**, v. 4, p. 1-10, 2017.

NOBREGA, A. A.; GARCIA, M. H.; TATTO, E.; OBARA, M. T.; COSTA, E.; SOBEL, J.; ARAUJO, W. N. Oral transmission of Chagas disease by consumption of açai palm fruit, Brazil. **Emerging infectious diseases**, v. 15, n. 4, p. 653, 2009.

OGUNWANDE, I. A.; OLAWORE, N. O.; EKUNDAYO, O.; WALKER, T. M.; SCHMIDT, J. M.; SETZER, W. N. Studies on the essential oils composition, antibacterial and cytotoxicity of *Eugenia uniflora* L. **International Journal Aromather**, v. 15, p. 147-152, 2005.

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**, v. 37, n. 209, 2008.

OLIVEIRA, P. S.; CHAVES, V. C.; BONA, N. P.; SOARES, M. S. P.; CARDOSO, J. S.; VASCONCELLOS, F. A.; TAVARES, R. G.; VIZZOTTO, M.; SILVA, L. M. C. D.; GRECCO, F. B.; GAMARO, G. D.; SPANEVELLO, R. M.; LENCINA, C. L.; REGINATTO, F. H.; STEFANELLO, F. M. *Eugenia uniflora* fruit (red type) standardized extract: a potential pharmacological tool to diet-induced metabolic syndrome damage management. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 92, p. 935-941, 2017.

OMS. **Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2002-2005**. Ginebra: Organización Mundial da Saúde; 2012.

OMS. **Informe sobre la salud en el mundo 2008: La atención primaria de salud, más necesaria que nunca**. Ginebra: Organización Mundial da Saúde; 2008.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. **Leishmanioses: Informe Epidemiológico nas Américas**. Washington: Organização Pan-Americana da Saúde, 2018.

OZCELIK, S.; OZPINAR, N.; KARAKUS, S.; AKYILDIZ, F.; KARAKAYA, O. Metronidazole resistance in *Trichomonas vaginalis* determined by molecular and conventional methods. **Trop. Biomed.** v. 35, p. 188–194, 2018.

OZEK, T.; DEMIRCI, B.; BASER, K. H. C. Chemical composition of Turkish myrtle oil. **Journal of Essential Oil Research**, v. 12, n. 5, p. 541-544, 2000.

OZPINAR, H.; OZPINAR, N.; ERUYGUR, N. Effect of *Viscum album* L. ssp. austriacum (WIESP.) Vollman on metronidazole resistant and sensitive strains of *Trichomonas vaginalis*. **South African Journal of Botany**. v. 125, p. 81–85, 2019.

PAPON, N.; COURDAVAULT, V.; CLASTRE, M.; BENNETT, R. J. Emerging and emerged pathogenic *Candida* species: beyond the *Candida albicans* paradigm. **PLoS pathogens**, v. 9, n. 9, p. e1003550, 2013.

PEREIRA, K. S.; SCHMIDT, F. L.; GUARALDO, A.; FRANCO, R.; DIAS, V. L.; PASSOS, L. A. Chagas' disease as a foodborne illness. **Journal of food protection**, v. 72, n. 2, p. 441-446, 2009.

PEREIRA, N. L. F.; AQUINO, P. E. A.; JÚNIOR, J. G. A. S.; CRISTO, J. S.; VIEIRA FILHO, M. A.; MOURA, F. F.; FERREIRA, N. M. N.; SILVA, M. K. N.; NASCIMENTO, E. M.; NASCIMENTO, E. M.; CORREIA, F. M. A.; CUNHA, F. A. B.; BOLIGON, A. A.; COUTINHO, H. D. M.; RIBEIRO-FILHO, J.; MATIAS, E. F. F.; GUEDES, M. I. F. Antibacterial activity and antibiotic modulating potential of the essential oil obtained from *Eugenia jambolana* in association with led lights. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 174, p. 144-149, 2017.

PEREIRA, P. S.; MAIA, A. J.; DUARTE, A. E.; OLIVEIRA-TINTINO, C. D. M.; TINTINO, S. R.; BARROS, L. M.; VEGA-GOMEZ, M. C.; ROLÓN, M.; CORONEL, C.; COUTINHO, H. D. M.; DA SILVA, T. G. Cytotoxic and anti-kinetoplastid potential of the essential oil of *Alpinia speciosa* K. Schum. **Food and Chemical Toxicology**, v. 2, p. 1-5, 2018.

PEREIRA, P.; CEBOLA, M. J.; OLIVEIRA, M. C.; GIL, M. G. B. Antioxidant capacity and identification of bioactive compounds of *Myrtus communis* L. extract obtained by ultrasoundassisted extraction. **Journal of Food Science and Technology**, v. 54, n. 13, p. 4362-4369, 2017.

PETRIN, D.; DELGATY, K.; BHATT, R.; GARBER, G. Clinical and microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis*. **Clinical microbiology reviews**, v. 11, n. 2, p. 300-317, 1998.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. **Clinical microbiology reviews**, v. 20, n. 1, p. 133-163, 2007.

PFALLER, M. A.; MESSER, S. A.; HOLLIS, R. J.; JONES, R. N. In Vitro Activities of Posaconazole (Sch 56592) Compared with Those of Itraconazole and Fluconazole against 3,685 Clinical Isolates of *Candida* spp. and *Cryptococcus neoformans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 10, p. 2862-2864, 2001.

PINTO, A. Y. N.; VALENTE, V. C.; COURA, J. R.; VALENTE, S. A. S.; JUNQUEIRA, A. C. V.; SANTOS, L. C.; FERREIRA JR., A. G.; MACEDO, R. C. Clinical follow-up of responses to treatment with benznidazol in Amazon: a cohort study of acute Chagas disease. **PLoS One**, v. 8, n. 5, p. e64450, 2013.

POOLE, D. N.; MCCLELLAND, R. S. Global epidemiology of *Trichomonas vaginalis*. **Sexually transmitted infections**, v. 89, n. 6, p. 418-422, 2013.

PUIG-ASENSIO, M.; RUIZ-CAMPS, M. I.; FERNANDEZ-RUIZ, M.; AGUADO, J. M.; MUÑOZ, P.; VALERIO, M.; DELGADO-IRIBARREN, A.; MERINO, P.; BERECIARTUA, E.; FORTÚN, J.; CUENCA-ESTRELLA, M.; ALMIRANTE, B. Epidemiology and outcome of candidaemia in patients with oncological and haematological malignancies: results from a population-based surveillance in Spain. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 21, n. 5, p. 491, 2015.

QUEIROZ, J. M. G.; SUZUKI, M. C. M.; MOTTA, A. P. R.; NOGUEIRA, J. M. R.; CARVALHO, E. M. Popular and scientific aspects of *Eugenia* species use as herbal. **Revista Fitos**, v. 9, n. 2, p. 73-159, 2015.

RAHIMIFARD, N.; SHOEIBI, S.; PAKZAD, S. R.; HAJIMEHDIPOOR, H.; SABZEVARI, O.; AJDARY, S. Antifungal activity of the essential oil of *Eugenia caryophyllata* on *Candida albicans*, *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus*. **Biomedical and Pharmacology Journal**, v. 1, n. 1, p. 43-46, 2015.

RASSI JR, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **The Lancet**, v. 375, n. 9723, p. 1388-1402, 2010.

REBOLLO, J.; OLIVERO-VERBEL, J.; REYES, N. New agents with potential leishmanicidal activity identified by virtual screening of chemical databases: New agents with potential leishmanicidal activity. **Revista de la Universidad Industrial de Santander. Salud**, v. 45, n. 1, p. 33-40, 2013.

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J. C.; LOUZIR, H.; PIRMEZ, C.; ALEXANDER, B.; BROOKER, S. Cutaneous leishmaniasis. **The Lancet infectious diseases**, v. 7, p. 581-596, 2007.

REY, L. **Parasitologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

ROJAS, J.; PALACIOS, O.; RONCEROS, S. Efecto del aceite esencial de *Aloysia triphylla* BRITTON (cedrón) sobre el *Trypanosoma cruzi* en ratones. **Rev Peru Med Exp Salud Publica**, v. 29, v. 61-68, 2012.

ROMAGNOLO, M. B.; SOUZA, M. C. de. O gênero *Eugenia* L. (Myrtaceae) na planície de alagável do Alto Rio Paraná, Estados de Mato Grosso do Sul e Paraná, Brasil. **Acta botânica brasileira**, v. 20, n. 3, p. 529-548, 2006.

ROMERO, E. L.; MORILLA, M. J. Nanotechnological approaches against Chagas disease. **Advanced drug delivery reviews**, v. 62, n. 4-5, p. 576-588, 2010.

RYU, J.; MIN, D. *Trichomonas vaginalis* and trichomoniasis in the Republic of Korea. **The**

**Korean journal of parasitology**, v. 44, n. 2, p. 101, 2006.

SACKS, D.; KAMHAWI, S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 55, p. 453-483, 2001.

SACRAMENTO, C. K.; BARRETTO, W. S.; FARIA, J. C. Araçá-boi: uma alternativa para agroindústria. **Bahia Agrícola**, v. 8, n. 2, p. 22-24, 2008.

SAHA, S.; SUBRAHMANYAM, E. V. S.; CHANDRASHEKAR, K.; SHUBHASH, C. M.; SHASHIDARA, C. S. Evaluation of antinociceptive and anti-inflammatory activities of extract and fractions of *Eugenia jambolana* root bark and isolation of phytoconstituents. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 4, p. 651-661, 2013.

SAMPAIO, M. G. V.; SANTOS, C. R. B.; VANDESMET, L. C. S.; SANTOS, B. S.; SANTOS, I. B. S.; CORREIA, M. T. S.; MARTINS, A. L. B.; SILVA, L.C. N.; MENEZES, I. R. A.; GOMEZ, M. C. V.; SILVA, M. V. Chemical composition, antioxidant and antiprotozoal activity of *Eugenia gracillima* Kiaersk. leaves essential oil. **Natural Product Research**, v. 33, n. 24, 2019.

SANGARÉ, I.; SIRIMA, C.; BAMBA, S.; ZIDA, A.; CISSÉ, M.; BAZIÉ, W.w.; SANOU, S.; DAO, B.; MENAN, H.; GUIGUEMDÉ, R.T. Prevalence of vulvovaginal candidiasis in pregnancy at three health centers in Burkina Faso. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 28, n. 1, p.186-192, 2018.

SANGLARD, D.; ODDS, F. C. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. **The Lancet infectious diseases**, v. 2, n. 2, p. 73-85, 2002.

SANTIN, M. R.; DOS SANTOS, A. O.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P.; FERREIRA, I. C. P; UEDA-NAKAMURA, T. In vitro activity of the essential oil of *Cymbopogon citratus* and its major component (citral) on *Leishmania amazonensis*. **Parasitology research**, v. 105, n. 6, p. 1489, 2009.

SANTOS, J. F. S.; ROCHA, J. E.; BEZERRA, C. F.; DO NASCIMENTO SILVA, M. K.; DE MATOS, Y. M. L. S.; DE FREITAS, T. S.; DOS SANTOS, A. T. L.; DA CRUZ, R. P.; MACHADO, A. J. T.; RODRIGUES, T. H. S. Chemical composition, antifungal activity and potential anti-virulence evaluation of the *Eugenia uniflora* essential oil against *Candida* spp. **Food Chem.**, v. 261, p. 233–239, 2018.

SANTOS, L. C. Antônio Moniz de Souza, o ‘Homem da Natureza Brasileira’: ciência e plantas medicinais no início do século XIX. **História, Ciências, Saúde – Manguinhos**, v. 15, n. 4, p. 1025-1038, 2008.

SANTOS, V. P.; TRINDADE, L. M. P. A enfermagem no uso das plantas medicinais e da fitoterapia com ênfase na saúde pública. **Revista Científica FacMais**, v. 8, p. 16-34, 2017.

SANTURIO, J. M.; SANTURIO, D. F.; POZZATTI, P.; MORAES, C.; FRANCHIN, P. R.; ALVES, S. H. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, tomilho e canela frente a sorovares de *Salmonella enterica* de origem avícola. **Ciência Rural**, v. 37, p. 803-808, 2007.

SCHWEBKE, J. R.; BARRIENTES, F. J. Prevalence of *Trichomonas vaginalis* isolates with resistance to metronidazole and tinidazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.50, n.12, p.4209-10, 2006.

SHARIFZADEH, A.; SHOKRI, H.; ABBASZADEH, S. Interaction of carvacrol and voriconazole against drug – resistant *Candida* strains isolated from patients with candidiasis. **Journal de Mycologie Médicale**, [s.l.], v. 29, n. 1, p.44-48, 2019.

SHIOZAWA, P.; CECHI, D.; FIGUEIREDO, M. A. P.; SEKIGUCHI, L. T.; BAGNOLI, F.; LIMA, S. M. R. R. Tratamento da candidíase vaginal recorrente: revisão atualizada. **Arquivos Médicos dos Hospitais e da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo**, v. 52, n. 2, p. 48-50, 2018.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia médica à luz dos autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

SILVA, J. K. R.; ANDRADE E. H. A.; BARRETO, L. H.; SILVA, N. C. F.; RIBEIRO, A. F.; MONTENEGRO, R. C.; MAIA, J. G. S. Chemical composition of four essential oils of *Eugenia* from the Brazilian Amazon and their cytotoxic and antioxidant activity. **Medicines**, v. 4, n. 3, p. 51, 2017.

SILVA, S. M. M.; COSTA, C. R. R.; GELFUSO, G. M.; GUERRA, E. N. S.; NÓBREGA, Y. K. M.; GOMES, S. M.; MAGALHÃES, P. D. O. Wound healing effect of essential oil extracted from *Eugenia dysenterica* DC (Myrtaceae) leaves. **Molecules**, v. 24, n. 1, p. 2, 2019.

SILVA, S.; NEGRI, M.; HENRIQUES, M.; OLIVEIRA, R.; WILLIAMS, D. W.; AZEREDO, J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. **FEMS microbiology reviews**, v. 36, n. 2, p. 288-305, 2012.

SILVEIRA, A. C. Situação do controle da transmissão vetorial da doença de Chagas nas Américas. **Cadernos de saúde Pública**, v. 16, p. S35-S42, 2000.

SINGH, S.; SIVAKUMAR, R. Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. **Journal of Infection Chemotherapy**, v. 10, p. 307-315, 2004.

SIQUEIRA JR, J. F.; SEN, B. H. Fungi in endodontic infections. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 97, n. 5, p. 632-641, 2004.

SNIPES, L. J.; GAMARD, P. M.; NARCISI, E. M.; BEARD, C. B.; LEHMANN, T., SECOR, W. E. Molecular epidemiology of metronidazole resistance in a population of *Trichomonas vaginalis* clinical isolates. **J. Clin. Microbiol.** v. 38, p. 3004–3009, 2000.

SOARES, E. C. **Caracterização de aditivos para secagem de araçá-boi (*Eugenia stipitata* McVaugh) em leite de espuma**. 2009. 89 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Bahia. 2009.

SOBEL, J. D.; FARO, S.; FORCE, R. W.; FOXMAN, B.; LEDGER, W. J.; NYIRJESY, P. R.; SUMMERS, P. R. Vulvovaginal candidiasis: epidemiologic, diagnostic, and therapeutic

considerations. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 178, n. 2, p. 203-211, 1998.

SOBRAL, M.; PROENÇA, C.; SOUZA, M.; MAZINE, F.; LUCAS, E. 2015. **Myrtaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB171>>. Acesso em: 11 de março de 2019.

SOBRAL, M.; PROENÇA, C.; SOUZA, M.; MAZINE, F.; LUCAS, E. Myrtaceae. In: FORZZA, R. C. (Org.). **Catálogo de Plantas e Fungos do Brasil**. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estudio/ Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010. p. 1301-1330.

SOEIRO, M. N. C.; DANTAS, A. P.; DALIRY, A.; DA SILVA, C. F.; BATISTA, D. G.; SOUZA, E. M.; OLIVEIRA, G. M.; SALOMÃO, K.; BATISTA, M. M.; PACHECO, M.; SILVA, P. B.; SANTA-RITA, R. M.; MENNA-BARRETO, R. F. S.; BOYKIN, D. W.; DE CASTRO, S. L. Experimental chemotherapy for Chagas disease: 15 years of research contributions from in vivo and in vitro studies. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 301-310, 2009.

SOUZA, C. E. S. SILVA, A. R. P.; ROCHA, J. E.; GOMES, M. C. V.; RÓLOM, M.; CORONEL, C.; COSTA, J. G. M.; NETTO, M. L. C.; ROLIM, L. A.; COUTINHO, H. D. M. LC-MS characterization, anti-kinetoplastid and cytotoxic activities of natural products from *Eugenia jambolana* Lam. and *Eugenia uniflora*. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 7, n. 9, p. 836-841, 2017a.

SOUZA, L. I. O.; SILVA, P. C. B.; NAVARRO, D. M. A. F.; SILVA, A. G.; CORREIA, M. T. S.; DA SILVA, M. V.; DE FIGUEIREDO, R. C. B. Q. The chemical composition and trypanocidal activity of volatile oils from Brazilian Caatinga plants. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 96, p. 1055-1064, 2017b.

SOUZA, L. I. O.; SILVA, P. C. B.; NAVARRO, D. M. A. F.; SILVA, A. G.; CORREIA, M. T. S.; DA SILVA, M. V.; DE FIGUEIREDO, R. C. B. Q. The chemical composition and trypanocidal activity of volatile oils from Brazilian Caatinga plants. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 96, p. 1055-1064, 2017.

SOUZA-LIMA, R. D. C. D.; BARBOSA, M. D. G. V.; COURA, J. R.; ARCANJO, A. R. L.; NASCIMENTO, A. D. S.; FERREIRA, J. M. B. B.; GUERRA, J. A. D. O. Outbreak of acute Chagas disease associated with oral transmission in the Rio Negro region, Brazilian Amazon. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 4, p. 510-514, 2013.

SUNDAR, S.; GOYAL, N. Molecular mechanisms of antimony resistance in *Leishmania*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, p. 143-153, 2007.

SUNDAR, S.; RAI, M. Advances in the treatment of leishmaniasis. **Current Opinion in Infectious Disease**, v. 15, p. 593-598, 2002.

THOMAZ, D. V.; PEIXOTO, L. F.; DE OLIVEIRA, T. S.; FAJEMIROYE, J. O.; DA SILVA NERI, H. F.; XAVIER, C. H.; GHEDINI, P. C. Antioxidant and neuroprotective properties of *Eugenia dysenterica* leaves. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2018, 2018.

TOMIOKA, E.; BASTOS, Á. C. Infecções do trato genital inferior feminino. **Veronesi: tratado de infectologia/vol. 2**, 2006.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 6<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2015.

URBINA, J. A. Ergosterol biosynthesis and drug development for Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 311-318, 2009.

VALDEBENITO, R. G.; CAMPOS, R. J.; LARRAÍN, L. O.; AGUILERA, F. M.; KAHLER, G. C.; FERRANDO, M.; GARCÍA, R. E.; SOTOMAYOR, G. A. *Ugni molinae* Turczm "Murta, Murtilla, Uni, Murtillo". **Boletín divulgativo**, Investigadores INFOR- Fundación Chile, n.3. p.2-4, 2003.

VASCONCELOS, C. N. E. D.; SILVA, N. N. P.; BATISTA, P. N.; SOUZA, J. H. K. D. Estudo comparativo entre terapia oral e local no tratamento de corrimentos vaginais: candidíase, tricomoníase e vaginose bacteriana. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**, v. 15, n. 1, p. 123-128, 2016.

VIANNA, E. N.; MORAIS, M. H. F.; ALMEIDA, A. S. D.; SABROZA, P. C.; REIS, I. A.; DIAS, E. S.; CARNEIRO, M. Abundance of *Lutzomyia longipalpis* in urban households as risk factor of transmission of visceral leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 5, p. 302-310, 2016.

VICTORIA, F. N.; LENARDÃO, E. J.; SAVEGNAGO, L.; PERIN, G.; JACOB, R. G.; ALVES, D.; SILVA, W. P.; MOTTA, A. S.; NASCENTE, P. S. 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.

VIEIRA, P. B.; BRANDELLI, C. L. C.; VERÍSSIMO, C. D. M.; TASCA, T. Mecanismos específicos de patogenicidade de protozoários de mucosa: *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* e *Trichomonas Vaginalis*. **Clinical & Biomedical Research**, v. 32, n. 1, 2012.

VITEK, R.; NOVAIS, L. M.; TORQUATO, H. F.; PAREDES-GAMERO, E. J.; CARVALHO, M. G.; SOUSA JR, P. T.; SILVA, V. C. Chemical constituents and antileukemic activity of *Eugenia dysenterica*. **Natural product research**, v. 31, n. 16, p. 1930-1934, 2017.

WAIKEDRE, J.; VITTURO, C. I.; MOLINA, A.; THEODORO, P. N. E. T.; SILVA, M. R. R.; ESPINDOLA, L. S.; FOURNET, A. Antifungal activity of the essential oils of *Callitris neocaledonica* and *C. sulcata* heartwood (Cupressaceae). **Chemistry & biodiversity**, v. 9, n. 3, p. 644-653, 2012.

WALDRON, L. S.; FERRARI, B. C.; CHEUNG-KWOK-SANG, C.; BEGGS, P. J.; STEPHENS, N.; POWER, M. L. Molecular epidemiology and spatial distribution of a waterborne cryptosporidiosis outbreak in Australia. **Appl Environ Microbiol**, v. 77, p. 7766–7771, 2011.

WILLIAMS, D. W.; KURIYAMA, T.; SILVA, S.; MALIC, S.; LEWIS, M. A. O. *Candida* biofilms and oral candidosis: Treatment and prevention. **Periodontology 2000**, v. 55, n. 1, p. 250–265, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Doença de Chagas**. Geneva, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Incidence and Prevalence of Selected Curable Sexually Transmitted Infections-2008**. 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases: third WHO report on neglected tropical diseases 2015**. Geneva, 2015.

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.; EGEEA, 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**, v. 8, n. 5, p. 1-16, 2016.

ZAMORA, C. M. P.; TORRES, C. A.; NUÑEZ, M. B. Antimicrobial Activity and Chemical Composition of Essential Oils from Verbenaceae Species Growing in South America. **Molecules**, v. 23, p. 544, 2018.

ZIMMERMANN, J. B.; PAIVA, O. A.; COSTA, A. C. D. S. S.; DE SOUSA, A. M. G. V.; CHAGAS, A. R.; DE LIMA, A. A. C. Validade do diagnóstico clínico de candidíase vulvovaginal. **Hu revista**, v. 35, n. 1, 2009.

ZORZIN, F. M. **Avaliação da atividade de inibição de alfa-amilase e padronização do extrato aquoso da folha de *Eugenia dysenterica***. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde)—Universidade de Brasília, Brasília, 2014.