

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E
TECNOLOGIA GOIANO – IF GOIANO - CAMPUS RIO VERDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROQUÍMICA

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA E BIOATIVIDADES DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE ESPÉCIES
AROMÁTICAS DO CERRADO: *Protium ovatum*, *Campomanesia adamantium*,
*Cardiopetalum calophyllum***

Autora: Gardênia Barbosa Carrijo Rodrigues

Orientadora: Dra. Suzana Maria L. de O. Marcionilio

Coorientadora interna: Profa. Dra. Cássia Cristina Fernandes Alves

Coorientador externo: Dr. Mayker Lazaro Dantas Miranda

RIO VERDE – GO
Junho-2022

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E
TECNOLOGIA GOIANO – IF GOIANO - CAMPUS RIO VERDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROQUÍMICA

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA E BIOATIVIDADES DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE ESPÉCIES
AROMÁTICAS DO CERRADO: *Protium ovatum*, *Campomanesia adamantium*,
*Cardiopetalum calophyllum***

Dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM AGROQUÍMICA, ao Programa de Pós-Graduação em Agroquímica do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde - Área de concentração Agroquímica

Autora: Gardênia Barbosa Carrijo Rodrigues
Orientadora: Dra. Suzana Maria L. de O. Marcionilio
Coorientadora interna: Profa. Dra. Cássia Cristina Fernandes Alves
Coorientador externo: Dr. Mayker Lazaro Dantas Miranda

**RIO VERDE – GO
Junho -2022**

Sistema desenvolvido pelo ICMC/USP
Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas - Instituto Federal Goiano

Rodrigues, Gardênia Barbosa Carrijo

R696c Composição química e bioatividades de óleos essenciais extraídos de espécies aromáticas do Cerrado: *Protium ovatum*, *Campomanesia adamantium* *Cardiopetalum calophyllum*/ Gardênia Barbosa Carrijo Rodrigues; orientadora Suzana Maria L. de O. Marcionílio; co-orientadora Cássia Cristina Fernandes Alves; Co-orientador Mayker Lazaro Dantas Miranda. -- Rio Verde, 2022.
64 p.

Dissertação (Mestrado em Mestrado em Agroquímica) -
- Instituto Federal Goiano, Campus Rio Verde, 2022.

1. Atividade antifúngica. 2. *Malassezia furfur*.
3. *Cardiopetalum calophyllum*. 4. *Campomanesia*
adantium. 5. *Protium ovatum*. I. Marcionílio, Suzana
Maria L. de O., orient. II. Alves, Cássia Cristina
Fernandes, co-orient. III. Miranda, Mayker Lázaro
Dantas, co-orient. Título.

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR PRODUÇÕES TÉCNICO-CIENTÍFICAS NO REPOSITÓRIO INSTITUCIONAL DO IF GOIANO

Com base no disposto na Lei Federal nº 9.610, de 19 de fevereiro de 1998, AUTORIZO o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano a disponibilizar gratuitamente o documento em formato digital no Repositório Institucional do IF Goiano (RIIF Goiano), sem ressarcimento de direitos autorais, conforme permissão assinada abaixo, para fins de leitura, download e impressão, a título de divulgação da produção técnico-científica no IF Goiano.

IDENTIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO TÉCNICO-CIENTÍFICA

- | | |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> Tese (doutorado) | <input type="checkbox"/> Artigo científico |
| <input checked="" type="checkbox"/> Dissertação (mestrado) | <input type="checkbox"/> Capítulo de livro |
| <input type="checkbox"/> Monografia (especialização) | <input type="checkbox"/> Livro |
| <input type="checkbox"/> TCC (graduação) | <input type="checkbox"/> Trabalho apresentado em evento |

Produto técnico e educacional - Tipo:

Nome completo do autor:

Gardênia Barbosa Carrijo Rodrigues

Título do trabalho:

Matrícula:

2020203310310059

COMPOSIÇÃO QUÍMICA E BIOATIVIDADES DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE ESPÉCIES AROMÁTICAS DO

RESTRIÇÕES DE ACESSO AO DOCUMENTO

Documento confidencial: Não Sim, justifique:

Os resultados ainda não foram publicados nos periódicos, conforme exigência do programa.

Informe a data que poderá ser disponibilizado no RIIIF Goiano: **01 /01 /2024**

O documento está sujeito a registro de patente? Sim Não

O documento pode vir a ser publicado como livro? Sim Não

DECLARAÇÃO DE DISTRIBUIÇÃO NÃO-EXCLUSIVA

O(a) referido(a) autor(a) declara:

- Que o documento é seu trabalho original, detém os direitos autorais da produção técnico-científica e não infringe os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade;
- Que obteve autorização de quaisquer materiais inclusos no documento do qual não detém os direitos de autoria, para conceder ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano os direitos requeridos e que este material cujos direitos autorais são de terceiros, estão claramente identificados e reconhecidos no texto ou conteúdo do documento entregue;
- Que cumpriu quaisquer obrigações exigidas por contrato ou acordo, caso o documento entregue seja baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano.

Rio Verde

Local

15 /08 /2022

Data

Gardênia Barbosa Carrijo Rodrigues
Assinatura do autor e/ou detentor dos direitos autorais

Ciente e de acordo:

Suzane Maria Soares de Oliveira Marcionilio

Assinatura do(a) orientador(a)



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SECRETARIA DE EDUCAÇÃO PROFISSIONAL E TECNOLÓGICA
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA GOIANO

Documentos 66/2022 - NREPG-RV/CPG-RV/DPGPI-RV/CMPRV/IFGOIANO

COMPOSIÇÃO QUÍMICA E BIOATIVIDADES DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE ESPÉCIES
AROMÁTICAS DO CERRADO: *Protium ovatum*, *Campomanesia adamantium*, *Cardiopetalum
calophyllum*

Autora: Gardênia Barbosa Carrijo Rodrigues
Orientadora: Suzana Maria Loures de Oliveira Marcionílio

TITULAÇÃO: Mestre em Agroquímica - Área de Concentração Agroquímica

APROVADA em 22 de junho de 2022.

Prof. Dr. Josemar Gonçalves de
Oliveira Filho
Avaliador externo - Embrapa
Instrumentação

Prof.ª Dr.ª Leticia Valvassori
Rodrigues
Avaliadora interna - IF Goiano /
Campus Posse

Prof.ª Dr.ª Suzana Maria Loures de Oliveira Marcionílio
Presidente da Banca - IF Goiano / Campus Rio Verde

Documento assinado eletronicamente por:

- Josemar Gonçalves de Oliveira Filho, Josemar Gonçalves de Oliveira Filho - Professor Avaliador de Banca - Instituto Federal Goiano (1), em 23/06/2022 14:12:43.
- Leticia Valvassori Rodrigues, PROFESSOR ENS BASICO TECN TECNOLOGICO, em 22/06/2022 13:37:12.
- Suzana Maria Loures de Oliveira Marcionílio, COORDENADOR DE CURSO - FUC0001 - CCMAQ-RV, em 22/06/2022 12:00:23.

Este documento foi emitido pelo SUAP em 22/06/2022. Para comprovar sua autenticidade, faça a leitura do QRCode ao lado ou acesse <https://suap.ifgoiano.edu.br/autenticar-documento/> e forneça os dados abaixo:

Código Verificador: 401036

Código de Autenticação: 66a5f3e5dc



INSTITUTO FEDERAL GOIANO
Campus Rio Verde
Rodovia Sul Goiana, Km 01, Zona Rural, None, None, RIO VERDE / GO, CEP 75901-970
(64) 3620-5600

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pois sem Ele nada é possível.

A meu esposo Kleisner, por ter aceitado participar dessa jornada, que foi o mestrado comigo, por tantas coletas de manhã no cerrado, sem você teria sido muito difícil. Obrigada por tanto amor e dedicação!

Agradeço a meus pais, Antônio Carlos e Maria Madalena, por sempre incentivarem a importância do estudo e da educação. Meu querido pai, que Deus o tenha.

À minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Suzana, pelo incentivo de ingressar no mestrado, e aos meus coorientadores, Prof.^a Dr.^a Cássia, pelo imenso carinho, apoio e pelos conhecimentos passados a mim, por sua disponibilidade e por estar sempre comigo, e ao Prof. Dr. Mayker, por toda sua ajuda no desenvolvimento do trabalho, sempre disposto a ajudar.

Agradeço a minha família por me compreender quando estive ausente para me dedicar a este trabalho, meus filhos Ana Rosa, Kleisner Filho e Geovana. E a minha querida Zélia, que, por inúmeras vezes, me ajudou a lavar “toneladas” de folhas.

Ao Instituto Federal Goiano e ao Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, pela oportunidade de estudo e desenvolvimento desta pesquisa.

BIOGRAFIA DA AUTORA

Gardênia Barbosa Carrijo Rodrigues, filha de Maria Madalena Barbosa Carrijo e Antônio Carlos Rodrigues Carrijo, nasceu em 10 de maio de 1987 na cidade de Rio Verde-GO. Graduiu-se em Farmácia na Universidade Gama Filho, Rio de Janeiro-RJ. Atua como responsável técnica desde 2009 na indústria Cosméticos do Brasil, sediada na cidade de Rio Verde-GO. Em setembro de 2021 ingressou no Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, nível de Mestrado, no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Bioprospecção de compostos bioativos de espécies do cerrado	3
2.2. Óleos essenciais	5
2.3. Óleos essenciais e suas atividades biológicas.....	6
2.4. <i>Cardiophyllum calophyllum</i>	7
2.5. <i>Campomanesia adamantium</i>	9
2.6. <i>Protium ovatum</i>	10
2.7. <i>Malassezia furfur</i>	12
2.8. <i>Cândidas</i>	14
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	16
4.0 OBJETIVOS.....	19
4.1. Geral.....	19
4.2. Específicos	19
5. CAPÍTULO I.....	20
5.1. Introdução	21
5.2. MATERIAL E MÉTODOS	22
5.2.1. Material vegetal	22
5.2.2. Extração de OEs.....	23
5.2.3. Identificação química dos constituintes do OE.....	23
5.2.4. Atividade anti- <i>Malassezia furfur</i> dos óleos essenciais	24
5.2.5. Atividade anti-inflamatória dos óleos essenciais.....	24
5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
5.4. CONCLUSÕES	32
5.5 REFERÊNCIAS.....	33
6. CAPÍTULO II.....	36
6.2. Introdução	36
6.3. Resultados e Discussão.....	37
6.4. Sessão Experimental	40
6.4.1. Material Vegetal	40
6.4.2. Extração do Óleo essencial	41
6.4.3. Identificação da composição química dos OE-FV e OE-FM	41
6.4.4. Ensaio Anti- <i>Malassezia furfur</i>	42
6.4.5. Espécies de <i>Cândida</i>	43
6.4.6. Determinação da concentração inibitória mínima	43
6.4.7. Avaliação do efeito nos Biofilmes (CIMB).....	44
6.5. Conclusão.....	44
6.6 Referências.....	45
7. CONCLUSÃO GERAL	48

ÍNDICES DE TABELA

Capítulo I

Tabela 1. Constituintes Voláteis do OE-CC.....	27
Tabela 2. Constituintes voláteis do OE-CA	28
Tabela 3. Constituintes voláteis do OE-PO.....	28
Tabela 4. Atividades antifúngicas in vitro de EO-CC, EO-CA e EO-PO (MIC = µg/mL).....	31
Tabela 5. Resposta quimiotática in vitro de neutrófilos tratados com a suspensão de OE-CC.....	31
Tabela 6. Resposta quimiotática in vitro de neutrófilos tratados com a suspensão de OE-CA.....	32
Tabela 7 Resposta quimiotática in vitro de neutrófilos tratados com a suspensão de OE-PO.....	32

Capítulo II

Tabela S1. Composição química dos OEs dos frutos verdes (OE-FV) e dos frutos maduros (OE-FM) de <i>Protium ovatum</i>	39
Tabela S2 Atividade anti- <i>Malassezia furfur</i> de OE-FV e OE-FM	40
Tabela S3. Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos OE-FV e OE-FM contra espécies de <i>Cândida</i>	40
Tabela S4. Concentração Inibitória Mínima para Inibição de formação de Biofilme– CIMB dos OE-FM (capacidade de redução de $\geq 90\%$ da densidade óptica (OD)).....	40

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa do Brasil destacando o bioma Cerrado. Limite Político.....	4
Figura 2. Indivíduo de <i>Cardiopetalum calophyllum</i> (A). Ramo de <i>Cardiopetalum calophyllum</i> com flores (B). Ramo de <i>Cardiopetalum calophyllum</i> com frutos (C). Frutos de <i>Cardiopetalum calophyllum</i> (D).....	8
Figura 3. <i>C. adamantium</i> . Podem ser observadas a característica arbustiva desta espécie e a forma e coloração dos frutos (A) folhas (B), flores (C).....	10
Figura 4. Diferentes partes vegetativas de <i>Protium ovatum</i> . A: Partes áreas de <i>P. ovatum</i> durante a frutificação. B: Folhas e frutos maduros C: Frutos verdes. D: Frutos maduros.....	11
Figura 5. Culturas das leveduras <i>Malassezia furfur</i>	13
Figura 6. Couro cabeludo e fios com caspa.....	14
Figura 7. Tronco e membros superiores acometidos por dermatite ocasionada por <i>Malassezia furfur</i>	14

Capítulo I

Figura 1. Parte aérea das três espécies coletadas no Cerrado goiano.....	23
Figure 2. Estruturas químicas dos constituintes majoritários identificados em EO-CC, EO-CA e EO-PO: germacrene D (1), bicyclogermacrene (2) and γ -muurolene (3).....	27

Capítulo II

Figura S1. <i>Protium ovatum</i> frutos: Frutos verdes (esquerda) e frutos maduros (direita).....	41
---	----

LISTA DE ABREVIACÕES

OE s	leos Essenciais
OE-CC	leo Essencial de <i>Cardiopetalum calophyllum</i>
OE-CA	leo Essencial de <i>Campomanesia adamantium</i>
OE-PO	leo Essencial de <i>Protium ovatum</i>
OE-FM	leo Essencial de Frutos Maduros de <i>Protium ovatum</i>
OE-FV	leo Essencial de Frutos Verdes de <i>Protium ovatum</i>
CG-DIC	Cromatografia gasosa-deteccão de ionizao de chama
CG-EM	Cromatografia gasosa-espectrometria de massa
CIMB	Concentrao Inibitória Mínima para Inibio de formao de Biofilme
DMSO	Dimetilsulfóxido
IC50	Dose Letal em 50%
CIM	Concentrao Inibitória Mínima
CA	<i>Cardiopetalum calophyllum</i>
CC	<i>Campomanesia adamantium</i>
PO	<i>Protium ovatum</i>
PMN	Polimorfonucleares
AMB	Anfotericina B
Ce50	Concentrao da droga que provoca uma resposta eficaz em metade dos indivíduos testados.

RESUMO

RODRIGUES, G. B. C. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde, junho de 2022. **COMPOSIÇÃO QUÍMICA E BIOATIVIDADES DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE ESPÉCIES AROMÁTICAS DO CERRADO: *Protium ovatum*, *Campomanesia adamantium*, *Cardiopetalum calophyllum*.** Orientadora: Dra. Dra. Suzana Maria L. de O. Marcionilio. Coorientadores: Dra. Cássia Cristina Fernandes Alves e Dr. Mayker L. Dantas Miranda.

O Cerrado é o segundo maior bioma brasileiro, com uma vasta variedade de plantas que ainda são pouco exploradas comercial ou cientificamente e que apresentam potencial de aplicação industrial pela presença de compostos ativos em seus extratos e óleos essenciais. Várias das espécies vegetais encontradas no cerrado são muito ricas em óleos essenciais (OEs). O objetivo desse trabalho foi caracterizar e aplicar os óleos essenciais oriundos das espécies *Cardiopetalum calophyllum* (CC), *Campomanesia adamantium* (CA), *Protium ovatum* (PO) no controle dos fungos *Malassezia furfur* e diferentes espécies do gênero *Cândida*. Os OEs das folhas das espécies foram extraídos por hidrodestilação, e a identificação dos componentes químicos presentes foi feita por cromatografia gasosa com detector de chama (CG-DIC) e por cromatografia em fase gasosa acoplada ao detector de massa (CG-EM). A atividade antifúngica foi feita pelo método de microdiluição em caldo, utilizando placas estéreis com 96 poços e também a capacidade de formação de biofilme, tendo sido determinadas a Concentração Inibitória Mínima para Inibição de formação de Biofilme (CIMB) e a atividade anti-inflamatória pelo método de quimiotaxia. A análise química revelou 18 compostos nos óleos essenciais obtidos das folhas dos OE-CC, 23 compostos no OE-PO e 33 compostos no OE-CA, representando 96,2%, 96,3% e 97,9% do total dos componentes dos óleos, respectivamente. A análise química dos óleos essenciais dos frutos de *Protium ovatum* apresentou 8 compostos para os frutos verdes e 7 compostos para os frutos maduros, representando 99,88% e 99,99% do total dos componentes dos óleos, respectivamente. Dos óleos das folhas das 3 espécies, os óleos essenciais (OEs) CA e PO foram os mais ativos em relação à levedura *Malassezia furfur*, sendo que o óleo essencial da espécie CC também apresentou considerável atividade. O óleo essencial dos frutos maduros de *Protium ovatum* (OE-FM) apresentou a melhor CIM junto ao OE-CA em relação à *Malassezia furfur*, que foi de 375 µl. Enquanto o óleo essencial dos frutos verdes de *Protium ovatum* (OE-FV) apresentou CIM mais baixa, sendo, portanto, menos ativo que o OE-FM. Os OEs das folhas das espécies CC, CA e PO também apresentaram potencial

efeito anti-inflamatório, apresentando uma IC 50 de 24,4 µg / mL, 15,7 µg / mL e 32,5 µg / mL, para os OE-CC, OE-CA e OE-PO, respectivamente. Em relação à atividade concernente a diferentes espécies de cândida, as CIMs exibidas pelo OE-FM foram de 62.5 µg/mL para *Candida albicans* e *C. glabrata*, de 250 µg/mL para *C. metapsilosis* e de 250 µg/mL para *C. parapsilosis*, enquanto o OE-FV mostrou fraca atividade contra todas as cepas testadas (CIM > 1000 µg/mL). Tendo em vista os bons resultados obtidos para as quatro espécies de Cândida, a inibição de formação de biofilme (CIMB) também foi avaliada, tendo *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis* exibido o mesmo valor de CIM = 250 µg/mL, enquanto para *C. metapsilosis* o valor foi de 1000 µg/mL. O estudo dos OE-CC, OE-CA e OE-PO mostrou ser promissor para o desenvolvimento de novos tratamentos antifúngicos para patologias envolvendo a levedura *Malassezia furfur* e diferentes tipos de cândidas, porém novos estudos se fazem necessários para o aprimoramento desse conhecimento para então ser possível sua aplicação.

PALAVRAS-CHAVE: Atividade antifúngica, *Malassezia furfur*, atividade anti-inflamatória, *Candida*, *Cardiopetalum calophyllum*, *Campomanesia adamantium*, *Protium ovatum*, biofilme.

ABSTRACT

RODRIGUES, G. B. C. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, Rio Verde, GO, Brazil. June 2022. **CHEMICAL COMPOSITION AND BIOACTIVITIES OF ESSENTIAL OILS FROM AROMATIC SPECIES FOUND IN THE CERRADO: *Protium ovatum*, *Campomanesia adamantium* and *Cardiopetalum calophyllum***. Advisor: Suzana Maria L. de O. Marcionilio, Ph. D.; Coauthors: Cássia Cristina Fernandes Alves, Ph. D. and Mayker L. Dantas Miranda, Ph. D.

The *Cerrado* is the second largest Brazilian biome whose wide variety of plants has been poorly investigated both commercially and scientifically even though they exhibit potential to be applied to industries due to the active compounds found in their extracts and essential oils (EOs). Several species found in the *Cerrado* are very rich in EOs. This study aimed at characterizing and applying EOs from *Cardiopetalum calophyllum* (CC), *Campomanesia adamantium* (CA) and *Protium ovatum* (PO) to control the fungus *Malassezia furfur* and other species of the genus *Candida*. EOs were extracted from leaves by hydrodistillation while chemical compounds were identified by Gas Chromatography-Flame Ionization Detection (GC-FID) and by Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS). Antifungal activity and biofilm formation were determined by the method of broth microdilution on 96-well sterile plates, which enabled to evaluate both Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Biofilm Inhibitory Concentration (MBIC), while anti-inflammatory activity was determined by the chemotaxis assay. The chemical analysis identified 18 compounds in EOs from CC leaves, 23 compounds in PO and 33 in CA, which represented 96.2%, 96.3% and 97.9% of components, respectively. The chemical analysis of EOs from *P. ovatum* fruit exhibited 8 compounds in unripe fruit and 7 compounds in ripe ones, i. e., 99.88% and 99.99% of components found in EOs, respectively. Concerning EOs from CC, CA and PO leaves, EO-CA and EO-PO were the most active ones against the yeast *M. furfur* but EO-CC also exhibited considerable activity. EOs from *P. ovatum* (EO-PO) ripe fruit had the highest MIC, along with EO-CA, against *M. furfur*, which was 375 μ l. EOs from *P. ovatum* unripe fruit exhibited low MIC, i. e., they were less active than the ones from its ripe fruit. EOs from CC, CA and PO leaves also exhibited potential anti-inflammatory effect: their IC 50 were 24.4 μ g/mL, 15.7 μ g/mL and 32.5 μ g/mL, respectively. Regarding activities against different *Candida* species, EOs from ripe fruit exhibited MICs against *Candida albicans* (62.5 μ g/mL), *C. glabrata* (62.5 μ g/mL), *C. metapsilosis* (250 μ g/mL) and *C.*

parapsilosis (250 µg/mL), while EOs from unripe fruit had weak activity against all strains under investigation (MIC > 1000 µg/mL). Considering good results of the four *Candida* species, inhibition of biofilm formation was also evaluated and *C. albicans*, *C. glabrata* and *C. parapsilosis* exhibited MIC = 250 µg/mL, while *C. metapsilosis* showed 1000 µg/mL. The study of EO-CC, EO-CA and EO-PO has shown to be promising to develop new antifungal treatments against pathologies that involve *M. furfur* and different *Candida* species. However, further studies are needed to contribute to the knowledge of this field and its application.

KEY WORDS: Antifungal activity, *Malassezia furfur*, anti-inflammatory activity, *Candida*, *Cardiopetalum calophyllum*, *Campomanesia adamantium*, *Protium ovatum*, biofilm

1. INTRODUÇÃO

Extratos vegetais contendo compostos biologicamente ativos (bioativos) têm sido amplamente estudados, uma vez que podem ser utilizados como matéria-prima para a produção de medicamentos (COSTA et al., 2017), para aplicação na indústria de alimentos como substitutos de conservantes sintéticos ou ainda com uso combinado a ele na preservação dos alimentos (JESUS et al., 2020). Outra aplicação promissora é na indústria de cosméticos, em que os óleos essenciais têm grande aplicação nas fragrâncias, além da busca por ingredientes cada vez mais naturais, tornando-os uma boa escolha para esse tipo de produto (SHARMEEN et al., 2021).

Os óleos essenciais (OEs) consistem em um tipo específico de extrato natural, formado por uma mistura volátil composta de hidrocarbonetos, álcoois, aldeídos, ésteres, éteres, cetonas, óxidos e fenóis e se destacam por suas propriedades antimicrobianas, anti-inflamatórias, antioxidantes, entre outras (BAKKALI et al., 2008). Os óleos essenciais são geralmente caracterizados por dois ou três compostos principais (20-70%) que podem ser responsáveis por suas principais atividades biológicas, mas atividades aditivas ou sinérgicas também são frequentemente descritas (DONATO et al., 2020).

O Cerrado é o segundo maior bioma brasileiro, representando quase 24% da área total do país (IBGE, 2018). Entre suas pequenas árvores de troncos retorcidos e a vegetação rasteira, é possível encontrar uma grande variedade de plantas que têm propriedades medicinais, já utilizadas pelas comunidades que vivem nas regiões onde ocorre o bioma. Dessa forma, há diversas espécies com potencial para obtenção de extratos naturais e que ainda são pouco exploradas comercial ou cientificamente, incluindo *Cardiopetalum calophyllum*, *Campomanesia adamantium* e *Protium ovatum*.

A partir dessas espécies, OEs com propriedades tripanocidas, antifúngicas e antiparasitárias foram obtidos em pesquisas conduzidas no Laboratório de Química de Produtos Naturais do Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde, como os trabalhos realizados por Olivera et al. (2017), que estudaram a espécie *Campomanesia adamantium*, analisando a diferença de composição química do óleo essencial frente a diferentes tempos de hidrodestilação, e os trabalhos de Alves et al. (2020), que analisaram a atividade antiproliferativa dos óleos essenciais das espécies *Cardiopetalum calophyllum*, *Campomanesia adamantium* e *Protium ovatum*. Apesar do potencial desses compostos, no

entanto, ainda existe escassez de estudos que visem à aplicação desses OEs em formulações medicinais e/ou cosméticas, o que contribuiria para promover a valorização da espécie e o incentivo à sua conservação na região.

Considerando as propriedades para o combate de microrganismos observadas nos OEs das espécies *Cardiopetalum calophyllum* (OE-CC), *Campomanesia adamantium* (OE-CA) e *Protium ovatum* (OE-PO), uma possível aplicação desses OEs seria, por exemplo, para a formulação de xampus com propriedades que ajudariam no controle, por exemplo, da caspa.

A utilização de OEs com atividade antifúngica provenientes das plantas do Cerrado constituiria uma interessante ferramenta para o controle do fungo causador da caspa, o *Malassezia furfur*, de forma mais natural e economicamente atrativa e, nesse contexto, espécies que produzem quantidades significativas de OEs, como *Cardiopetalum calophyllum* (CC), *Campomanesia adamantium* (CA) e *Protium ovatum*(PO), são um importante ponto de partida na busca por compostos capazes de combatê-la. Pooja et al. (2013) descreveram os óleos de *Cinnamomun zeylanicum* (Lauraceae) e *Melaleuca alternifolia* (Myrtaceae) como ativos em relação ao fungo *Malassezia fufur*, com CIM 32 µg/ml.

Outra importante doença causada por fungos é a candidíase, doença que comumente acomete indivíduos imunocomprometidos e que se instala de forma oportunista, causando desde infecções leves até sistêmicas. Apesar de a *Candida albicans* ser a causa principal desse tipo de infecção, outras espécies conhecidas como *Candida não albicans* vêm sendo relatadas, incluindo *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata* e *Candida krusei*, as duas últimas descritas como resistentes a alguns antifúngicos tradicionais (COSTA et al., 2017).

A partir do exposto, este projeto tem como finalidade a obtenção de OEs das folhas das espécies *Cardiopetalum calophyllum* e *Campomanesia adamantium* e os OEs das folhas e frutos verdes e maduros da espécie *Protium ovatum* para verificar as propriedades antifúngicas em relação ao fungo *Malassezia furfur* e a diferentes tipos de cândidas como *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. tropicalis* e *C. orthopsilosis*. E ainda a verificação do potencial anti-inflamatório dos OEs das espécies, por ser importante conhecer esse potencial visto que a inflamação está presente no acometimento por infecções fúngicas e ser também importante a prospecção de aplicação destes ativos em formulações de xampus anticaspas, avaliando a eficácia para o combate e o controle do fungo *Malassezia furfur*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Bioprospecção de compostos bioativos de espécies do cerrado

O Brasil tem uma das maiores diversidades genéticas do mundo, englobando seis biomas principais: Floresta Amazônica, Caatinga, Pantanal, Mata Atlântica, Campos do Sul e Cerrado. Entre as savanas mundiais, o bioma Cerrado (Figura 1) é considerado o de maior diversidade vegetal, e grande parte de sua extensão está localizada no Planalto Central do Brasil, incluindo, entre outros estados da federação, o estado de Goiás (PEIXOTO et al., 2019).

O bioma Cerrado ocupa 24% do território brasileiro e abriga cerca de 12.000 espécies de plantas, 30% endêmicas dessa região, apresenta um terço da biodiversidade do Brasil e 5% do globo. Apesar de vários compostos bioativos já terem sido identificados em plantas desse bioma, o Cerrado ainda tem uma ampla biodiversidade de espécies inexploradas (JESUS et al., 2020).

O Cerrado brasileiro é considerado uma fonte rica de substâncias bioativas, possuindo diversos compostos químicos com atividades biológicas, no entanto a vegetação natural nesse bioma é ameaçada constantemente à medida que as atividades agrícolas continuam se expandindo. Cada vez mais há o interesse pelo uso da terra, principalmente pelas culturas de soja e cana-de-açúcar, que têm gerado grande perda de espécies do cerrado. Diante desse cenário, podemos prever que 31 a 34% das regiões restantes do Cerrado podem desaparecer até 2050 (AMBIENTE BRASIL, 2020).

A flora do Cerrado brasileiro representa uma das maiores diversidades taxonômicas e bioquímicas do planeta (DIAS, 2009), com grande potencial para a descoberta de novos compostos químicos com aplicações em diversos campos do conhecimento. O fato que gera interesse nos produtos encontrados na natureza é que eles têm enorme diversidade em termos de estrutura e de propriedades físico-químicas e biológicas. A diversidade molecular dos produtos naturais é muito superior àquela derivada dos processos de síntese que, apesar dos avanços consideráveis, ainda é muito limitada. Sendo assim, existe um grande potencial de descoberta de moléculas ativas presentes no óleo essencial de plantas do Cerrado (COSTA et al., 2017). A Figura 1 mostra o mapa do Brasil, destacando o bioma Cerrado.

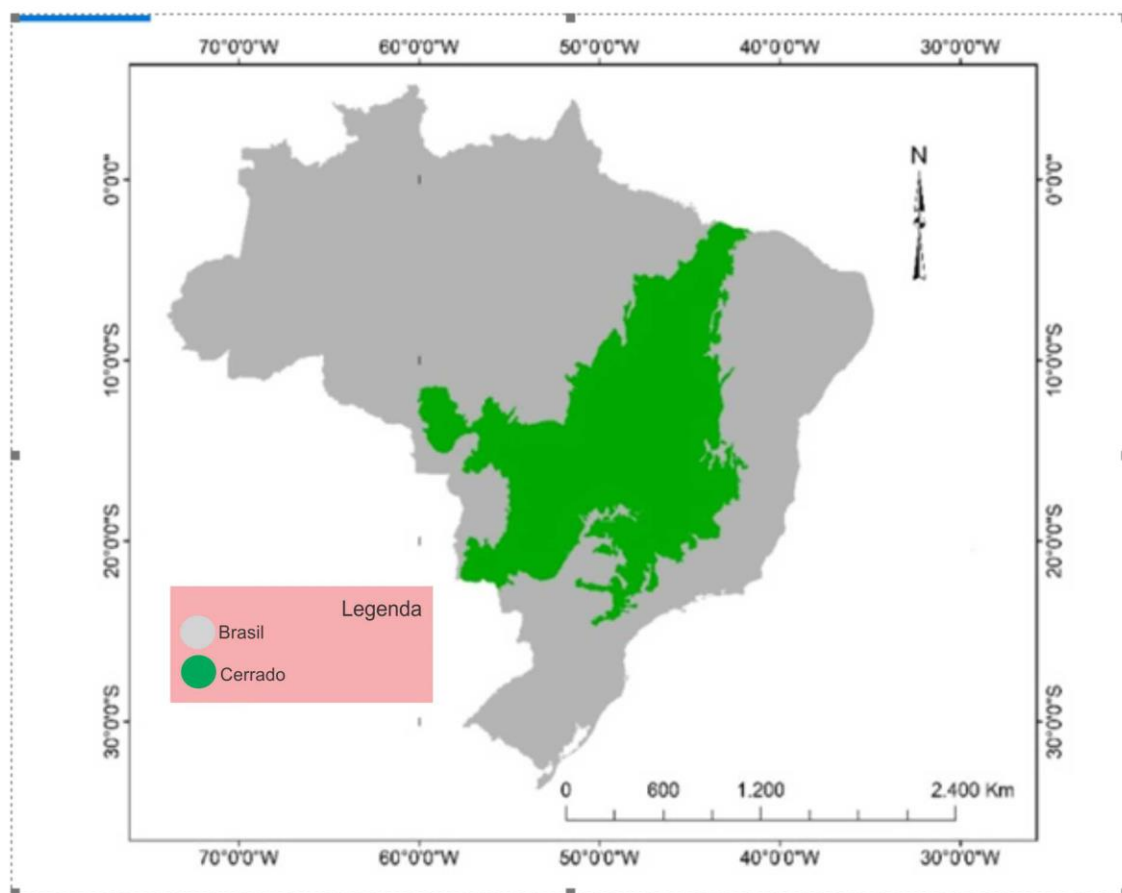


Figura 1- Mapa do Brasil destacando o bioma Cerrado. Limite Político. Fonte: Figura adaptada de Ministério do Meio Ambiente. Elaboração e Organização: Maria Gonçalves da Silva Barbalho LAPAGeo / PPSTMA / UniEVANGÉLICA.

A utilização de plantas medicinais é uma das mais antigas formas de tratamento de enfermidades e de pragas na agricultura. Seu uso vem através da sabedoria popular, e este conhecimento vem sendo transmitido de geração em geração (LOPES, 2014). As plantas são fontes de compostos biologicamente ativos que podem gerar novos produtos, alguns dos constituintes isolados de folhas, raízes, caule, flores e frutos são os princípios ativos responsáveis pelas ações analgésicas, antimicrobianas, antifúngicas, antiproliferativas e antialérgicas, entre outras (BAKKALI et al., 2008). Assim, este fato instigou a pesquisa sobre plantas medicinais em diversas áreas do conhecimento como agronomia, botânica, farmacologia e fitoquímica, visando à aplicação dessas propriedades.

Seguindo este panorama, alguns trabalhos avaliaram o potencial antibacteriano dos compostos presentes nos óleos essenciais (HYLDGAARD et al., 2012). O efeito sinérgico dos compostos presentes nos óleos essenciais, segundo os autores, melhora a sua atividade, obtendo, desta forma, diferentes modos de ação, possibilitando menor resistência

antimicrobiana. Além da atividade antibacteriana, os óleos essenciais de algumas plantas apresentam também atividade biológica contra fungos e insetos (PAVELA, 2015).

Estudos demonstraram que os óleos das espécies *Hymenaea coubaril*, *Myrioxylon peruiferum* e *Vismia guianensis* foram ativos e considerados fungicidas para diferentes espécies de cândidas (*C. albicans* e *C. krusei*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis*) com concentrações de CIM variando entre 0,625 e 1,25 µL/mL. As composições químicas desses óleos se mostraram ricas em monoterpenos e sesquiterpenos, estando o trans-cariofileno, o δ-cadineno e o óxido de cariofileno presentes nos três óleos (COSTA, et al., 2017).

2.2. Óleos essenciais

Os óleos essenciais apresentam odor forte e são voláteis, naturais e complexos, são formados por metabólitos secundários de plantas aromáticas. Normalmente são obtidos por hidrodestilação, por arraste a vapor (BAKKALI et al., 2008).

Os primeiros registros do uso dos óleos essenciais datam por volta de 1400, na Idade Média, pelos árabes. São conhecidos por suas propriedades antisséptica, bactericida, virucida e fungicida e ainda outras propriedades medicinais. Suas propriedades de aroma ou fragrância são utilizadas nos mais diversos produtos para higiene e para produção de medicamentos com propriedades analgésicas, sedativas, anti-inflamatórias, espasmolíticas, entre outras. (BAKKALI et al., 2008).

Os óleos essenciais são misturas complexas que podem conter mais de 100 compostos diferentes e pertencem a várias classes químicas. Uma variedade imensa de compostos pertencentes à família dos terpenos foi identificada até agora em óleos essenciais, principalmente de natureza terpenoide (DONATO et al., 2019).

Os óleos essenciais são misturas complexas e normalmente se destacam dois a três componentes que se apresentaram em concentração superior aos demais, que estarão presentes em menor quantidade. Quase sempre esses componentes principais irão determinar as propriedades biológicas do óleo essencial. Os terpenos e os terpenoides são os principais grupos presentes nos óleos essenciais, seguidos de outros aromáticos e constituintes alifáticos, todos caracterizados por baixo peso (BAKKALI et al., 2008).

2.3. Óleos essenciais e suas atividades biológicas

É tradicional na nossa cultura o uso de plantas medicinais para o tratamento das mais diversas enfermidades. A fitoterapia, que vem do grego e significa "terapia por plantas", é uma opção medicamentosa aceitável e acessível a todos. Os cuidados primários no tratamento de patologias através de produtos naturais representam cerca de 80% em populações dos países de terceiro mundo. Uma grande parte dos produtos farmacêuticos, em países industrializados, tem seus insumos provenientes de produtos naturais. Insumos extraídos de plantas de uso medicinal representam uma diversidade química única e são fontes de suma importância para estudos clínicos (PRESIBELLA, 2003).

O aumento dos diagnósticos de candidoses, doenças causadas pelo gênero *Candida*, talvez ocorra pelo fato de na atualidade existirem métodos mais acurados de identificação desses tipos de patógenos. A patogenicidade do gênero *Candida* se dá por diversos fatores de virulência, como a formação de biofilme e a aderência às superfícies do hospedeiro, incluídos dispositivos médicos como cateteres. As espécies de *Candida* não *albicans* são pouco conhecidas, mas apresentam um alto grau de patogenicidade, assim como a *Candida albicans* (SILVA, 2012).

O óleo essencial das folhas de *Protium ovatum* se mostrou ativo em relação ao fungo *Candida albicans*, o que o torna um candidato a ser estudado para o combate a infecções causadas não só por *C. albicans*, mas também por outros fungos leveduriformes, bem como por outras espécies de *Candida* (SOUZA, 2019).

Espécies da família Burseraceae já foram descritas na literatura com propriedades anti-inflamatórias, cicatrizantes e expectorantes, sendo *Protium heptaphyllum* uma das espécies que podemos citar dessa família com essas propriedades (MOBIN et al., 2016).

A resposta inflamatória é uma poderosa arma de defesa do sistema imunológico, que tem como objetivo principal a eliminação do agente causador e dos possíveis danos que ele pode vir a causar. Processo este caracterizado pelos sinais a serem observados, como dor, calor e rubor e, por fim, perda de função. Nesse processo, as células de defesa são ativadas (leucócitos) e saem do interior dos vasos sanguíneos em conjunto com um líquido (plasma sanguíneo) para iniciar o processo de reparação de células e tecidos (PRESIBELLA, 2003).

A quimiotaxia no processo inflamatório trata da migração dos neutrófilos em relação a um gradiente químico. Esse processo pode ocorrer de forma negativa, em que as células se movem em sentido oposto a uma substância e, de forma positiva, em direção a um gradiente químico. Certas substâncias químicas têm a habilidade de mudar a direção do movimento

celular. As substâncias capazes de induzir a quimiotaxia são chamadas de quimioatraentes e não fazem parte de uma classe específica de substância, podendo ser de fonte endógena ou exógena. Extratos de plantas como o da camomila (*Chamomilla recutita*) apresentaram notáveis efeitos sobre a quimiotaxia dos neutrófilos (PRESIBELLA, 2003).

2.4. *Cardiopetalum calophyllum*

A família Annonaceae é considerada pantropical, ou seja, ocorre em qualquer região dos trópicos, sendo a América do Sul a sua principal região de localização da diversidade, lado a lado com os outros continentes, que incluem América Central, Ásia e África. O Brasil, especificamente, é responsável por abrigar 386 espécies. As espécies representantes desse grupo são plantas lenhosas, de porte arbóreo ou arbustivo (KRINSKI, MASSAROLI, MACHADO, 2014).

A família Annonaceae compreende cerca de 2.500 espécies e 135 gêneros (CHATROU et al., 2004). Suas espécies apresentam uma grande diversidade de compostos químicos, originados do seu metabolismo secundário. No entanto, o estudo da composição química dos óleos essenciais das espécies dessa família ainda é escasso (XAVIER, 2016).

Em relação às anonáceas de interesse comercial, estão as espécies do gênero *Annona*, conhecidas popularmente com pinha, ata, cherimólia, marolo, fruta-do-conde, pinha-azedada, graviola e condessa (HEUSDEN, 1992). Esse grupo tem reconhecida importância farmacológica, atuando como matéria-prima para a produção de perfumes, cosméticos, medicina natural, além da sua importante atividade antimicrobiana e inseticida, em razão da presença das acetogeninas (ZAFRA-POLO et al., 1996; LÜMMEN, 1998). As acetogeninas são metabolitos secundários com grande potencial antitumoral (MANGAL et al., 2015).

A *C. calophyllum* (Figura 2A) é uma espécie semidecídua, que floresce entre os meses de setembro e outubro (Figura 2B) e frutifica de fevereiro a abril (Figuras 2C e 2D). Tem ampla distribuição no Brasil central, Triângulo Mineiro, Goiás e Mato Grosso, seus frutos servem como alimentos para animais silvestres, que atuam como dispersores de sementes, as flores exalam um odor característico que atrai insetos polinizadores da família Nitidulidae (LOPES e MELLO-SILVA, 2014; ELIAS, 2010; SILVA et al., 2009).

O primeiro relato na literatura sobre o óleo essencial de *C. calophyllum* e suas atividades foi feito pelos pesquisadores do Laboratório de Química de Produtos Naturais do IF Goiano Campus Rio Verde (XAVIER et al., 2016). O OE das folhas, flores e frutos da *C. calophyllum* é formado por uma mistura complexa de monoterpenos e sesquiterpenos, com

predominância do último. Os constituintes majoritários encontrados foram o espatulenol (28,78%) no OE das folhas, o germacreno-D (37,03%) e germacreno-B (13,72%) nas flores e o germacreno-D (28,19%), germacreno-B (20,90%) e espatulenol (11,53%) no óleo dos frutos (XAVIER et al., 2016).

Os óleos essenciais extraído das folhas e flores da *C. calophyllum* têm moderada atividade tripanocida e baixa atividade citotóxica, quando comparados com o benzonidazol, medicamento de referência no Brasil para o tratamento da doença de Chagas. Dessa maneira, futuramente, o óleo essencial da *C. calophyllum* pode vir a ser utilizado como um aliado no tratamento da doença de Chagas (XAVIER, 2016).



Figura 2: Indivíduo de *Cardiopetalum calophyllum* (A). Ramo de *Cardiopetalum calophyllum* com flores (B). Ramo de *Cardiopetalum calophyllum* com frutos (C). Frutos de *Cardiopetalum calophyllum* (D).

Fonte: Figura adaptada de Xavier (2016).

2.5. *Campomanesia adamantium*

A *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg (guavira, gabirola ou guabirola, Figura 3) é uma espécie de característica arbustiva decídua, de 0,5-1,5 m de altura. Tem possui folhas subcoriáceas de 3 a 10 cm de comprimento. As flores são solitárias, formadas de setembro a outubro, e os frutos de 2,0 a 2,5 cm de diâmetro amadurecem de novembro a dezembro (LORENZI et al., 2006). O tronco é tortuoso e ramificado desde a base, tem casca amarelada e descamante em placas finas.

Em trabalhos desenvolvidos no Laboratório de Química de Produtos Naturais do IF Goiano Campus Rio Verde foi constatado que o OE das folhas de *C. adamantium* coletado na região do Cerrado Goiano apresentou como constituintes majoritários os sesquiterpenos germacreno B (18,27%) e β - Cariofileno (15,70%), nos tempos de 3 e 5 horas, respectivamente. Esse estudo mostrou que as porcentagens desses constituintes podem variar de acordo com o tempo de hidrodestilação, bem como os demais componentes da composição química do OE. No entanto, o espatulenol, o óxido cariofileno e o germacreno-B foram os constituintes majoritários na maioria dos tempos testados (OLIVEIRA et al., 2017).

Na determinação da atividade antioxidante do óleo essencial das folhas de *C. adamantium*, pelo método de DPPH, verificou-se que sua capacidade sequestradora de radicais livres é baixa, com uma $CE_{50} = 740,0 \mu\text{g/mL}^{-1}$, quando comparada com a capacidade de outros óleos essenciais como o cravo-da-índia e também com o padrão de quercetina com uma $CE_{50} = 3,13 \mu\text{g.mL}^{-1}$, mas tem potencial uso em produtos alimentícios e também uma boa atividade antifúngica (OLIVEIRA et al., 2016).

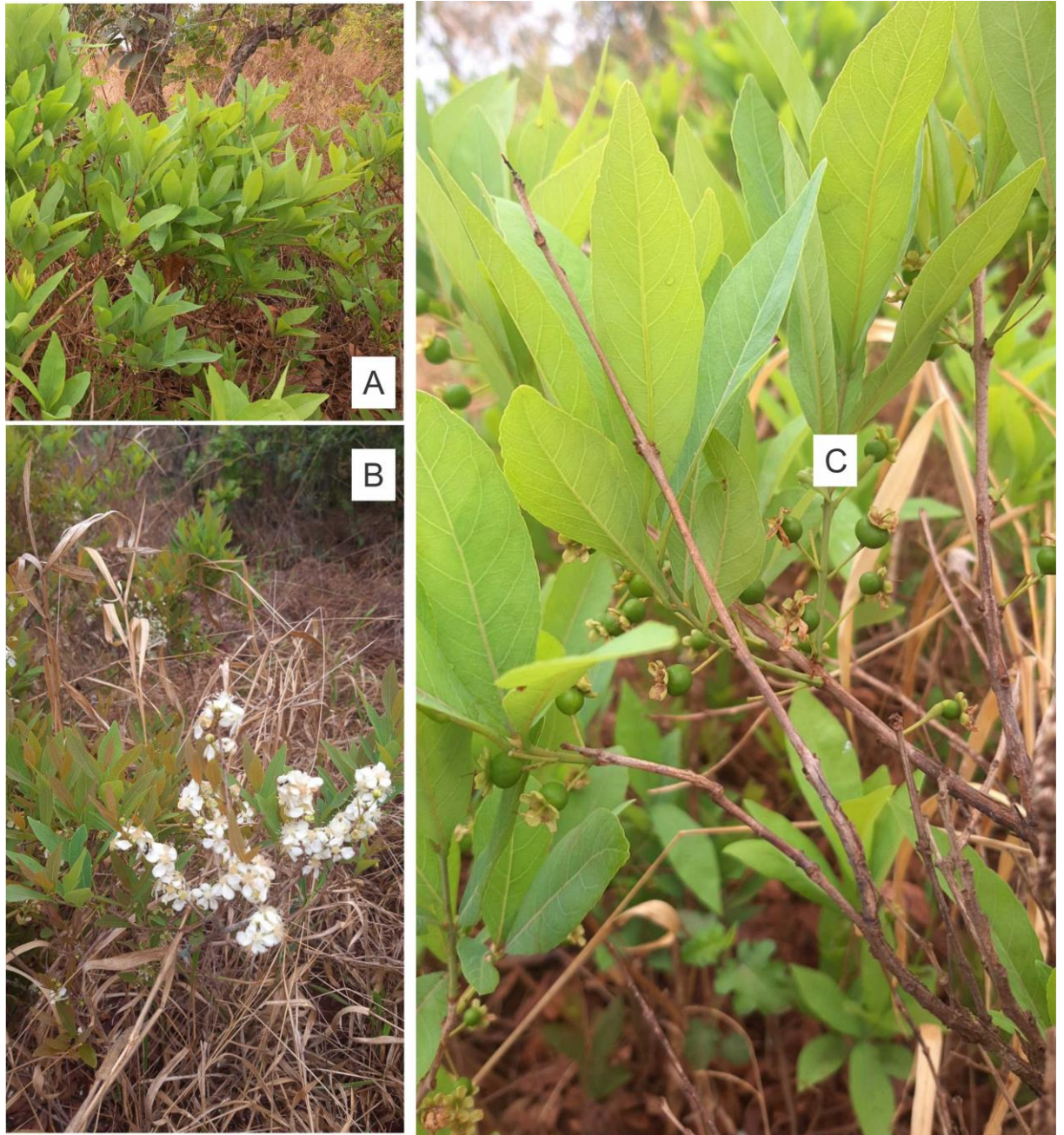


Figura 3: *C. adamantium*. Folhas (A) Flores (B) Frutos Verdes (C). Fonte: a autora.

2.6. *Protium ovatum*

A espécie *Protium ovatum* (Figura 4) é distribuída nos Cerrados e Cerradões de Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás, Distrito Federal e Minas Gerais, sendo mais rara em Sergipe, Bahia e São Paulo. Sua floração é de abril a setembro, com frutos em setembro

(LIMA et al., 2005). É conhecida como vick-do-cerrado e é endêmica do Brasil, com ocorrência tanto no bioma Cerrado quanto na Amazônia (CROTEAU et al., 2000).

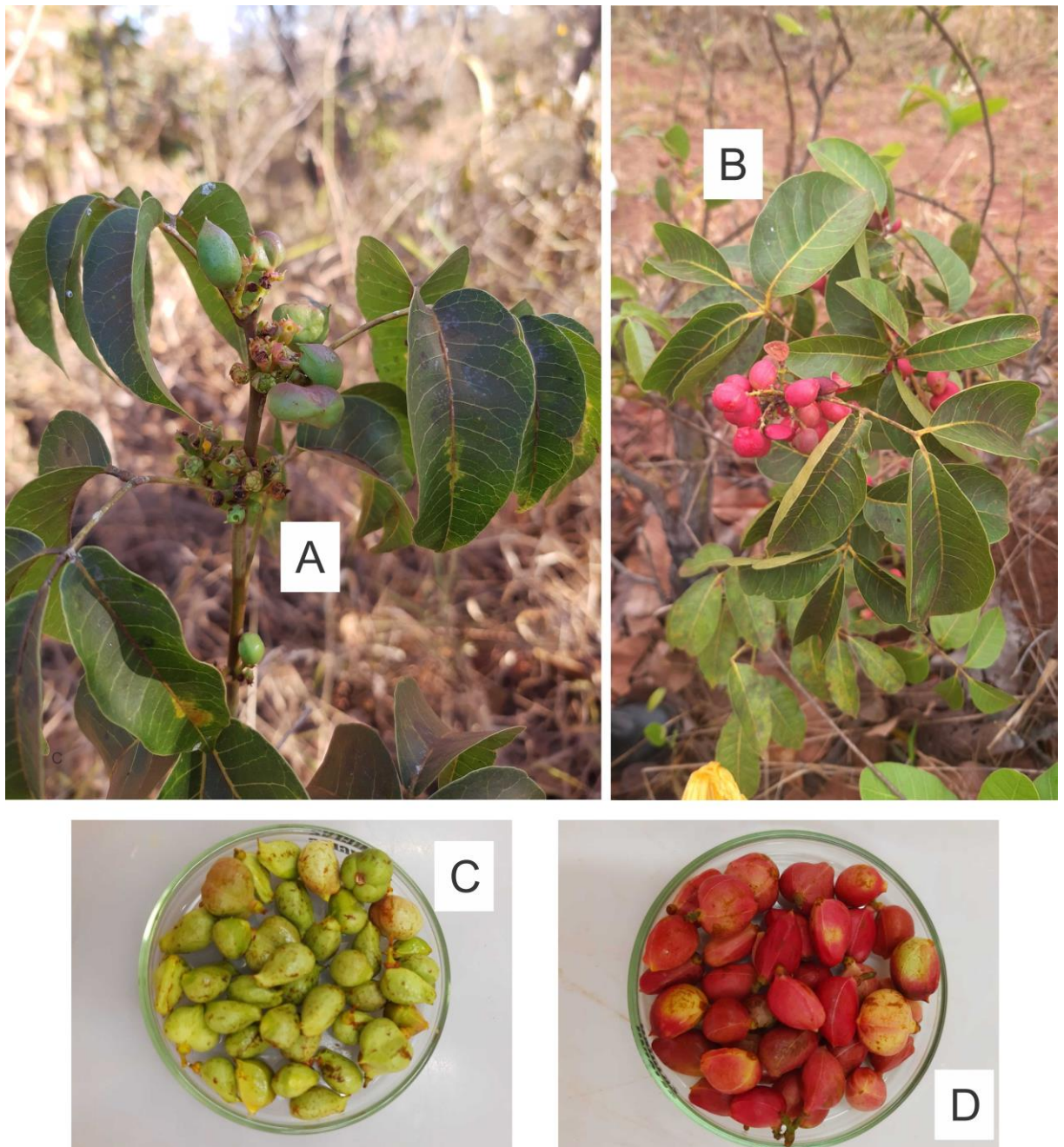


Figura 4: Diferentes partes vegetativas de *Protium ovatum*. A: Partes aéreas de *P. ovatum* durante a frutificação. B: Folhas e frutos maduros C: Frutos verdes. D: Frutos maduros. Fonte: a autora.

Em pesquisa conduzida no Laboratório de Química de Produtos Naturais do IFGoiano/Campus Rio Verde, o OE das folhas de *P. ovatum* mostrou em sua composição química uma mistura de monoterpenos e sesquiterpenos, sendo que os constituintes majoritários identificados com a variação em diferentes partes vegetativas foram o α -pineno (0,80-18,3%), β -pineno (0,58-5,17%), mirceno (0,52-27,3%), limoneno (3,15-59,7%),

cariofileno E (3,67-16,4%), germacreno D (6,34-27,4%) e δ -Cadineno (2,29-7,63%) (SOUZA et al., 2021).

. Em adição, este óleo essencial exibiu promissor potencial antiparasitário em relação aos parasitas *Leishmania amazonensis* e *Trypanosoma cruzi*. Estes são resultados relevantes, tendo em vista que as doenças causadas por estes parasitas afetam milhões de pessoas em todo mundo. O óleo essencial da *Protium ovatum* mostrou elevada atividade biológica contra a levedura *Candida albicans*, inibindo consideravelmente seu crescimento (SOUZA et al., 2021).

Esse resultado é relevante para esse trabalho, visto que o *Malassezia furfur*, assim como a *Candida albicans*, são leveduras (LEONG et al., 2017).

2.7. *Malassezia furfur*

Malassezia é um gênero de leveduras lipo-dependentes, ou seja, depende de lipídeos para se desenvolver (LEONG et al., 2017). Esse gênero está associado a doenças que acometem principalmente a pele. É um grupo heterogêneo de muitas espécies formadas por diferentes constituições genéticas que podem causar as mesmas doenças (DONATO, 2019). Dentro desse gênero, temos a espécie *Malassezia furfur* (Figura 5), que está associada à pitiríase versicolor, foliculite, dermatite seborreica e atópica, fungemia e infecções sistêmicas (LEONG et al., 2017).

Indivíduos imunocomprometidos estão mais susceptíveis às doenças causadas pelo gênero *Malassezia*. Essas leveduras são exigentes e se desenvolvem lentamente, isso faz com que sejam difíceis os testes de sensibilidade a drogas, contribuindo, assim, para a não existência de diversas drogas à disposição para tratar doenças oriundas desse gênero (LEONG et al., 2017).

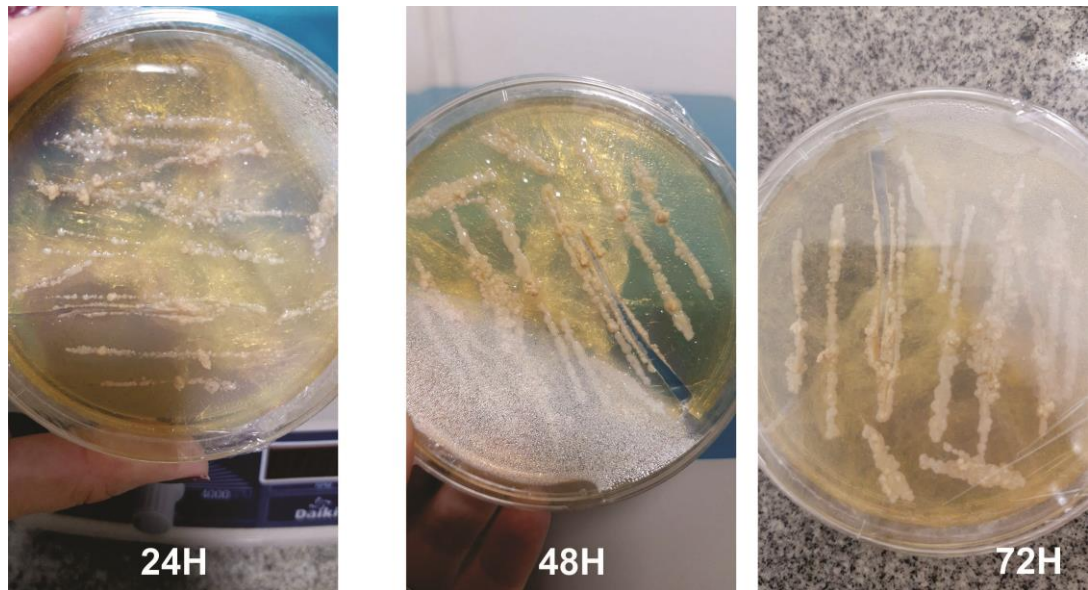


Figura 5. Culturas das leveduras *Malassezia furfur*. Fonte: a autora.

Normalmente, o *M. furfur* se encontra em forma de levedura, no entanto essa levedura possui também uma fase micelial, sua fase mais patogênica. O tratamento normalmente é feito através de drogas azólicas antifúngicas e soluções antimicóticas, por períodos prolongados. Porém já existem cepas resistentes a esses tipos de medicamentos (LAOKOR e JUNTACHAI, 2021).

A infecção ocasionada pelo *Malassezia furfur* é caracterizada por máculas bem delimitadas, descamação furfurácea de cor variável, apresentando lesões isoladas ou acumuladas em um mesmo local. Essas lesões podem estar localizadas no couro cabeludo (Figura 6) e membros superiores (Figura 7), quase sempre em áreas mais ricas em glândulas sebáceas, e também nas unhas (LIMA et al., 2002).

Fatores endógenos ou exógenos predispõem à patogenicidade de *M. furfur*, como, por exemplo, clima quente e úmido pode favorecer a hiper oleosidade, bem como condições genéticas, má alimentação, deficiência de vitaminas e sistema imunológico comprometido (LIMA et al., 2002).



Figura 6- Couro cabeludo e fios com caspa.

Disponível em: <https://www.trabalhoscolares.net/wp-content/uploads/2011/06/dermatite_seborreica_trabalhos_escolares.jpg>. Acesso em: 15/06/2021.



Figura 7 – Troco e membros superiores acometidos por dermatite ocasionada por *Malassezia furfur*.

Disponível em: https://www.flickr.com/photos/mokita_bb/1732037309>. Acesso em: 15/06/2021.

2.8. Cândidas

O gênero *Candida* é constituído por aproximadamente 200 espécies. Causa uma infecção tecidual chamada candidose. São microrganismos capazes de colonizar cavidades orais, sistema respiratório, urinário, trato gástrico intestinal, além do sistema circulatório. É responsável por diferentes patologias e pode estar presente naturalmente na microbiota dos seres humanos e animais em geral. É um tipo de fungo que se apresenta de forma leveduriforme, sua reprodução se dá por brotamento, formado por pseudo-hifas e hifas, sendo principalmente um microrganismo oportunista, que se aproveita de um sistema imunológico deprimido ou por influências externas que alteram a natureza da microbiota natural, com isso

proliferando de forma desordenada. (PEIXOTO, et al., 2014). A candidose pode se apresentar de três formas: sistêmica, cutânea, muco cutânea, sendo a última a mais comum (SOUZA et al., 2021).

A incidência de leveduras do gênero *Candida* é frequentemente identificada em laboratórios de análises clínicas principalmente em pacientes hospitalizados. O alastramento da candidose é uma causa em potencial de mortalidade em hospitais. Por isso são importantes a correta identificação das espécies do gênero *Candida* e ainda o conhecimento da sensibilidade às drogas antifúngicas. A principal droga de escolha para o tratamento de infecções por *Candida* é o fluconazol (PEDROSO et al., 2013).

Candida albicans é a espécie do gênero que mais acomete a saúde dos seres humanos. Estudos micológicos mostram que infecções por *C. albicans* representam 80% dos isolados de formas de candidose humana, no entanto, o número de infecções por *Candida* não *albicans* vem aumentando, e esse aumento de diagnósticos de infecções por *Candida* não *albicans* pode ser devido à melhora nas técnicas de rotina de fungemia, como, por exemplo, a introdução de técnicas moleculares (SILVA et al., 2012).

Das espécies de *Candida* não *albicans* conhecidas, podem-se destacar *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. tropicalis* e *C. orthopsilosis*, que diferem entre si normalmente por sua forma de crescimento, por formar hifas verdadeiras ou pseudo-hifas. Estando em condições normais e com a quantidade de nutriente ideal, as leveduras crescem em fase logarítmica como células de brotamento (blastoconídios), que são de forma esférica a oval e têm aproximadamente de 2 a 7 µm de tamanho (SILVA et al., 2012).

Entre as espécies do gênero *Candida* em testes em modelos de infecção por candidose em animais, a espécie *C. albicans* tem se mostrado a mais patogênica, porém leveduras não são patógenos comuns de animais, e esses estudos podem não refletir a realidade da patogenicidade do gênero *Candida* (SILVA et al., 2012).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES C.C.F. et al. Antiproliferative activity of essential oils from three plants of the Brazilian Cerrado: *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae), *Protium ovatum* (Burseraceae) and *Cardiopetalum calophyllum* (Annonaceae). **Brazilian Journal of Biology**. p. 290-294, 2020.

BAKKALI, F. et al. biological effects of essential oils - A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446–475, 2008.

COSTA, M.D.C.M.F.D. et al. Essential Oils from Leaves of Medicinal Plants of Brazilian Flora: Chemical Composition and Activity against Candida Species. **Medicines (Basel)**, p. 3;4(2):27, 2017.

CROTEAU, R. KUTCHAN, T.M., LEWIS, N.G. Biochemistry & Molecular Biology of Plants. B. Buchanan, W. Gruissem, R. Jones. **Ed. American Society of Plant Physiologists**, cap.24, 2000.

CHATROU, L.W.; RAINER, H.; MAAS, P.J.M. Annonaceae. In: SMITH, N.; MORI, S.A.; HENDERSON, A.; STEVENSON, D.W.; HEALD, S.V (Ed.). Flowering plants of the neotropics. **New York: Princeton University Press**, p.18-20,2004.

DIAS, J. E.; LAUREANO, L. C. **Farmacopeia popular do cerrado**. Goiás. 2009.

DONATO R, S.; C, PINI G, B. AR. Antifungal activity of different essential oils against *Malassezia* pathogenic species. **J Ethnopharmacol**. 2020.

ELIAS, M. A. D. S. Ecologia reprodutiva de *Cardiopetalum calophyllum* (Annonaceae) em fragmentos de Cerrado do Brasil Central. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Evolução). **Programa de Pós-graduação em Ecologia e Evolução, Universidade Federal de Goiás**.48p.,2010.

Em 30 anos, cerrado brasileiro pode ter maior extinção de plantas da história. **Ambiente Brasil, 2020**. Disponível em: <https://noticias.ambientebrasil.com.br/clipping/2020/09/30/163833-em-30-anos-cerrado-brasileiro-pode-ter-maior-extincao-de-plantas-da-historia-diz-estudo-2.html>>. Acesso em 30/09/2020.

HEUSDEN, E. C. H. Flowers of Annonaceae: morphology, classification, and evolution. **Blumea** Netherland, v. 7, p.1-218, 1992. Supplement.

HYLDGAARD, M.; MYGIND, T.; MEYER, R. L. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. **Frontiers in microbiology**, v. 3, p. 12, 2012.

IBGE. **Censo de 2018**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/censo2018/default.shtm>>. Acesso em 02 de março de 2020.

JESUS, G. S. et al. Potencial Antimicrobiano de Óleos Essenciais de Plantas do Cerrado contra Microrganismos Alimentares Multirresistentes *Moléculas* **25**, nº. 14: 3296, 2020.

KRINSKI, D.; MASSAROLI, A.; MACHADO, M. Potencial inseticida de plantas da família Annonaceae. *Revista Brasileira de Fruticultura*, p. 36, 225, 2014.

LAOKOR, N., & JUNTACHAI, W. Exploring the antifungal activity and mechanism of action of Zingiberaceae rhizome extracts against *Malassezia furfur*. *Journal of Ethnopharmacology*, p. 279, 2021.

LEONG, C. et al. Antifungal Susceptibility Testing of *Malassezia* spp. with an Optimized Colorimetric Broth Microdilution Method. *J Clin Microbiol* p.55:1883- 1893,2017.

LEONARDI, G. R; MATHEUS, L. G. M; KUREBAYASHI, A. K. *Cosmetologia Aplicada*. São Paulo: Editora Medfarma, 234p., 2012.

LIMA, L. R.; PIRANI, J. R. Burseraceae. *Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo*, v. 4, p. 163–168, 2005.

LIMA, E. O. et.al. Avaliação da sensibilidade de cepas de *Malassezia furfur* a imidas cíclicas. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* vol. 38, nº. 4, 2002.

LOPES, J. C.; MELLO-SILVA, R. Diversidade e caracterização das Annonaceae do Brasil. *Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal*, v. 36, Ed. esp., p. 125-131, 2014.

LORENZI, H.; et al. S. Frutas brasileiras e exóticas cultivadas (de consumo *in natura*). Nova Odessa-SP. *Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda*, p. 178-190, 2006.

LÜMMEN, P. Complex I inhibitors as insecticides and acaricides. *Biochimica et Biophysica Acta*, Amsterdam, v. 1364, nº 2, p.287-296, 1998.

MANGAL, M. et al. “Acetogenins as Potential Anticancer Agents.” *Anti-cancer agents in medicinal chemistry* vol. 16,2 p.138-59, 2015.

MOBIN, M. et al. MDGC-MS analysis of essential oils from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) and their antifungal activity against *Candida* specie. *Rev. Bras. Pl. Med.* Campinas, v. 18, n. 2, p. 531–538, 2016.

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

OLIVEIRA, J.D. et al. Chemical composition of essential oil extracted from leaves of *Campomanesia adamantium* subjected to different hydrodistillation times *Ciência Rural*, v.47:01,e20151131,2017.

PAVELA, R. Essential oils for the development of eco-friendly mosquito larvicides: a review. *Industrial crops and products*, v. 76, p. 174-187, 2015.

PEDROSO, R. et al. Antifungal susceptibility of isolates of *Candida* spp. by disk diffusion and broth microdilution. **Bioscience Journal**. 30 p.304-311,2014.

PEIXOTO, J. V. et al. Candidíase -Uma Revisão De Literatura Candidiasis – a Literature Review. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research -BJSCR**, v. 8, n° 2, p. 75–82, 2014.

PEIXOTO J.C. et al. Flavonóides do Cerrado Brasileiro: Biossíntese, Perfil Químico e Biológico. **Moléculas**. 4 p. (16): 2891 ,2019.

POOJA, A.A., N. & Maninder, K. Screening of plant essential oils for antifungal activity against *Malassezia furfur*. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**. 5. 37-39,2013.

PRESIBELLA, M.M. O Efeito de Extratos de Plantas Mediciniais na Quimiotaxia Leucocitária in vitro. Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade **Federal do Paraná**, 2003.

SHARMEEN J.B. et al. Essential Oils as Natural Sources of Fragrance Compounds for Cosmetics and Cosmeceuticals. **Molecules**. p.7;26(3):666, 2021.

SILVA, C. A. et al. Floração e sistema reprodutivo de *Cardiopetalum calophyllum* SCHLETDL (Annonaceae), em fragmento florestal de área de Cerrado no município de Tangará da Serra – MT. In: I BIOTA – **Ciclo de Estudos de Biologia de Tangará da Serra**, 1., 2009,

SILVA, S. et al. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance, **FEMS Microbiology Reviews**, Volume 36, p.288–305,2012.

SOUSA, W.C. Variação Química dos Óleos Essenciais de *Protium ovatum* e Avaliação de sua atividade antimicrobiana e Antioxidante. 2019 78p. **Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) apresentada ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano - Campus Rio Verde**, Rio Verde, 2019.

SOUSA, W.C. et al. Chemical composition and antifungal potential of essential oils from different aerial parts of *Protium ovatum* Engl. **Australian Journal of Crop Science** 15. p.570-576,2021

XAVIER, M.N. et al. Composição química do óleo essencial de *Cardiopetalum calophyllum* Schltdl. (annonaceae) e suas atividades antioxidante, antibacteriana e antifúngica. **Revista Virtual de Química** 8: p.1433-1448, 2016.

ZAFRA-POLO, M. C. et al. Acetogenins from Annonaceae, inhibitor of mitochondrial complex I. **Phytochemistry**, Oxford, v.42, p.253-271, 1996.

4.0 OBJETIVOS

4.1. Geral

Caracterizar os óleos essenciais oriundos das espécies *C. calophyllum*, *C. adamantium*, *P. ovatum* e avaliar seu potencial no controle dos fungos *Malassezia furfur* e diferentes espécies do gênero *Cândida*.

4.2. Específicos

- Extrair os óleos essenciais das folhas das espécies *C.calophyllum* e *C. adamantium*, das folhas e frutos verdes e maduros de *P.ovatum*.
- Avaliar a composição química dos óleos essenciais extraídos de *C. calophyllum*, *C. adamantium* e *P. ovatum*, de suas folhas e frutos.
- Avaliar in vitro a ação dos óleos essenciais contra os fungos *Malassezia furfur* e diferentes espécies do gênero *Cândida*.
- Avaliar a atividade anti-inflamatória dos óleos essenciais de *C. calophyllum*, *C. adamantium* e *P. ovatum*.

5. CAPÍTULO I

(Normas de acordo com a revista *Brazilian Archives of Biology and Technology*)

Bioprospecção da Flora Aromática do Cerrado: Estudos Químico e Biológico de Três Óleos Essenciais

Resumo

Os potenciais químicos e farmacológicos das espécies botânicas encontradas no Cerrado são bem conhecidos e amplamente estudados. A diversidade química de metabólitos associada a várias plantas deste bioma tem impulsionado diferentes estudos nas áreas da agropecuária, indústria farmacêutica e de cosméticos. Neste sentido, o presente estudo objetivou avaliar a composição química dos essenciais (OEs) das folhas frescas de três espécies encontradas no Cerrado goiano - *Cardiopetalum calophyllum* (OE-CC), *Campomanesia adamantium* (OE-CA) e *Protium ovatum* (OE-PO) - e determinar suas atividades anti-*Malassezia furfur* e anti-inflamatórias. Análises de cromatografia de fase gasosa com detector por ionização de chama (CG-DIC) e de espectrometria de massa por cromatografia fase gasosa (CG-EM) evidenciaram que a classe química mais abundante nos óleos é a dos hidrocarbonetos sesquiterpênicos. Os constituintes majoritários identificados em OE-CC foram dois: germacreno D (34,9%) e biciclogermacreno (26,8%). OE-CA exibiu predominantemente o biciclogermacreno (21,7%) e o OE-PO revelou em maiores números o germacreno D (25,0%) e γ -muuroleno (18,6%). Os óleos essenciais foram testados pelo método de microdiluição em caldo em microplacas de 96 poços e revelaram satisfatória atividade contra *Malassezia furfur* com valores de CIM de 375 $\mu\text{g/mL}$ para OE-CA e de 750 $\mu\text{g/mL}$ para OE-CC e OE-PO. Para avaliar a atividade anti-inflamatória OE, foi utilizado o modelo de quimiotaxia, que mostrou que os OEs exibiram resultados eficazes: (OE-CC, com $\text{IC}_{50} = 24,4 \mu\text{g/mL}$), *C. adamantium* (OE-CA, com $\text{IC}_{50} = 15,7 \mu\text{g/mL}$) e *P. ovatum* (OE-PO, com $\text{IC}_{50} = 32,5 \mu\text{g/mL}$). Estas atividades biológicas investigadas para OE-CC, OE-CA e OE-PO estão sendo avaliadas pela primeira vez. Em suma, os OEs obtidos e seus constituintes podem ser considerados no futuro produtos em potencial para aplicações clínicas e como adjuvantes para medicamentos atuais.

Em suma, as atividades biológicas dos OE-CC, OE-CA e OE-PO, especificamente para

atividade anti-*Malassezia furfur* e anti-inflamatória, foram investigadas e descritas pela primeira vez.

Palavras-chave: *Cardiopetalum calophyllum*; *Campomanesia adamantium*; *Protium ovatum*; *Malassezia furfu*; modelo de quimiotaxia; plantas medicinais.

5.1. Introdução

Conhecido como um dos biomas detentores de maior biodiversidade do mundo, o bioma Cerrado tem formação savânica e corresponde a uma área aproximada de dois milhões de km, representando em torno de 23% do território brasileiro [1]. As plantas do Cerrado são adaptadas a condições ambientais distintas, que incluem extensos períodos de seca, outrora períodos de alta mitigação, solos pobres, grande ocorrência de incêndios e alta incidência de radiação UV. Diante disto, há necessidade de as plantas utilizarem os mecanismos de defesa para se proteger dos agentes físicos, químicos e biológicos no decorrer do seu processo evolutivo. Com isso, pode-se associar a elas a presença de compostos bioativos [1].

Muitas plantas do Cerrado são aromáticas e grandes fontes de óleos essenciais (OEs) bioativos, o que desperta o interesse de diversos pesquisadores pela busca de compostos promissores. Os OEs são substâncias formuladas que exercem funções de autodefesa e de atração de polinizadores. A planta produz OEs em diferentes partes como flores, cascas de frutos, folhas e pequenos grãos, raízes, cascas da árvore, resinas da casca e sementes [2].

A espécie *Cardiopetalum calophyllum*, família Annonaceae, é de ocorrência bastante comum no Cerrado do estado de Goiás, Brasil. É conhecida popularmente por *imbirinha*, e seus OEs já foram testados contra fungos fitopatogênicos como *Sclerotinia sclerotiorum* e suas atividades antioxidantes e antibacteriana também foram investigadas [3]. *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae) é uma espécie que tem sido utilizada pela medicina popular para tratar hipertensão, reumatismo e diabetes, conhecida popularmente como *guavira*, *gabiropa* ou *guabiropa* [4]. Outros estudos também descreveram atividades antibacterianas, antioxidantes, anti-inflamatórias, antidiarreicas e antissépticas urinárias [5]. Conhecida popularmente como *vick-do-cerrado*, *Protium ovatum* pertence à família Burseraceae, é promissora, mas poucos

estudos de suas propriedades foram feitos. Eles descrevem a composição química de OEs de algumas partes da planta e destacam suas atividades anti-*Trypanosoma cruzi*, citotóxica, antifúngica e antileishmania [6-8]. Vale ressaltar que a atividade antiproliferativa de OEs de *C. calophyllum* (EO-CC), *C. adamantium* (OE-CA) e *P. ovatum* (OE-PO) também foi recentemente relatada [9].

Portanto, como nosso grupo de pesquisa está interessado em plantas nativas do Cerrado [10] pela sua riqueza em propriedades biológicas, este estudo teve como objetivo analisar a composição química de OEs de *C. calophyllum* (EO-CC), *C. adamantium* (EO-CA) e *P. ovatum* (EO-PO) (Figura 1) e descrever suas atividades anti-*Malassezia furfur* e anti-inflamatórias in vitro pela primeira vez.



Figura 1. Parte aérea das três espécies coletadas no Cerrado goiano. Fonte: a autora.

5.2. MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1. Material vegetal

As folhas de *C. adamantium* foram coletadas no Cerrado, em área pertencente à Universidade de Rio Verde (UniRV), localizada na região de Rio Verde, em maio de 2020. O material vegetal foi depositado no Herbário Professor Germano Guarin Neto, na exsicata nº HJ 6561. As folhas de *C. calophyllum* foram coletadas na cidade de Rio Verde em março de 2014 e a exsicata foi depositada no herbário da Universidade Estadual de Montes Claros (UNIMONTES), na exsicata nº 3815. Folhas de *P. ovatum* foram coletadas na Universidade de Rio Verde (UniRV), localizada na região do Cerrado, em julho de 2014. A planta foi depositada no Herbário Jatuiense Professor

Germano Guarim Neto na exsicata n° HJ 742. Todas as espécies botânicas foram identificadas pela botânica Erika Amaral. O acesso ao material botânico foi aprovado pelo Sistema Nacional de Gestão do Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN) sob o código AEACDCA.

5.2.2. Extração de OEs

Os OEs foram extraídos de folhas frescas de *P. ovatum* (100 g), *C. adamantium* (100 g) e *C. calophyllum* (100 g), que foram reduzidas em moinho de faca. Eles tiveram seus OE extraídos por hidrodestilação feita em aparelho tipo Clevenger a 100°C por 2 h. Em seguida, o hidrolato foi submetido à partição líquido-líquido em funil separador. Três lavagens do hidrolato foram feitas com três porções de 10mL de diclorometano. O rendimento total de óleo foi expresso em porcentagem (g/100g de material vegetal fresco). As amostras de OE foram armazenadas a -4 ° C até a realização dos testes químicos e biológicos.

5.2.3. Identificação química dos constituintes do OE

Os OEs foram dissolvidos em éter etílico e analisados por cromatografia gasosa-deteção de ionização de chama (CG-DIC) e cromatografia gasosa-espectrometria de massa (CG-EM) com o uso de sistemas Shimadzu QP5000 Plus e GCMS2010 Plus (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão). A temperatura da coluna em CG-DIC foi programada para aumentar de 60 a 240°C a 3°C/min e foi mantida a 240 ° C por 5 min. O gás transportador foi de H₂ com um caudal de 1,0mL/min. O equipamento foi configurado para operar no modo de injeção. O volume de injeção foi de 0,1µL (proporção de divisão de 1:10) e as temperaturas do injetor e do detector foram 240 e 280 ° C, respectivamente. As concentrações relativas dos componentes foram obtidas normalizando as áreas dos picos (%). As áreas relativas consistiram na média de análises de CG-DIC em triplicata. As condições de CG-EM e a identificação foram relatadas anteriormente [11]. A identificação de componentes voláteis de OEs (Tabelas 1-3) foi baseada em seus índices de retenção em uma coluna capilar Rtx-5MS (30m X 0,25mm; 0,250µm) sob as mesmas condições operacionais usadas para CG em relação a

uma série homóloga de n alcanos (C_8 - C_{20}). As estruturas foram combinadas por computador com Wiley 7, NIST 08 e FFNSC 1.2, e seus padrões de fragmentação, comparados com dados da literatura [12].

5.2.4. Atividade anti- *Malassezia furfur* dos óleos essenciais

Para avaliar a atividade anti-*Malassezia furfur*, foi utilizada a metodologia descrita pelo CLSI (M27-A3,2008) [14], teste de microdiluição em caldo, com modificações de Leong et al. (2017) [15]. Foi utilizada a cepa padrão adquirida da American Type Culture Collection: *Malassezia furfur* (ATCC 14521). As concentrações dos OEs foram de 1,46 a 3000 μ g/mL. O meio de cultura foi RPMI-1640 (Gibco), tamponado com morfolino propanossulfônico (MOPS, Sigma) pH 7,0 e suplementado até 2% de glicose, 1% de azeite (Native), 1% de tween 80 (Neon) e 0,5% bílis bovina seca (Sigma-Aldrich). A suspensão da levedura foi ajustada por espectrofotômetro (530nm) para atingir a concentração inicial de 0,5 a 2,5 $\times 10^3$ células/mL. O controle do crescimento da levedura, o controle de esterilidade do caldo, amostras de teste e DMSO (Merck) e o controle positivo foram feitos com cetoconazol (Pfizer) em seguimento de 0,031 a 16 μ g/mL. As espécies (cepas) *Candida parapsilosis* (ATCC 22019) e *Candida krusei* (ATCC 6258) foram empregadas como controle de qualidade para monitorar o desempenho do ensaio. A placa 96 poços de fundo chato foi incubada em estufa microbiológica a 30°C por 96 h. Para revelar o crescimento da levedura, 30 μ L de uma solução aquosa de resazurina a 0,01% (Sigma) foram adicionados a cada poço [16]. As placas foram reincubadas por 24h e analisadas de acordo com as variações de cor entre azul (sem crescimento de levedura) e rosa (com crescimento de levedura). As análises foram feitas em triplicata e a concentração mais baixa da amostra de teste para a qual o poço permaneceu azul foi considerada a CIM.

5.2.5. Atividade anti-inflamatória dos óleos essenciais

O modelo de quimiotaxia foi usado para avaliar a atividade anti-inflamatória e seguiu pelo ensaio de câmara de Boyden [16], conforme descrito por Castilhos et al. (2007) [17]. Essa técnica possibilitou verificar o potencial anti-inflamatório dos OEs de *C. calophyllum* (OE-CC, com IC 50 = 24,4 μ g/mL), *C. adamantium* (OE-CA, com IC 50 = 15,7 μ g/mL) e *P. ovatum* (OE-PO, com IC 50 = 32,5 μ g/mL) e ser avaliada por

meio de sua influência inibitória na motilidade dos neutrófilos em suspensão (compartimento superior) em direção ao agente quimiotático fMLP 10⁻⁸ M (compartimento inferior), determinada pelo espaço usado pelos neutrófilos através do filtro de polycarbonato colocado entre os compartimentos da câmara. Os OEs foram dissolvidos em solução de leucócitos nas concentrações de 5, 10, 15,7; 24,4 e 32,5 µg/mL e incubados a 37°C por 30 min. O plasma coletado de ratos foi incubado a 37°C por 30 min com 65 µg/mL de LPS (lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* como controle positivo) e diluído em tampão de Hanks na concentração de 20% (v/v).

Um microscópio óptico (aumento de 40x) foi usado para a leitura dos filtros. Seu foco foi inicialmente ajustado para o plano superior do filtro e, em seguida, aprofundado lentamente para se concentrar em duas células. A leitura foi feita em cinco campos de cada filtro e a capacidade migratória dos neutrófilos foi avaliada em termos de distância, em micrômetros, medida entre o plano superior do filtro e o plano final de observação [18]. Os resultados mostraram a média das distâncias encontradas nas leituras. Os resultados foram expressos como média +/- desvio padrão, analisados pelo teste t de Student e comparados com a média das distâncias determinadas para células de controle não tratadas [19]. A diferença foi considerada estatisticamente significativa quando $p \leq 0,05$.

As medições foram feitas em cinco campos em cada um dos filtros em duplicata e os resultados expressos como média ± erro padrão da média (SEM) e analisados por análise de variância unidirecional (ANOVA), seguida pelo teste de intervalo múltiplo de Tukey, considerando $p \leq 0,05$ como significativo para ensaio quimiotático (Tabelas 5 a 7).

5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os constituintes voláteis das folhas frescas de OE-CC, OE-CA e OE-PO foram identificados por CG-DIC e CG-EM. Os compostos majoritários foram germacreno D (34,9%) e biciclogermacreno (26,8%) na análise de OE-CC (Tabela 1). OE-CA exibiu principalmente germacreno D (21,7% - Tabela 2), enquanto OE-PO exibiu altas concentrações de germacreno D (25,0%) e γ -muurolene (18,6%) (Tabelas 3, Figura 2).

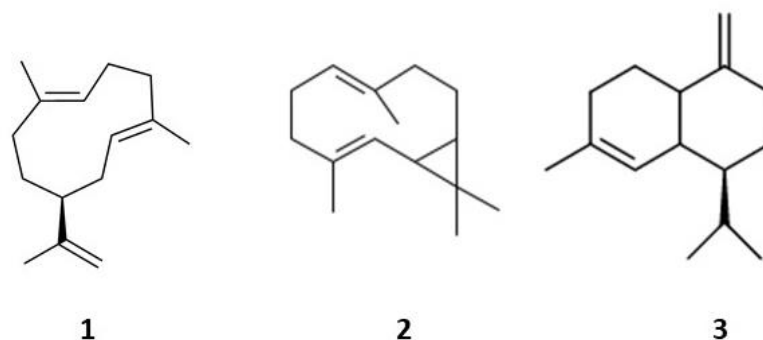


Figura 2. Estruturas químicas dos constituintes majoritários identificados em OE-CC, OE-CA e OE-PO: germacreno D (1), biciclogermacreno (2) e γ -muuroleno (3).

Tabela 1. Constituintes Voláteis do OE-CC

Compostos	TR (min)	%AR	IR _{exp}	IR _{lit}
(<i>E</i>)-Hexenol	6.35	2.3	853	854
3-Careno	14.80	0.6	1011	1011
δ -Elemeno	32.94	3.5	1338	1339
Iso-cariofileno	35.28	7.0	1392	1394
β -Cubebeno	35.32	0.5	1389	1390
β -Elemeno	35.50	4.0	1393	1391
α -Gurjuneno	36.11	0.3	1408	1409
Humuleno	37.84	1.7	1453	1455
Germacreno D	38.90	34.9	1478	1480
Biciclogermacreno	39.53	26.8	1494	1494
γ -Cadineno	40.15	0.6	1511	1513
α -Cadineno	40.71	1.7	1523	1524
Elemol	41.59	0.8	1548	1549
Germacreno B	41.97	2.8	1560	1561
Espatulolol	42.56	5.1	1573	1575
Globulol	42.67	0.9	1576	1576
Viridiflorol	43.17	0.9	1590	1590
α -Cadinol	44.81	1.8	1652	1653
Hidrocarbonetos sesquiterpênicos		84.4		
Sesquiterpenos oxigenados		9.5		
Outros		2.3		
Total		96.2		

TR = Tempo de retenção; IR_{exp} = Índice de retenção em relação aos *n*-alcanos (C₈–C₂₀) na coluna Rtx-5MS; RI_{lit} = Índice de retenção de Kovats (Valores de literatura) - [12]. %AR = Abundância relativa. Números em negrito significam que foram considerados como constituintes majoritários no óleo essencial.

Tabela 2. Constituintes Voláteis do OE-CA

Compostos	TR (min)	%AR	IR _{exp}	IR _{lit}
(Z)-Hex-3-enol	6.17	850	851	0.5
α -Pino	9.46	938	939	5.0
Canfeno	10.91	952	953	0.7
β -Pino	12.68	980	980	4.4
Limoneno	15.81	1031	1031	8.6
α -Terpinoleno	19.39	1087	1088	0.5
Linalol	19.95	1096	1098	3.2
Álcool Fencil	21.05	1111	1112	1.5
Hidrato de Canfeno	23.41	1146	1148	0.4
Borneol	24.51	1163	1165	2.7
4-Terpineol	25.53	1177	1177	0.7
α -Terpineol	26.25	1187	1189	5.2
Bicicloelmeno	32.40	1324	1325	2.3
β -Elemeno	34.70	1375	1375	2.4
β -Maalien	34.94	1380	1380	0.6
β -Cariofileno	36.52	1417	1418	7.5
β -Gurjuneno	36.71	1423	1423	0.4
Aromadendrene	37.28	1438	1439	3.5
Hidrocarbonetos Monoterpênicos	19,2			
Monoterpenos oxigenados	13,7			
Hidrocarbonetos sesquiterpênicos	53,2			
Sesquiterpenos Oxigenados	11,3			
Outros	0,5			
Total		97,9		

TR = Tempo de retenção; IR_{exp} = Índice de retenção em relação aos *n*-alcanos (C₈-C₂₀) na coluna Rtx-5MS; RI_{lit} = Índice de retenção de Kovats (Valores de literatura) - [12]. %AR = Abundância relativa. Números em negrito significam que foram considerados como constituintes majoritários no óleo essencial.

Tabela 3. Constituintes voláteis do OE-PO

Compostos	TR (min)	%AR	IR _{exp}	IR _{lit}
3-Hexen-1-ol	6.36	0.5	855	857
β -Pino	12.80	0.9	979	980
β -Mirceno	13.43	1.1	989	991
3-Careno	14.70	1.5	1009	1011
Limoneno	16.01	2.5	1031	1031
<i>cis</i> - β -Ocimeno	16.69	0.7	1039	1040
4-Terpineol	25.46	0.2	1176	1177
α -Cubebeno	33.51	4.1	1350	1351
β -Elemeno	34.71	2.9	1375	1375
β-Cariofileno	36.49	18.9	1417	1418
Aromadendreno	37.16	1.0	1437	1439

γ-Muuroleño	38.71	18.6	1475	1477
Germacreno D	38.94	25.0	1480	1480
Valenceno	39.20	1.2	1489	1490
Biciclogermacreno	39.38	0.8	1492	1494
α -Bisaboleno	39.79	5.2	1503	1504
γ -Cadineno	40.04	1.7	1513	1513
Germacreno B	41.99	5.1	1559	1560
Hidrocarbonetos monoterpênicos		6.7		
Monoterpenos oxigenados		0.2		
Hidrocarbonetos sesquiterpênicos		84.5		
Sesquiterpenos oxigenados		4,4		
Outros		0,5		
Total		96,3		

TR = Tempo de retenção; IR_{exp} = Índice de retenção em relação aos *n*-alcanos (C₈–C₂₀) na coluna Rtx-5MS; RI_{lit} = Índice de retenção de Kovats (Valores de literatura) - [12]. %AR = Abundância relativa. Números em negrito significam que foram considerados como constituintes majoritários no óleo essencial.

A comparação entre as composições químicas encontradas por este estudo e as previamente relatadas pela literatura mostra diferenças marcantes em termos de concentrações dos constituintes químicos sob identificação. Primeiramente, o OE-CC apresentou altas concentrações de germacreno D (34,9%) e biciclogermacreno (26,8%), fato que difere do descrito por Xavier et al. (2016) [3]. Eles também coletaram folhas de *C. calophyllum* em maio e encontraram concentração de germacreno D de 4,97%, enquanto o principal constituinte foi o espatulenol (27,93%) [3]. O OE-CA exibiu principalmente germacreno D (21,7%), mas um estudo anterior de OE de folhas de *C. adamantium* coletadas em outubro de 2014 e submetidas a diferentes processos de secagem mostrou que o germacreno D não foi identificado por nenhum método de tratamento [4]. Por fim, as diferenças apresentadas pela OE-PO devem ser destacadas. Este estudo apresentou três constituintes principais - germacreno D (25,0%), γ -muuroleño (18,6%) e o β -Cariofileno (18,9%) - enquanto Estevam et al. (2017) [7] relataram que identificaram os seguintes constituintes principais em OEs de folhas deste *P. ovatum*: espatulenol (17,6%), óxido de cariofileno (16,4%), β -cariofileno (14,0%) e mirceno (8,4%) . Sua composição química foi mais próxima da descrita por Sousa et al. (2021) [8], que também mostraram que o germacreno D era um de seus principais constituintes.

Os fatores que justificam estas variações no teor e composição química de OEs são conhecidos, estando entre eles temperatura, intensidade luminosa, radiação ultravioleta, sazonalidade, estresse hídrico e salino, nutrientes e fertilizantes no solo, concentração de gás carbônico, presença de herbívoros ou patógenos e estágio de desenvolvimento da planta [20].

Em relação à atividade anti-*Malassezia furfur* in vitro dos OE-CC, OE-CA e OE-PO (Tabela 4), inicialmente este patógeno foi escolhido para os testes por ser um fungo lipofílico que causa patologias dermatológicas, incluindo foliculite, dermatite e seborreia, que são tratadas principalmente com cetozonazol [21]. O cetozonazol foi usado como controle positivo e exibiu CIM = 0.0625 µg/mL. OE-CC e OE-PO exibiram o mesmo valor de CIM = 750 µg/mL contra *M. furfur*; já para o OE-CA, o valor foi de 375 µg/mL. OE-CA foi mais ativo que o extrato das folhas de *P. marginatum* (CIM = 625 µg/mL) [21]. Diferentes OEs já tiveram sua atividade anti-*Malassezia furfur* descrita na literatura recente e mostraram etnofarmacologia relevante [22]. Donato et al. (2020) avaliaram esta atividade antifúngica dos OEs extraídos de diferentes gêneros de plantas: *Thymus*, *Artemisia*, *Malaleuca*, *Cinnamomun*, *Ocimum*, *Zataria*, *Rosmarinus*, *Origanum*, *Syzigium*, *Foenicolum*, *Thapsia*, *Tachyspermum* e *Myrtus* [22]. Os valores mais próximos de OE-CC, OE-CA e OE-PO foram para os OEs de *Salvia rosmarinus* [22]. Dados já publicados na literatura referenciam que amostras com valores de MIC ≤ 500 µg/mL apresentam forte atividade antifúngica e MIC ≤ 1000 µg/mL, moderada atividade antifúngica [23]. Por este motivo, OE-CA foi considerado fortemente ativo contra *M. furfur* e OE-CC e OE-PO, moderadamente ativos. A presença do constituinte majoritário germacrene D nos três óleos essenciais estudados é notável, uma vez que este sesquiterpeno é conhecido na literatura atual por sua alta atividade antibacteriana e antifúngica [28].

Estudos apontam que alguns OEs exibem atividade antifúngica em razão da natureza lipofílica dos componentes terpenoides, que podem provocar rupturas nas membranas das células fúngicas, levando-as à morte. A ligação dos monoterpenos ao ergosterol ocasiona a desestabilização das membranas celulares dos fungos pela inibição da biossíntese do ergosterol, bloqueando o crescimento de leveduras como *M. furfur*. Pela inibição do seu crescimento na fase S do ciclo celular, os OEs interferem na via de sinalização da morfogênese das pseudo-hifas impedindo a formação de biofilmes resistentes [23].

Inicialmente, é preciso deixar claro por qual razão o modelo de quimiotaxia foi escolhido para avaliar a atividade anti-inflamatória. Das células com grande capacidade de responder a estímulos quimiotáticos, destacam-se os granulócitos circulantes no sangue periférico. Entre esses, os neutrófilos, também conhecidos como polimorfonucleares (PMN), constituem a população celular primária na defesa contra vários tipos de microrganismos presentes no meio ambiente, acumulando-se rapidamente no sítio invasivo ou de lesão. Sua participação no processo inflamatório é multifuncional e envolve (primeira etapa) reconhecer seletivamente o agente agressor, responder apropriadamente por meio de locomoção, segunda etapa, fagocitose do microrganismo, terceira etapa, e eliminação, última etapa [24, 25]. Para tanto, têm a habilidade de secretar substâncias não só capazes de retardar a disseminação da infecção, mas, quando necessário, também recrutar outros tipos de leucócitos para o foco infeccioso/inflamatório. Seu núcleo poli lobulado permite ultrapassar poros muito menores que o seu diâmetro, característica esta que serve como pré-requisito à sua habilidade de se comprimir e passar através do pavimento de células endoteliais (diapedese) e continuar migrando em direção ao foco inflamatório pelo processo de quimiotaxia [24, 25].

O neutrófilo é uma célula que participa da defesa inata e, nos tecidos, está presente em todas as portas de entrada do organismo humano que fazem contato com o meio externo. A quimiotaxia ou movimento celular direcional a favor (quimiotaxia positiva) ou contra (quimiotaxia negativa) um gradiente químico é comum a várias células eucarióticas e, no caso particular dos leucócitos, é o mecanismo pelo qual essas células se acumulam no sítio inflamatório [24, 25].

A exposição de leucócitos humanos a diferentes concentrações de todos os OEs (EO-CC, EO-CA e EO-PO) resultou em inibição direta dependente da dose de PMN nas seguintes doses 5, 10, 15,7; 24,4 e 32,5 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 5-7). Os resultados mostram que os OEs em avaliação são capazes de interferir na quimiotaxia do PMN, que foi investigada em um sistema *in vitro* específico para avaliar esta função. Portanto, a atividade anti-inflamatória pode estar relacionada à sua capacidade de alterar mecanismos que envolvem o recrutamento de células envolvidas na resposta inflamatória. Para OE-CC, o melhor valor de inibição de 94% foi alcançado na concentração de 24,4 $\mu\text{g/mL}$, uma vez que na maior concentração testada, de 32,5 $\mu\text{g/mL}$, não houve mudança neste percentual (Tabela 5). OE-CA revelou potencial inibitório de 96% nas doses de 15,7; 24,4 e 32,5 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 6). Quando se avaliou

OE-PO, ele exibiu o melhor e mais alto percentual de inibição, de 97% na concentração de 32.5 µg/mL (Tabela 7).

Efeitos inibitórios de plantas medicinais sobre a quimiotaxia de PMN como os aqui apresentados têm sido descritos também para OEs de outras plantas [26]. Por exemplo, o óleo essencial de *Hypericum perforatum* e de alguns de seus constituintes químicos puros também foi testado isoladamente [27]. Entre os autores que estudaram este processo, estão Schepetkin et al. (2020), que avaliaram a atividade anti-inflamatória do germacreno D, que exibiu $IC_{50} = 5.4 \mu\text{g/mL}$ [27]. Sustentados por este dado recentemente publicado, os autores do presente estudo sugerem que a boa atividade anti-inflamatória exibida pelos OE-CC, OE-CA e OE-PO seja em grande parte devida à presença do germacreno D, considerando também o efeito sinérgico dos demais constituintes, presentes em menores concentrações.

Portanto, apesar de os OEs testados na presente pesquisa terem apresentado resultados sugestivos de sua participação na quimiotaxia, não se pode excluir a possibilidade do envolvimento dessas plantas em outros mecanismos intracelulares participantes da resposta inflamatória. Estudos mais aprofundados desses efeitos poderão ser conduzidos por meio de ensaios experimentais específicos, que investiguem os mecanismos celulares em nível molecular.

Tabela 4. Atividades antifúngica *in vitro* de EO-CC, EO-CA e EO-PO (CIM = µg/mL).

Amostras	<i>M. furfur</i>
OE-CC	750
OE-CA	375
OE-PO	750
Cetoconazol*	0.0625

*Controle positivo

Tabela 5. Resposta quimiotática *in vitro* de neutrófilos tratados com a suspensão de OE-CC.

Concentração (µg/mL)	Distância de migração (µm)	% Inibição
5	10 ± 1	70
10	7 ± 1	75
15.7	8 ± 2	89
24.4	8 ± 2	94
32.5	9 ± 2	94
Controle*	113 ± 1	100

Os resultados da distância de migração são média ± erro padrão da média. *Controle positivo: Lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*.

Tabela 6. Resposta quimiotática in vitro de neutrófilos tratados com a suspensão de OE-CA

Concentração (µg/mL)	Distância de migração (µm)	% Inibição
5	5 ± 2	72
10	6 ± 1	84
15.7	8 ± 2	96
24.4	8 ± 2	96
32.5	8 ± 2	96
Controle*	113 ± 1	100

Os resultados da distância de migração são média ± erro padrão da média. *Controle positivo: Lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*.

Tabela 7. Resposta quimiotática in vitro de neutrófilos tratados com a suspensão de OE-PO.

Concentração (µg/mL)	Distância de migração (µm)	% Inibição
5	6 ± 1	81
10	7 ± 1	87
15.7	8 ± 1	95
24.4	9 ± 1	96
32.5	10 ± 1	97
Controle*	113 ± 1	100

Os resultados da distância de migração são média ± erro padrão da média. *Controle positivo: Lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*.

5.4. CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo destacam os OEs de três espécies encontradas no Cerrado de Goiás, Brasil, como alternativas promissoras para desenvolver novos agentes antifúngicos e anti-inflamatórios para uso clínico. O OE-CA, entre as três exposições estudadas, foi o que melhor inibiu atividade antifúngica contra *M. furfur*. Em termos de atividade anti-inflamatória, OE-PO foi o mais ativo nos testes realizados in vitro. Em suma, este estudo é uma contribuição original e importante para o conhecimento químico e farmacológico das espécies *C. calophyllum*, *C. adamantium* e *P. ovatum*.

Agradecimentos: Os autores agradecem ao IFGOIANO - Campus Rio Verde, FAPEG, CNPq e CAPES, pelo apoio financeiro.

5.5 REFERÊNCIAS

1. Reis AF, Schemiele M. Características e potencialidades dos frutos do Cerrado na indústria de alimentos. *Braz. J. Food Technol.* 2019; 22(1): e2017150.
2. Durazzini AMS, Machado CHM, Fernandes CC, Miranda MLD. Chemical composition and effect of hydrodistillation times on the yield of essential oil from *Eugenia pyriformis* leaves. *Obrital: Electron. J. Chem.* 2019; 11(5): 334-338.
3. Xavier MN, Alves JM, Carneiro NS, Souchie EL, Silva EAJ, Martins CHG, Ambrosio MALV, Egea MB, Alves CCF, Miranda MLD. Composição química do óleo essencial de *Cardiopetalum calophyllum* Schtdl. (Annonaceae) e suas atividades antioxidante, antibacteriana e antifúngica. *Rev. Virtual Quim.* 2016; 8(5): 1433-1448.
4. Oliveira JD, Alves CCF, Miranda MLD, Martins CHG, Silva TS, Ambrosio MALV, Alves JM, Silva JP. Rendimento, Composição química e atividades antimicrobiana e antioxidante do óleo essencial de folhas de *Campomanesia adamantium* submetidas a diferentes métodos de secagem. *Rev. Bras. Pl. Med.* 2016; 18(2): 502-510.
5. Sá S, Chaul LT, Alves VF, Fiuza TS, Tresvenzol LMF, Vaz BG, Ferri PH, Borges LL, Paula JR. Phytochemistry and antimicrobial activity of *Campomanesia adamantium*. *Braz. J. Pharmacogn.* 2018; 28(1): 303-311.
6. Estevam EBB, Alves CCF, Esperandim VR, Cazal CM, Souza AF, Miranda MLD. Chemical composition, anti-*Trypanosoma cruzi* and cytotoxic activities of the essential oil from green fruits of *Protium ovatum* (Burseraceae). *Rev. Bras. Frutic.* 2018; 40(1): e-794.
7. Estevam EBB, Deus IPB, Silva VP, Silva EAJ, Alves CCF, Alves JM, Cazal CM, Magalhães LG, Pagotti MC, Esperandim VR, Souza AF, Miranda MLD. *In vitro* antiparasitic activity and chemical composition of the essential oil from *Protium ovatum* leaves (Burseraceae). *An. Acad. Bras. Ciênc.* 2017; 89(4): 3005-3013.
8. Sousa WC, Oliveira Filho JG, Alves CCF, Forim MR, Cazal CM. Chemical composition and antifungal potential of essential oils from different aerial parts of *Protium ovatum* Engl. *Aust. J. Crop Sci.* 2021; 15(04): 570-576.
9. Alves CCF, Oliveira JD, Estevam EBB, Xavier MN, Nicolella HD, Furtado RA, Tavares DC, Miranda MLD. Antiproliferative activity of essential oils from three plants of the Brazilian Cerrado: *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae),

- Protium ovatum* (Burseraceae) and *Cardiopetalum calophyllum* (Annonaceae). *Braz. J. Biol.* 2020; 80(2): 290-294.
10. Silva FFA, Fernandes CC, Oliveira GA, Candido ACBB, Magalhães LG, Vieira TM, Crotti AEM, Silva CA, Miranda MLD. *In vitro* antileishmanial and antioxidant activities of essential oils from different parts of *Murraya paniculata* (L.) Jack: a species of Rutaceae that occur in the *Cerrado* biome in Brazil. *Aust. J. Crop Sci.* 2020; 14(02): 347-353.
 11. Chrystal P, Pereira AC, Fernandes CC, Souza JM, Martins CHG, Potenza J, Crotti AEM, Miranda MLD. Essential oil from *Psidium cattleianum* Sabine (Myrtaceae) fresh leaves: chemical characterization and *in vitro* antibacterial activity against endodontic pathogens. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 2020; 63(1): e20190196.
 12. Adams RP. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. Carol Stream, Illinois, USA: Allured Publishing Corporation, 2007.
 13. Demitto FO, Amaral RCR, Biasi RP, Guilhermetti E, Svidzinski TIE, Baeza LC. Suscetibilidade a antifúngicos *in vitro* de *Candida* spp. em pacientes do hospital universitário regional de Maringá-PR. *J. Bras. Patol. Med. Lab.* 2012; 48(5): 315-321.
 14. Clinical and Laboratory Standards Institute. Method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard-third edition M27-A3. CLSI, Wayne, PA, USA, 2008.
 15. Leong C, Buttafuoco A, Glatz M, Bosshard PP. Antifungal susceptibility testing of *Malassezia* spp. with an optimized colorimetric broth microdilution method. *J. Clin. Microbiol.* 2017; 55(6): 1883-1893.
 16. Sarker SD, Nahar L, Kumarasamy Y. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the *in vitro* antibacterial screening of phytochemicals. *Methods* 2007; 42(4): 321-324.
 17. Castilhos TS, Giordani RB, Henriques AT, Menezes FS, Zuanazzi JAS. Avaliação *in vitro* das atividades antiinflamatória, antioxidante e antimicrobiana do alcaloide montanina. *Rev. Bras. Farmacogn.* 2007; 17(2): 209-214.
 18. Zigmond SH, Hirsch JG. Leukocyte locomotion and chemotaxis. New methods for evaluation and demonstration of a cell-derived chemotatic factor. *J. Exp. Med.* 1973; 137(2): 387-410.

19. Snedecor GW, Cochran WG. 1974. Statistical methods applied to experiments in agriculture and biology. Iowa: The Iowa State University Press Ames.
20. Neves DSC, Santana GN, Krepsky PB. Variação intraespecífica na composição e teor do óleo essencial de *Lippia thymoides*. *Rev. Fitos*. 2021; 15(2): 192-203.
21. Bezerra GB, Ramos CS. Perfil químico biomonitorado das folhas de *Piper marginatum* durante a ontogenia. *Rev. Virtual Quim*. 2021; 13(1): 260-269.
22. Donato R, Sacco C, Pini G, Bilia AR. Antifungal activity of different essential oils against *Malassezia* pathogenic species. *J. Ethnopharmacol*. 2020; 249(1): 112376.
23. Ferrão KS, Butzge J, Mezzomo L, Calil LN, Apel M, Mezzari A, Limberger RP. Atividade antifúngica de óleos essenciais frente a *Candida* spp. *Braz. J. Hea. Rev*. 2020; 3(1): 100-113.
24. Silva IC. Neutrófilos: aspectos clássicos, plasticidade e novas funções imunorregulatórias. *Rev. Int. Est. Exp*. 2015; 7(único): 35-46.
25. Medeiros AC, Dantas Filho AM. Cicatrização das feridas cirúrgicas. *J. Surg. CI Res*. 2016; 7(2): 87-102.
26. Schepetkin IA, Ozek G, Ozek T, Kirpotina LN, Khlebnikov AI, Quinn MT. Chemical composition and immunomodulatory activity of essential oils from *Rhododendron albiflorum*. *Molecules* 2021; 26(1): 3652.
27. Schepetkin IA, Ozek G, Ozek T, Kirpotina LN, Khlebnikov AI, Quinn MT. Chemical composition and immunomodulatory activity of *Hypericum perforatum* essential oils. *Biomolecules* 2020; 10(1): 916.
28. Valarezo E, Gaona-Granda G, Morocho V, Cartuche L, Calva J, Meneses MA. Chemical constituents of the essential oil from Ecuadorian endemic species *Croton ferrugineus* and its antimicrobial, antioxidant and α -glucosidase inhibitory activity. *Molecules* 2021; 26: 4608.

6. CAPÍTULO II

(De acordo com as normas da revista *Natural Product Research*)

Óleos essenciais dos frutos verdes e maduros de *Protium ovatum* Engl. e sua ação antifúngica contra *Malassezia furfur* e diferentes espécies de *Cândida*

Resumo

Este trabalho tem como objetivo investigar a composição química e as atividades anti-*Malassezia furfur* e anticândida de óleos essenciais (OEs) de frutos maduros de *Protium ovatum* (OE-FM) e frutos verdes (OE-FV). Os OEs foram avaliados pelo método de ensaio em microplaca para determinar suas atividades anticândida e anti-*Malassezia furfur* em termos de Concentração Inibitória Mínima (CIM = $\mu\text{g/mL}$). Além disso, a avaliação dos efeitos dos óleos no biofilme (CIMB= $\mu\text{g/mL}$) também foi determinada para *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. metapsilosis* e *C. parapsilosis*. Na atividade anticândida, o OE-FM apresentou resultados in vitro em concentração (CIM entre 62,5-250 $\mu\text{g/mL}$), enquanto OE-FV foi expressivamente mais ativo ($> 10 \mu\text{g/mL}$). Contra *M. furfur*, OE-FM e OE-FV revelaram valores de CIM de 375 e 1500 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Ambas as análises CG-FID e CG-EM revelaram que os principais componentes em ambos os OEs foram limoneno e mirceno. Esses achados podem ser usados como dados iniciais para estudos posteriores das espécies de *Protium*.

Palavras-chave: infecção fúngica; doenças de pele; Pitiríase versicolor; fruta funcional; candidíase; anfotericina B

6.2. Introdução

A pitiríase versicolor é uma infecção fúngica superficial crônica não contagiosa, causada por leveduras do gênero *Malassezia*, que normalmente se apresenta assintomática, benigna, e na maioria das vezes, recidivante, que pode ter seu desenvolvimento facilitado devido à oleosidade cutânea, umidade e à própria temperatura (Silva et al., 2021; Durazzini et al., 2019).

Doenças causadas por espécies de *Malassezia* são caracterizadas pelo surgimento de eritemas e lesões descamativas, com coloração variável desde o branco ao marrom, sendo encontrada normalmente nos membros superiores, tronco e face (Saunte et al., 2020). Especificamente, *M. furfur* pode ser encontrada em três formas de infecções superficiais: pitíriase versicolor, foliculite e dermatite seborreica (Oliveira et al., 2022).

Neste mesmo espectro de fungos patogênicos, outras espécies oportunistas são as pertencentes ao gênero *Cândida*. Por exemplo, a candidíase caracteriza-se como a infecção fúngica mais comum, sendo *C. albicans* seu agente etiológico mais frequente (Alshaikh and Perveen, 2021). O grande problema enfrentado por cientistas de todo o mundo é o aumento de microrganismos cada vez mais resistentes aos antifúngicos disponíveis comercialmente. Neste cenário de resistência fúngica, as plantas são fontes alternativas e alvo de vários estudos que visam à obtenção de compostos bioativos, como, por exemplo, aqueles presentes em óleos essenciais (León-Méndez et al., 2019).

A espécie *Protium ovatum* (Figura S1) pertence à família Burseraceae e é conhecida na região Centro-Oeste do Brasil como vick-do-cerrado, uma planta produtora de OEs, podendo estes serem extraídos de diferentes partes vegetativas e órgãos reprodutivos (Sousa et al., 2021). Estevam et al. (2017) e Estevam et al. (2018) relataram o potencial biológico de OEs de frutos e folhas verdes contra *Trypanosoma cruzi* e *Leishmaniose amazonensis*, e citotoxicidade em LLCMK2 células epiteliais aderentes.

Poucos estudos têm avaliado o potencial biológico dos OEs das espécies do gênero *Protium* e nenhum estudo ainda investigou sua ação antifúngica contra *M. furfur* e diferentes espécies de *Cândida*. Portanto, este estudo teve como objetivo avaliar (i) as atividades anticândida e anti-*Malassezia furfur* in vitro de OEs extraídos de frutos verdes e maduros de *P. ovatum* e (ii) seus constituintes voláteis identificados por CG-DIC e CG-EM.

6.3. Resultados e Discussão

Os constituintes voláteis dos OEs dos frutos verdes de *P. ovatum* (OE-FV) e dos frutos maduros (OE-FM) foram identificados por CG-DIC e CG-EM. Primeiramente, é notável a presença dos mesmos constituintes químicos majoritários em ambos os OEs, variando apenas as suas concentrações (Tabela S1). Hidrocarbonetos Monoterpenos

foram a única classe de compostos encontradas em ambos os óleos: limonene (36.2%), mirceno (30.1) e α -pineno (16.7%) foram os constituintes majoritários do OE-FV. Os mesmos óleos, porém, em concentrações diferentes foram identificados para OE-FM: limoneno (60.1%), mirceno (20.7%) e α -pineno (16.5%). Diferença significativa é evidenciada quando se compara o teor de limoneno presente nos frutos verdes e maduros de *P. ovatum*, em OE-FM essa concentração é bem maior.

Em termos de composição química, os achados do presente estudo estão de acordo com os dois únicos artigos encontrados na literatura. No primeiro, Sousa et al. (2021) também reportaram a composição química dos frutos verdes e maduros de *P. ovatum*, sendo esta composição bastante semelhante à que está sendo descrita agora. O segundo e último estudo publicado evidencia os mesmos constituintes majoritários no OE-FV, entretanto com maior abundância de mirceno (Estevam et al., 2018).

Os poucos achados na literatura sobre estudos químicos e biológicos com esta espécie da família Burseraceae reforçam, sobretudo, a necessidade de novas investigações tendo como alvo está espécie botânica. Em continuação à nossa linha de pesquisa que visa a conhecer o potencial bioativo de OEs (Fernandes et al., 2021), OE-FV e OE-FM exibiram atividade anti-*Malassezia furfur*, com valores de CIM = 1500 $\mu\text{g/mL}$ e 375 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela S2), respectivamente.

A literatura confirma que os OEs são agentes promissores contra espécies de *Malassezia*, e o valor de CIM obtido para OE-FV é próximo aos valores descritos para outros OEs como os extraídos de *Salvia rosmarinus* e *Mentha spicata* (Sai and Mathur, 2021). Vinciguerra e colaboradores (2018) reportaram resultados para dois diferentes OEs - *Origanum vulgare L.* e *Thymus vulgaris L.* - que apresentaram maiores CIMs (780 $\mu\text{g/mL}$ e 920 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente). Os mesmos autores consideraram a atividade promissora quando os valores de CIM estiveram entre 450-900 $\mu\text{g/mL}$, atribuindo aos OEs estudados potencial agente antimicrobiano contra *M. furfur* (Donato et al., 2020). Com base nestes estudos, é possível considerar como satisfatória a atividade mostrada pelo OE-FM. Para a atividade anticândida, notáveis resultados também foram obtidos e novamente OE-FM mostrou maior atividade. Os menores valores de CIM exibidos pelo OE-FM foram para *Candida albicans* (62.5 $\mu\text{g/mL}$), *C. glabrata* (62.5 $\mu\text{g/mL}$), *C. metapsilosis* (250 $\mu\text{g/mL}$) e *C. parapsilosis* (250 $\mu\text{g/mL}$) (Tabela S3). Por outro lado, OE-FV mostrou fraca atividade contra todas as cepas testadas (CIM > 1000 $\mu\text{g/mL}$ – Tabela S3). Tendo em vista os bons resultados obtidos para as quatro espécies de *Candida*, a inibição de formação de biofilme (CIMB) também foi avaliada e *C.*

albicans, *C. glabrata* e *C. parapsilosis* exibiram o mesmo valor de CIM = 250 µg/mL, enquanto para *C. metapsilosis*, o valor foi de 1000 µg/mL (Tabela S4).

Estudos de produtos naturais contra fungos de espécies de *Cândida* com CIM ≤ 1000 µg/mL são considerados relevantes e com CIM ≤ 250 µg/mL são altamente interessantes (Souza et al., 2021). Este estudo sugere que as boas atividades exibidas pelo OE-FM podem estar relacionadas às suas altas concentrações de limoneno (60,1%), uma vez que é um constituinte promissor que tem atividade antifúngica bem conhecida (Muñoz et al., 2020; Jeong-Hyun e Lee, 2011).

Tabela S1. Composição química dos OEs dos frutos verdes (**OE-FV**) e dos frutos maduros (**OE-FM**) de *Protium ovatum*)

Compostos	IR		%AR	
	IR _{lit}	IR _{exp}	OE-FV	OE-FM
α-Tujeno	924	922	0.5	-
α-pineno	932	930	16.7	16.5
Sabineno	969	968	0.5	0.3
β-pineno	974	974	5.1	2.0
Mirceno	988	987	30.1	20.7
δ-3-Careno	1008	1007	9.1	-
o-Cimeno	1022	1020	-	0.4
Limoneno	1024	1024	36.2	60.1
β-Ocimeno	1032	1030	1.8	-
Hidrocarbonetos Monoterpenos			100.0	100.0
Total identificado			100.0	100.0

TR = Tempo Retenção; IR_{xp} = Índice de retenção relativo para *n*-alcanes (C₈-C₂₀) na coluna Rtx-5MS; IR_{lit} = Índice de retenção de Kovats (valores da literatura – Adams,2007). %AR = Abundância relativa

Tabela S2. Atividade anti-*Malassezia furfur* de OE-FV e OE-FM

Óleos essenciais	CIM (µg/mL)
OE-FV	1500
OE-FM	375
Cetoconazol*	0.0625

*Controle positivo

Tabela S3. Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos OE-FV e OE-FM contra espécies de *Cândida*.

Microrganismos	OE-FV	OE-FM	Anfotericina B*
<i>Candida albicans</i> ATCC 90028	>1000	62.5	1.00
<i>Candida glabrata</i> ATCC 2001	>1000	62.5	0.25
<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	>1000	1000	0.25
<i>Candida metapsilosis</i> ATCC 96143	>1000	250	0.50
<i>Candida orthopsilosis</i> ATCC 96141	>1000	1000	1.00
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	>1000	250	1.00
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 90018	>1000	1000	0.35
<i>Candida rugosa</i> ATCC 10571	>1000	1000	0.35
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 13903	>1000	1000	1.00

*Controle positivo

Tabela S4. Concentração Inibitória Mínima para Inibição de formação de Biofilme-CIMB dos OE-FM (capacidade de redução de $\geq 90\%$ da densidade óptica (OD)).

Microrganismos	CIMB ($\mu\text{g/mL}$)	Controle positivo *
<i>Candida albicans</i> ATCC 90028	250	1.00
<i>Candida glabrata</i> ATCC 2001	250	1.00
<i>Candida metapsilosis</i> ATCC 96143	1000	0.5
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 90018	250	0.5

*Cultura medium/biofilmes/XTT/menadiona

6.4. Sessão Experimental

6.4.1. Material Vegetal

Os frutos verdes e maduros de *Protium ovatum* foram coletados na região do Cerrado da Universidade de Rio Verde Rio Verde (UniRV), em Rio Verde, Goiás, Brazil (17°47'53" S e 50° 55'41" W) em setembro de 2021 (9:00 horas). O material

vegetal foi identificado pela botânica Erika Amaral e depositado no Herbário Jatainense professor Germano Guarim com o número de exicasta HJ 7420.



Figure S1. *Protium ovatum* frutos: Frutos verdes (esquerda) e frutos maduros (direita)

Fonte: a autora.

6.4.2. Extração do Óleo essencial

Os OEs foram obtidos dos frutos verdes e maduros de *P. ovatum* (100 g), os quais foram reduzidos em moinho de facas e tiveram seu óleo essencial extraído pelo método de hidrodestilação feita em aparelho tipo Clevenger a 100 °C por 3 h. Após a coleta manual dos OEs, os vestígios de água remanescentes nos óleos foram removidos com sulfato de sódio anidro, tendo este processo sido seguido por filtração. Os OEs foram armazenados em frascos âmbar e mantidos em geladeira a 4°C até a análise.

6.4.3. Identificação da composição química dos OE-FV e OE-FM

Os OE-FV e OE-FM foram dissolvidos em éter etílico e analisados por cromatografia gasosa-deteção de ionização de chama (CG-FID) e cromatografia gasosa-espectrometria de massa (CG-EM) das marcas Shimadzu QP5000 Plus e GCMS2010 Plus (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão). A temperatura da coluna em CG-FID foi programada para subir de 60 a 240°C a 3°C/min e foi mantida a 240°C por 5 min. O gás transportador era H₂ a uma taxa de fluxo de 1,0 ml/min. O equipamento foi configurado para operar no modo de injeção: o volume de injeção foi de 0,1 µL

(razão de divisão de 1:10) enquanto as temperaturas do injetor e do detector foram de 240 e 280°C, respectivamente. As concentrações relativas dos componentes foram obtidas por normalização das áreas dos picos (%). As áreas relativas consistiram na média de análises de CG-FID em triplicata. As condições de CG-EM e a identificação foram relatadas anteriormente (Souza et al., 2021). A identificação de componentes voláteis (Tabela S1) foi baseada em seus índices de retenção em uma coluna capilar Rtx-5MS (30 m X 0,25 mm; 0,250 µm) sob as mesmas condições de operação usadas para CG em relação a uma série homóloga de n-alcanos (C₈ -C₂₀). As estruturas foram comparadas por computador Wiley 7, NIST 08 e FFNSC 1.2 e seus padrões de fragmentação comparados com dados da literatura (Adams, 2007).

6.4.4 Ensaio Anti-*Malassezia furfur*

Para avaliar a atividade anti-*Malassezia furfur*, a metodologia escolhida está de acordo com os procedimentos descritos na literatura (CLSI, 2008). O teste de microdiluição em caldo, com modificações, foi feito conforme proposto por Leong et al. (2017). Foi utilizada uma cepa padrão da American Type Culture Collection: *Malassezia furfur* (ATCC 14521). As concentrações de OEs sob investigação variaram de 1,46 a 3000 µg/mL. O meio de cultura foi RPMI-1640 (Gibco), tamponado com morfolino propanossulfônico (MOPS, Sigma), pH 7,0, suplementado com 2% de glicose, 1% de azeite (Nativp), 1% tween 80 (Neon) e 0,5% bílis bovina seca (Sigma-Aldrich). A suspensão de levedura foi ajustada por espectrofotômetro (530 nm) para atingir a concentração inicial de 0,5 a $2,5 \times 10^3$ células/mL. O controle positivo foi o cetoconazol (Pfizer), cujas concentrações variaram de 0,031 a 16 µg/ml. Ambas as espécies (cepas) *Candida parapsilosis* (ATCC 22019) e *C. krusei* (ATCC 6258) foram empregadas como controle de qualidade para monitorar o desempenho do ensaio. A placa de fundo plano de 96 poços foi incubada em estufa microbiológica a 30°C por 96 h. Para revelar o crescimento de levedura, 30 µL de solução aquosa de resazurina a 0,01% (Sigma) foi adicionada a cada poço (Sarker et al., 2007). As placas foram reincubadas por 24h e, em seguida, a análise foi baseada nas variações de cor entre azul (sem crescimento de levedura) e rosa (com crescimento de levedura). A concentração mais baixa da amostra de teste em que o poço permaneceu azul foi considerada a CIM.

6.4.5. Espécies de Cândida

Cepas de referência de seis espécies de Cândida, *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida glabrata* ATCC 2001, *Candida krusei* ATCC 6258, *Candida metapsilosis* ATCC 96143, *Candida orthopsilosis* ATCC 96141, *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Candida parapsilosis* ATCC 90018, *Candida rugosa* ATCC 10571 e *Candida tropicalis* ATCC 13903, foram usadas para estudo. As cepas foram mantidas a -70°C em água destilada estéril mais 50% de glicerol e subcultivadas em ágar Sabouraud dextrose (SDA, Difco, Detroit, MI) e o meio CHROMagar Candida Medium (Becton Dickinson and Company, Sparks, MD) a 37°C por 24 h para garantir pureza e viabilidade.

6.4.6. Determinação da concentração inibitória mínima

Ensaio de suscetibilidade antifúngica in vitro de HE-SO foram realizados pelo método de microdiluição em caldo de acordo com o protocolo M27-S4 adaptado do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2012). Foram utilizadas placas de microtitulação estéreis (Corning Inc., NY, EUA). A concentração do inóculo foi de $2,5 \times 10^3$ células/mL. As concentrações de anfotericina B (AMB) e dos produtos testados variaram de 0,03 a 16 µg/mL e de 3,90 a 2.000 µg/mL, respectivamente. AMB e HE-SO foram solubilizados em DMSO (2%) e diluídos em meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), ao qual foi adicionada glicose a 0,2%. As cepas *C. parapsilosis* ATCC 22019 e *C. krusei* ATCC 6258 e AMB foram incluídas como controles de qualidade (CLSI 2012). A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada pelo indicador fluorométrico resazurina a 0,01% (p/v) (Far et al., 2018). A CIM foi definida como a concentração mais baixa de antifúngico/HE-SO que manteve uma tonalidade azul. O ponto de corte AMB adotado foi ≤ 1 µg/mL, enquanto AMB > 1 µg/mL foi considerado resistente (Alastruey-Izquierdo et al., 2015). Os poços onde ocorreu o crescimento de microrganismo passaram para a cor rosa. Todos os testes foram feitos em triplicata.

6.4.7 Avaliação do efeito nos Biofilmes (CIMB)

Os testes foram feitos para avaliar a atividade dos óleos essenciais testados contra biofilmes de *Cândida*, foi avaliada a inibição da formação de biofilme para determinar a concentração mínima de inibição de biofilme (CIMB). OE-FV e OE-FM foram utilizados após a determinação da CIM. Foi utilizada uma placa de microtitulação estéril de 96 poços de fundo plano (Corning). A inibição da formação de biofilme pelas cepas de *Cândida* foi testada de acordo com uma metodologia previamente descrita (Pierce et al., 2008). Os OEs (faixa de concentração de 1,95 a 2000 µg/mL) foram dissolvidos em DMSO e diluídos duas vezes em meio RPMI 1640 a 35°C por 48 h. A viabilidade do biofilme foi medida pelo ensaio de redução do sal de tetrazólio (30-[1-(fenilaminocarbonil) -3,4-tetrazólio] -bis(4-metoxi-6-nitro), ácido benzeno sulfônico hidratado, XTT, pela adição de 100 µL de XTT-menadiona para cada poço. Foram incluídos poços contendo meio de cultura/biofilmes/XTT/menadiona (controle positivo) e poços contendo meio de cultura/XTT/menadiona (controle negativo). A densidade óptica (DO) foi lida em um leitor de placas de microtitulação (Asys - Eugendorf, Salzburg, Áustria) em um comprimento de onda de 492 nm (Pierce et al., 2008). A concentração efetiva dos OEs capazes de reduzir $\geq 90\%$ DO foi considerada como CIMB.

6.5. Conclusão

Este estudo mostrou o potencial químico e biológico de OEs de frutos maduros e verdes de *Protium ovatum* (Burseraceae) cultivados no bioma Cerrado. Diferenças significativas foram observadas em relação à concentração do monopeno limoneno, estando este em maior concentração nos OEs extraídos dos frutos maduros. Com relação às atividades biológicas em avaliação, OE-FM foi mais ativo que OE-FV em relação ao fungo *M. furfur* e às diferentes espécies de *cândida*. Em suma, este estudo promoveu uma amostra inicial de ações de tratamento visando ao uso *in vivo*, como, por exemplo, em formulações de medicamentos e xampus utilizando OE-FM, que seriam auxiliares promissores no tratamento de doenças fúngicas.

Declaração de divulgação

Nenhum conflito de interesse é relatado pelos autores.

Agradecimentos

Os autores agradecem à CAPES, FAPEG, CNPq e ao IFGOIANO - *Campus* Rio Verde pelo apoio financeiro.

6.6 Referências

- Adams, R.P. (2007), Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. Carol Stream, Illinois, USA: Allured Publishing Corporation.
- Alastruey-Izquierdo, A.; Melhem, M.S.C.; Bonfietti, L.X.; Rodriguez-Tudela, J.L. Susceptibility test for fungi: clinical and laboratorial correlations in medical mycology. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo* 2015, 57, 57-64.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard-third edition M27-A3. CLSI, Wayne, PA, USA, 2008.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; fourth informational supplement. Document M27-S4. 2012, Wayne, PA.
- Donato, R., Sacco, C., Pini, G., Bilia, A.R. (2020). Antifungal activity of different essential oils against *Malassezia* pathogenic species. *J. Ethnopharmacol.*, 249, 112376.
- Durazzini, A.M.S., Machado, C.H.M., Fernandes, C.C., Willrich, G.B., Crotti, A.E.M., Candido, A.C.B.B., Magalhães, L.G., Squarisi, I.S., Ribeiro, A.B., Tavares, D.C., Martins, C.H.G., Miranda, M.L.D. (2019). *Eugenia pyriformis* Cambess: a species of the Myrtaceae family with bioactive essential oil. *Nat. Prod. Res.*, 24, 1-5.
- Estevam, E.B.B., Deus, I.P.B., Silva, V.P., Silva, E.A.J., Alves, C.C.F., Alves, J.M., Cazal, C.M., Magalhães, L.G., Pagotti, M.C., Esperandim, V.R., Souza, A.F., Miranda, M.L.D. (2017). *In vitro* antiparasitic activity and chemical composition of the essential oil from *Protium ovatum* leaves (Burseraceae). *An. Acad. Bras. Ciênc.*, 89, 3005-3013.
- Estevam, E.B.B., Alves, C.C.F., Esperandim, V.R., Cazal, C.M., Souza, A.F., Miranda, M.L.D. (2018). Chemical composition, anti-*Trypanosoma cruzi* and cytotoxic activities of the essential oil from green fruits of *Protium ovatum* (Burseraceae). *Rev. Bras. Frutic.*, 40, e-794.
- Far, F.E.; Al-Obaidi, M.M.J.; Desa, M.N.M. Efficacy of modified Leeming-Notman media in a resazurin microtiter assay in the evaluation of in-vitro activity of fluconazole against *Malassezia furfur* ATCC 14521. *J. Mycol. Med.* 2018, 28, 486-491.

- Leong C, Buttafuoco A, Glatz M, Bosshard PP. Antifungal susceptibility testing of *Malassezia* spp. with an optimized colorimetric broth microdilution method. *J. Clin. Microbiol.* 2017; 55(6): 1883-1893.
- Fernandes, C.C., Chrystal, P., Pereira, A.C., Colli, A.C., Stenico, L., Ribeiro, A.B., Squarisi, I.S., Candido, A.C.B.B., Tavares, D.C., Magalhães, L.G., Crotti, A.E.M., Martins, C.H.G., Miranda, M.L.D. (2021). First report on chemical composition and biological properties of volatile oil from *Psidium firmum* O. Berg leaves. *Quim. Nova* 44, 570-574.
- Jeong-Hyun, L., Lee, J.S. (2011). Cytotoxicity and anti-*Malassezia* activity of limonene. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.*, 39, 387-389.
- León-Méndez, G., Pájaro-Castro, N., Pájaro-Castro, E., Torrenegra-Alarcón, M., Herrera-Barros, A. (2019). Essential oils a source of bioactive molecules. *Rev. Colomb. Ciênc. Quím. Farm.*, 48, 80-93.
- Muñoz, J.E., Rossi, D.C.P., Jabes, D.L., Barbosa, D.A., Cunha, F.F.M., Nunes, L.R., Arruda, D.C., Tabora, C.P. (2020). In vitro and in vivo inhibitory activity of limonene against different isolates of *Candida* spp. *J. Fungi*, 6, 183.
- Oliveira, A.C.S.D., Fernandes, C.C., Vieira, T.M., Crotti, A.E.M., Souza, J.M., Martins, C.H.G., Miranda, M.L.D. (2022). Essential oils from different *Citrus* species and evaluation of their *in vitro* antibacterial, antiacetylcholinesterase, anti-inflammatory and antifungal activities. *Aust. J. Crop Sci.*, 16, 86-92.
- Pierce, C.G.; Uppuluri, P.; Tristan, A.R.; Wormley, F.L., Jr.; Mowat, E.; Ramage, G.; Lopez-Ribot, J.L. A simple and reproducible 96-well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. *Nat. Prot.* 2008, 3, 1494–1500.
- Sai, C.S., Mathur, N. (2021). Inhibitory potential of essential oils on *Malassezia* strains by various plants. *Biol. Life Sci. Forum*, 4, 46.
- Sarker SD, Nahar L, Kumarasamy Y. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the *in vitro* antibacterial screening of phytochemicals. *Methods* 2007; 42(4): 321-324.
- Saunte, D.M.L., Gaitanis, G., Hay, R.J. (2020). *Malassezia*-associated skin diseases, the use of diagnostics and treatment. *Front. Cell Infect. Microbiol.*, 10, 112.
- Silva, J.S., Brandão, V.R., Coutinho, S.D.A., Paciencia, M.L.B., Frana, S.A., Días, I.E.C., Suffredini, I.B. (2021). Antifungal activity of the essential oils of *Osteophloeum platyspermum* (Myristicaceae) against *Malassezia* spp. and *Candida albicans* influenced by seasonality and climatic factors. *Eur. J. Med. Pl.*, 32, 31-45.
- Sousa, W.C., Filho, J.G.O., Alves, C.C.F., Forim, M.R., Casal, C.M. (2021). Chemical composition and antifungal potential of essential oils from different aerial parts of *Protium ovatum* Engl. *Aust. J. Crop Sci.*, 15, 570-576.

- Souza, A.O., Pereira, P.S., Fernandes, C.C., Andrade, G., Pires, R.H., Candido, A.C.B.B., Magalhães, L.G., Vieira, T.M., Crotti, A.E.M., Martins, C.H.G., Miranda, M.L.D. (2021). Hexane extract from *Spiranthera odoratissima* A. St.-Hil. Leaves: chemical composition and its bioactive potential against *Candida* pathogenic species, *Leishmania amazonensis* and *Xylella fastidiosa*. *Nat. Prod. Res.*, 25, 1-6.
- Vinciguerra, V., Rojas, F., Tedesco, V., Giusiano, G., Angiolella, L. (2019). Chemical characterization and antifungal activity of *Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris* essential oils and carvacrol against *Malassezia furfur*. *Nat. Prod. Res.*, 33, 3273-3277.

7. CONCLUSÃO GERAL

Os óleos essenciais das folhas das três espécies encontradas no cerrado Goiano, *Protium ovatum*, *Campomanesia adamantium* e *Cardiopetalum calophyllum*, são promissores candidatos para o desenvolvimento de novos agentes antifúngicos e anti-inflamatórios de uso clínico, pois se mostraram capazes de inibir o crescimento da levedura *Malassezia furfur* e diferentes leveduras do gênero *Candida*. São promissores também para estudos in vivo, pois, além de apresentarem boa atividade antifúngica, exibiram ainda atividade anti-inflamatória, dois conceitos fundamentais para futura formação de agentes antifúngicos. Apesar de sua boa atividade antifúngica sobre *Malassezia Fufur*, ainda são necessários estudos adicionais para que os OEs possam se tornar um novo agente antifúngico e anti-inflamatório.

Este estudo também mostrou o potencial químico e biológico de OEs de frutos maduros e verdes da espécie *Protium ovatum*. Diferenças foram observadas em relação à concentração do monoterpene limoneno e que o potencial efeito antifúngico está intimamente ligado à sua concentração. Com relação às atividades biológicas em avaliação, o óleo essencial dos frutos maduros foi mais ativo que do que o óleo essencial dos frutos verdes em relação ao fungo *M. furfur* e às diferentes espécies de *Candida*. Em suma, este estudo promoveu uma amostra inicial de ações de tratamento visando ao uso in vivo, como, por exemplo, em formulações de medicamentos e xampus utilizando o óleo essencial do fruto maduro, que seriam auxiliares promissores no tratamento de doenças fúngicas.

Por fim, esse estudo é uma investigação e importante contribuição para o conhecimento químico e farmacológico das espécies *C. calophyllum*, *C. adamantium* e *P. ovatum*.