

Universidade de Brasília – UnB

Faculdade de Ciências da Saúde

Curso de Farmácia

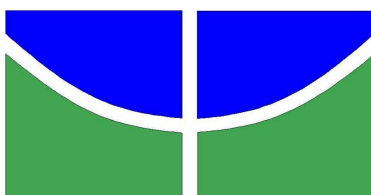
Trabalho de Conclusão de Curso

**Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de
espécies do gênero *Eugenia* (Myrtaceae)**

Allan da Silva Martins

Brasília

2015



Universidade de Brasília – UnB


Faculdade de Ciências da Saúde

Curso de Farmácia

Trabalho de Conclusão de Curso

Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de espécies do gênero *Eugenia* (Myrtaceae)

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
como requisito para aprovação em Bacharel no
curso de Farmácia da Universidade de Brasília.

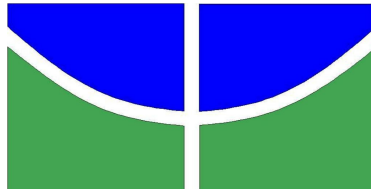


Orientadora: Silvia Ribeiro de Souza

Aluno: Allan da Silva Martins - 11/0007662

Brasília

Dezembro de 2015



Universidade de Brasília – UnB

Faculdade de Ciências da Saúde

Curso de Farmácia

**Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de
espécies do gênero *Eugenia* (Myrtaceae)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
como requisito para aprovação em Bacharel no
curso de Farmácia da Universidade de Brasília.

Aprovado em: 10 de dezembro de 2015



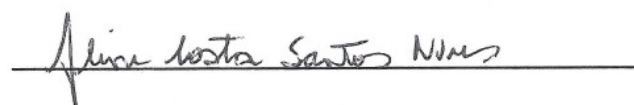
Allan da Silva Martins



Prof. Dr. Silvia Ribeiro de Souza
Universidade de Brasília – Orientadora



Prof. Dr. Lorena Carneiro Albernaz
Universidade de Brasília – Examinadora



Prof. Dr. Aline Costa Santos Nunes
Universidade de Brasília – Examinadora

Às duas mulheres mais importantes da minha vida: Denise Rejane da Silva e Sue Mary Liane de Jesus Marques. Gratidão por toda dedicação que ambas empregam em minha vida. Gratidão pelas apostas e apoio. Gratidão por todo o amor a mim reservado. Gratidão por toda luz!

.Agradecimentos

A Prof. Dr. Silvia Ribeiro de Sousa por confiar e apostar em mim enquanto aluno. Sorte e sucesso na contribuição do conhecimento acadêmico sobre plantas medicinais.

Ao Prof. Dr. Wanderson Flor do Nascimento não só por me ter apresentado os caminhos da bioética, mas também, enquanto professor, amigo, filósofo e Tatá.

A Prof. Dr. Lorena Carneiro Albernaz por me receber sempre com um sorriso estampado, pelo acompanhamento e disposição nos testes microbiológicos.

Ao Laboratório de Tecnologia de Medicamentos, Alimentos e Cosméticos (LTMAC), em especial aos alunos: Breno Noronha, Paula Martins e Tamara Ângelo, pelo apoio e atenção sempre que preciso. Ao laboratório de toxicologia (LabTox), em especial a Prof. Dra. Eloisa Dutra Caldas e a aluna Joseane Mozzaquatro pela disponibilidade nos testes com Cromatografia Gasosa. Ao laboratório de Farmacognosia, em especial as alunas que me acompanharam e deram suporte: Brenda Lucena e Lais Morais.

Aos amigos que me acompanham desde o ensino fundamental e médio. Em especial aquelas que estiveram juntas comigo em toda história de graduação e constituem os pilares de sustentação dessa loucura acadêmica. Agradeço ainda, aos professores, desde as séries iniciais até os atuais, responsáveis pela formação do que sou hoje.

A todos que, de forma direta ou indireta, estiveram presentes e dando apoio em todo o período entre os esforços do vestibular e a finalização da graduação. Aos que constituem minha família e a todos que passaram por minha vida ensinando e aprendendo.

Gratidão todos!

“Sem folha não tem sonho

Sem folha não tem festa

Sem folha não tem vida

Sem folha não tem nada”

-

Maria Bethânia

(Gerônimo / Ildásio Tavares).

. Resumo

Embora o Brasil possua extensa fauna e flora, o conhecimento sobre o quanto essa riqueza contribui cientificamente é ainda restrito. A importância do saber acadêmico sobre a fauna e a flora brasileira se baseia na possibilidade de descoberta de biomoléculas ativas que possam contribuir contra doenças como candidíase, causadas por fungos tão comuns como do gênero *Candida*. Conhecidas pela medicina popular, a *Eugenia uniflora* L (pitanga) e a *Eugenia dysenterica* DC (cagaita) são plantas que possuem importância tanto medicinal quanto alimentícia, dessa forma, ambas as plantas chamam atenção para a descoberta de possíveis terapias. O presente trabalho avaliou a atividade antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais de *E. uniflora* e *E. dysenterica* frente a *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida krusei*. A análise por Cromatografia Gasosa acoplada ao espectrofotômetro Massa/Massa revelou compostos como germacreno, naftaleno e widdrol no óleo de *E. uniflora*; por outro lado o óleo de *E. dysenterica* apresentou compostos como benzofurano e spathulenol. A atividade antioxidante mostrou que a *E. uniflora* se apresenta como melhor sequestradora de radicais que a *E. dysenterica*, ainda que com pouca diferença. O óleo essencial de ambas as plantas não foram ativos na concentração inibitória mínima entre 125 µg/mL e 1000 µg/mL. Os resultados chamam atenção para a continuidade de pesquisas com ambas as plantas com fim a descoberta de quais compostos apresentam melhor atividade antioxidante, bem como, testes para melhor entendimento sobre a ação antimicrobiana de ambos os óleos em concentrações diferentes, para o desenvolvimento de novas terapias eficazes e seguras.

Palavras chave: *Eugenia uniflora*, *Eugenia dysenterica*, *Candida*, Cerrado, antioxidante, antimicrobiana.

. Abstract

Although Brazil has a large fauna and flora, the knowledge about this wealth is very restrict yet. The importance of knowledgement about natural Brazil's wealth is based on the possibility of discovering bioactive molecules that could contribute against diseases like candidiasis, caused by comum fungus as from the *Candida* genus. Recognized by their medicinal properties and as food source, *Eugenia uniflora* L and *Eugenia dysenterica* DC, respectively denominated as pitanga and cagaita, calls attention from research to discovery of new therapies. This research evaluated the antioxidant and antimicrobial activity from *E. uniflora* and *E. dysenterica* against strains of *Candida albicans*, *Candida tropicalis* and *Candida krusei*. The analysis by gas chromatography coupled to spectrophotometer Mass / Mass showed compounds as germacrene, naphthalene and widdrol from the oil of *E. uniflora*; on the other hand the oil from *E. dysenterica* revealed benzofuran and spathulenol compounds. *E. uniflora* shows a better antioxidant activity than *E. dysenterica*, even if with a little difference. The essential oil from both plants did not demonstrate activity between the minimum inhibitory concentration of 125 µg/mL and 1000 µg/mL. The results draws to continue the research with both plants to the description of which compounds has better antioxidant, as well, tests for the better understanding of the antimicrobial action of both oils at different concentrations, for the development of new safe and effective therapies

keys words: *Eugenia uniflora* L, *Eugenia dysenterica* DC, *Candida*, Cerrado, antioxidant, antimicrobial.

. Lista de abreviaturas

AA – Atividade antioxidante

ARR – Atividade de retirada de radical livre

ATCC – *American Type Culture Collection*

BHT – Butil-hidroxi-tolueno

CG-MS/MS – Cromatografia gasosa acoplada ao espectrofotômetro de massa/massa

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institute*

DMSO - Dimetilsulfóxido

DPPH – 2,2-difenil-1-picrilhidrazila

DPPH-H - 2,2-difenilpicril-hidrazina

LabTox – Laboratório de Toxicologia

LTMAC – Laboratório de Tecnologia de Medicamentos, Alimentos e Cosméticos

MOPS – 3-[N-morfolino]-propoanossulfônico

PNPIC – Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares

PNPMF – Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos

RENISUS – Relação Nacional de Plantas de Interesse ao SUS

RPMI – *Roswell Park Memorial Institute Medium*

SUS – Serviço Único de Saúde

. Lista de tabelas, figuras e gráficos

Figuras

Figura 1 Mapa do Bioma Cerrado -3-

Figura 2 Fotos de identificação da *Eugenia uniflora* L -5-

Figura 3 Fotos de identificação da *Eugenia dysenterica* DC -7-

Tabelas

Tabela 1 Rendimento dos óleos essenciais de *E. dysenterica* e *E. uniflora* -16-

Tabela 2 Constituintes dos óleos essenciais de *E. dysenterica* e *E. uniflora* -17-

Tabela 3 Média da AA (%) das amostras e do controle positivo BHT -20-

Gráfico

Gráfico 1 Gráfico representativo da curva de calibração -20-

Gráfico 2 Atividade antioxidante em porcentagem no tempo de 30 minutos -21-

Gráfico 3 Atividade antioxidante em porcentagem 30 minutos após o tempo 1 -22-

. Sumário

Introdução	-1-
Metodologia	
I – Obtenção do material vegetal	-11-
II – Extração dos óleos essenciais	-11-
III – Teste de microdiluição em poço	-12-
III.I – Preparo do meio RPM	-12-
III.II – Preparo das amostras	-12-
III.III – Preparo dos controles positivos e negativos	-12-
III.IV – Preparo dos microrganismos	-13-
III.V – Teste de microdiluição em poço	-13-
IV – Avaliação da atividade antioxidante	-14-
V – Análise do perfil químico	-15-
Resultados e discussões	
I. Rendimento dos óleos essenciais	-16-
II. Avaliação antioxidante	-18-
III. Avaliação microbiológica	-23-
Conclusões	-25-
Referências bibliográficas	-26-

. Introdução

As plantas fazem parte da história e desenvolvimento do ser humano, seja como alimento, com fins curativos e ou ritualísticos. A importância social das plantas medicinais chama atenção para a necessidade de leis de incentivo ao uso racional, bem como, para a pesquisa científica. Detentor de ampla diversidade quanto a fauna e a flora, o Brasil é um berço de abundante material para o conhecimento sobre plantas medicinais. Apoiado nisso, nos últimos anos diversas portarias e resoluções de suporte e incentivo a pesquisa em plantas medicinais têm surgido.

São recentes os marcos para as plantas medicinais no Brasil: Lançada em 2006, a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF), aprovada pelo Decreto 5.813/06, tem como objetivo garantir acesso seguro e uso racional a plantas medicinais e fitoterápicos, bem como, incentivar o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional (ALMEIDA, 2011; BRASIL, 2006).

A Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde (SUS), aprovada pelo Decreto 971/06, atende, sobretudo, à necessidade de se conhecer, apoiar, incorporar e implementar experiências que já vêm sendo desenvolvidas na rede pública de muitos municípios e estados, entre as quais destacam-se aquelas no âmbito da Medicina Tradicional Chinesa-Acupuntura, da Homeopatia, da Fitoterapia, da Medicina Antroposófica e do Termalismo-Crenoterapia (ALMEIDA, 2011; BRASIL, 2006).

O Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, legitimado pela Portaria Interministerial 2.960/08, além de abarcar os objetivos da PNPMF, pretendia inserir plantas medicinais, fitoterápicos e serviços relacionados à fitoterapia no SUS, bem

como, promover o uso sustentável da biodiversidade e a repartição dos benefícios decorrentes do acesso aos recursos genéticos de plantas medicinais e ao conhecimento tradicional associado (ALMEIDA, 2011; BRASIL, 2006).

Em 2009 foi publicada pelo Ministério da Saúde a Relação Nacional de Plantas de Interesse ao SUS (RENISUS). A relação conta com 71 espécies vegetais com a finalidade de orientar estudos e pesquisas que possam subsidiar a elaboração da relação de fitoterápicos disponíveis para uso da população, com segurança e eficácia para o tratamento de determinadas doenças (ALMEIDA, 2011; BRASIL, 2006). Ainda, a quinta edição da Farmacopeia Brasileira, publicada em 2010, conta com o controle de qualidade para 54 drogas vegetais (ALMEIDA, 2011; BRASIL, 2010).

No Brasil, são consideradas cinco regiões em abundância de espécies medicinais: Floresta Amazônica, Mata Atlântica, Pantanal Mato-grossense, Cerrado e Caatinga (ALMEIDA, 2011). O Cerrado cobre cerca de um quarto da área do país, atrás da Amazônia, é o segundo maior bioma da América do Sul, além de ser classificado como um *hotspot*, conceituado por Myers como áreas ricas em biodiversidade (principalmente em espécies endêmicas) e que possuem alto grau de degradação ambiental de biodiversidade (PEREIRA JÚNIOR *et al.*, 2014; OLIVEIRA; PIETRAFESA; BARBALHO, 2008). Abriga 11.627 espécies de plantas nativas já catalogadas, sendo 220 espécies com uso medicinal e mais 416 que podem ser usadas na recuperação de solos degradados, como barreiras contra o vento, proteção contra a erosão, ou para criar habitat de predadores naturais de pragas, além do uso para alimentação (BRASIL, 2015).

Embora rico biodiversidade, apenas cerca de 2,2% da área do Cerrado tem um estatuto de proteção jurídica, o que aponta para a pouca atenção que este bioma recebe, em comparação com a floresta tropical (RIBEIRO *et al.*, 2011). Atualmente, pelo menos, 49%

da vegetação do Cerrado foi convertida em monoculturas extensivas e pastagens (PEREIRA JÚNIOR *et al*, 2014). Depois da Mata Atlântica, Cerrado é o bioma brasileiro que mais sofreu impactos antropogênicos, como representado na Figura 1, e tem sido classificado entre os biomas mais ameaçados do mundo (RIBEIRO *et al.*, 2011).

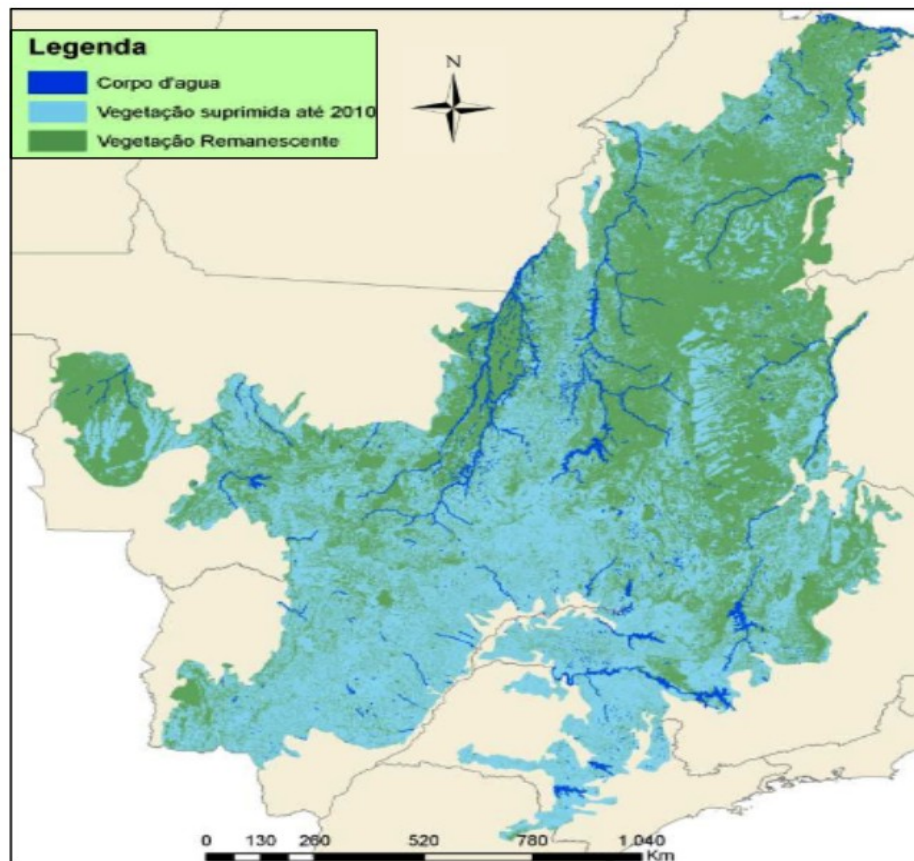


Figura 1: Mapa do Bioma Cerrado, contendo a distribuição espacial das áreas com vegetação nativa, áreas de supressão acumulada até 2010 e corpos d'água.
Fonte: Brasil (2011).

Diante dessa devastação crescente, percebe-se a importância da preservação do Cerrado e suas delimitações geográficas, pois o mesmo pode contribuir para a pesquisa de biomoléculas ativas, a economia e o desenvolvimento social. Embora represente apenas cerca de 2% RENISUS, a família Myrtaceae compreende cerca de 100 gêneros e 3.500 espécies de árvores e arbustos, com 211 espécies naturais do Cerrado (BRASIL, 2014;

GRESSLER; PIZO; MORELLATO, 2006; RIBEIRO *et al.*, 2013).

As espécies da família Myrtaceae apresentam habito lenhoso, raramente são arbustos, folhas com presença de glândulas translúcidas produtoras de terpenos e outras substâncias aromáticas (SIQUEIRA *et al.*, 2013). Os metabólitos secundários das plantas presentes em óleos essenciais e extratos de plantas são indiscutíveis fontes para a descoberta de princípios ativos inovadores para o tratamento de diversas doenças. Constituintes da família Myrtaceae, plantas do gênero *Eugenia* tem apresentado larga atividade antimicrobiana abrangendo dermatófitos, bactérias e fungos (DUARTE *et al.*, 2010).

Elencada na RENISUS, a *Eugenia uniflora* L, conhecida como pitanga, é uma planta nativa da América do Sul, de fácil adaptação a diferentes solos e climas, o que justifica sua presença em diferentes vegetações e ecossistemas (GUZMAN *et al.*, 2014; RODRIGUES *et al.*, 2013). A pitangueira se espalha de países do continente americano ao asiático; no Brasil, a região que mais produz a fruta é o Nordeste (GARMUS *et al.*, 2014).

No Cerrado, a pitangueira ocorre na espécie *Eugenia pitanga*, arbustiva porém, com frutos, flores, usos e propriedades semelhantes a *E. uniflora* (LORENZI; MATOS, 2008). A *E. uniflora* (figura 2) se apresenta como arbusto ou árvore, de folhagem e casca semi-decídua, de 4 a 10 metros de altura, copa estreita, de tronco liso de cor pardo clara (FIUZA *et al.*, 2008). Folhas simples, ovais lanceoladas, em geral com 4,5 a 6,2 centímetros de comprimento e 2,0 a 2,7 centímetros de largura, com aroma característico, quando secas apresentam odor cítrico e sabor picante (FIUZA *et al.*, 2008).

As flores são de cor branca, solitárias ou em grupos de 2 ou 3 nas axilas e nas extremidades dos ramos, com grãos de pólen como único recurso floral atrativo para os polinizadores, sendo enquadrado dentro da categoria de “flores-pólen” (ALMEIDA;

FARIA; SILVA, 2012; FIUZA *et al*, 2008;). Os frutos são do tipo drupa, globosos e sulcados, brilhantes e de cor vermelha, amarela ou preta, com polpa carnosa e agridoce, contendo 1 a 2 sementes (FIUZA *et al*, 2008). Durante o processo de amadurecimento, os frutos mudam de verde para amarelo e segue laranja, vermelho, vermelho escuro, tornando-se quase preto, casos os quais o licopeno é o principal carotenoide encontrado (FILHO *et al*, 2008). Rizomatososa, pode se rebrotar sobre a arvore produzindo touceiras (LORENZI; MATOS, 2008).

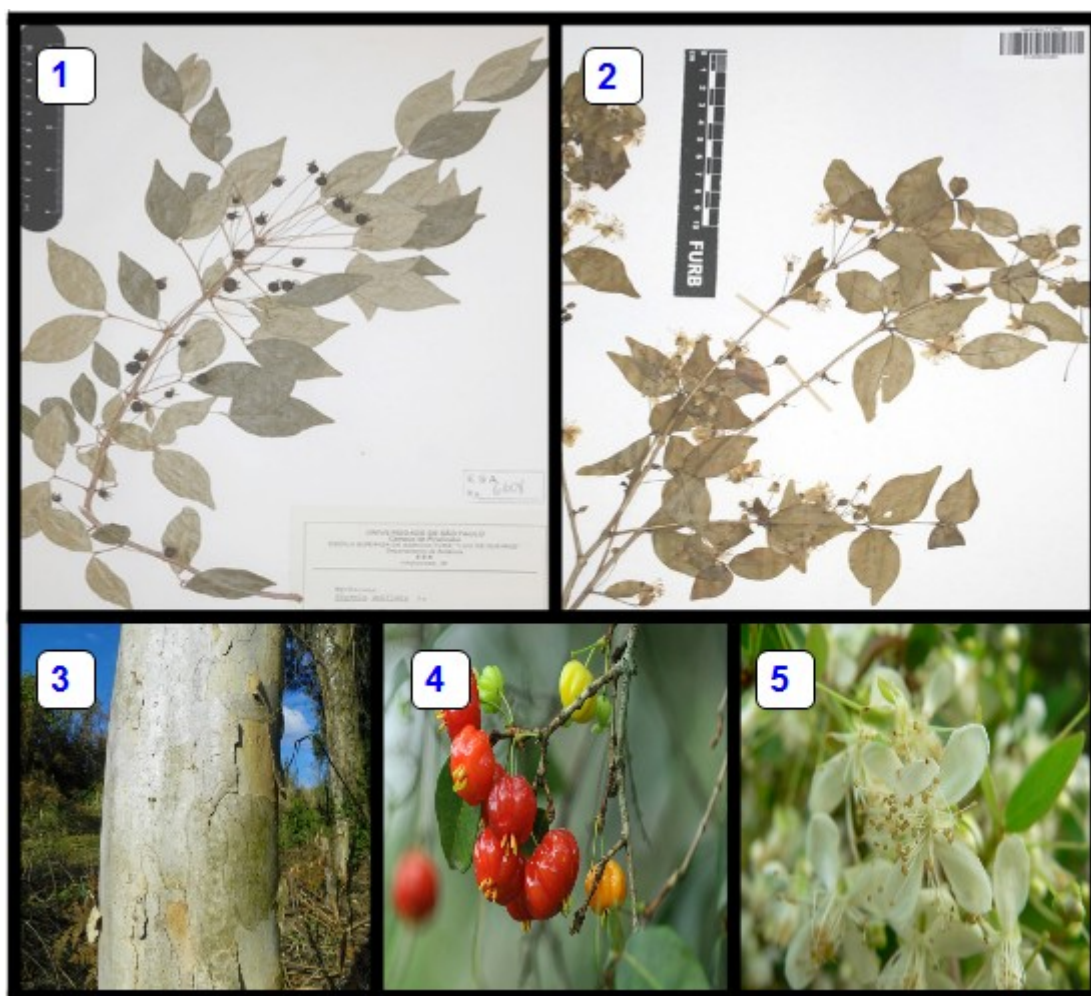


Figura 2: Fotos de identificação da *Eugenia uniflora* L. (1) Excicata com folhas e frutos secos; (2) Excicata com folhas e flores secas; (3) Tronco; (4) Frutos; (5) Flores.

Fonte: (1) Herbário da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (1990); (2)Herbário Dr. Roberto Miguel Klein (2006); (3) Sistema de Identificação Dendrológica Online (2015) ; (4) BORDIGNON (2006); (5) Molz (2009).

A *E. uniflora* apresenta atividades como antioxidantes, antimicrobianas, anti-

hipertrigliceridemia, antivirais, diuréticas, antihiperglicêmico, hipotensores, vasorelaxante, antinociceptiva, hipotérmica, antiinflamatória, antidiarreicos, contração dos músculos, tripanocida, antidepressiva e sobre leishmaniose (GUZMAN *et al.*, 2014; SANTOS *et al.*, 2013; VICTORIA *et al.*, 2013).

Nativa do Cerrado e membro da família Myrtaceae, a *Eugenia dysenterica* DC (figura 3), popularmente conhecida como cagaiteira, é largamente utilizada pelo potencial laxativo da fruta, enquanto as folhas atuam como antidiarreicas (PRADO *et al.*, 2014). Podendo atingir 30 metros de altura, a cagaiteira, é uma árvore de porte médio, tronco cilíndrico e torcido, variando de 20 a 40 centímetros de diâmetro (RIBEIRO *et al.*, 2013). É uma planta perene, de folha caduca, seletivamente heliófita e xerófila (RIBEIRO *et al.*, 2013; VILELA *et al.*, 2012). A floração ocorre no meio da estação seca, a partir de meados de julho ao início de agosto, com o surgimento simultâneo de novas folhas (RIBEIRO *et al.*, 2013).

As flores da cagaiteira são sempre axilares, singular ou agrupadas em conjuntos de três e é polinizada principalmente por abelhas e primatas (incluindo humanos) na dispersão de sementes contribuindo para a variabilidade genética da árvore. (VILELA *et al.*, 2012; RIBEIRO *et al.*, 2013). São hermafroditas, com 1,5 a 2 centímetros de diâmetro, actinomórfica, dialipétalas, dialissépalo, tetrâmeras e cheias de pétalas brancas (RIBEIRO *et al.*, 2013).

O fruto da *E. dysenterica* é uma baga amarela pálida, achatada, globular, com 2 a 3 centímetros de diâmetro, contendo de 1 a 3 sementes globulares brancas que são encerradas por uma polpa ligeiramente ácida (RIBEIRO *et al.*, 2013). Atividade moluscicida, anti-helmíntica, antifúngica e toxicidade em ratos também foram relatadas (VIEIRA *et al.*, 2012).

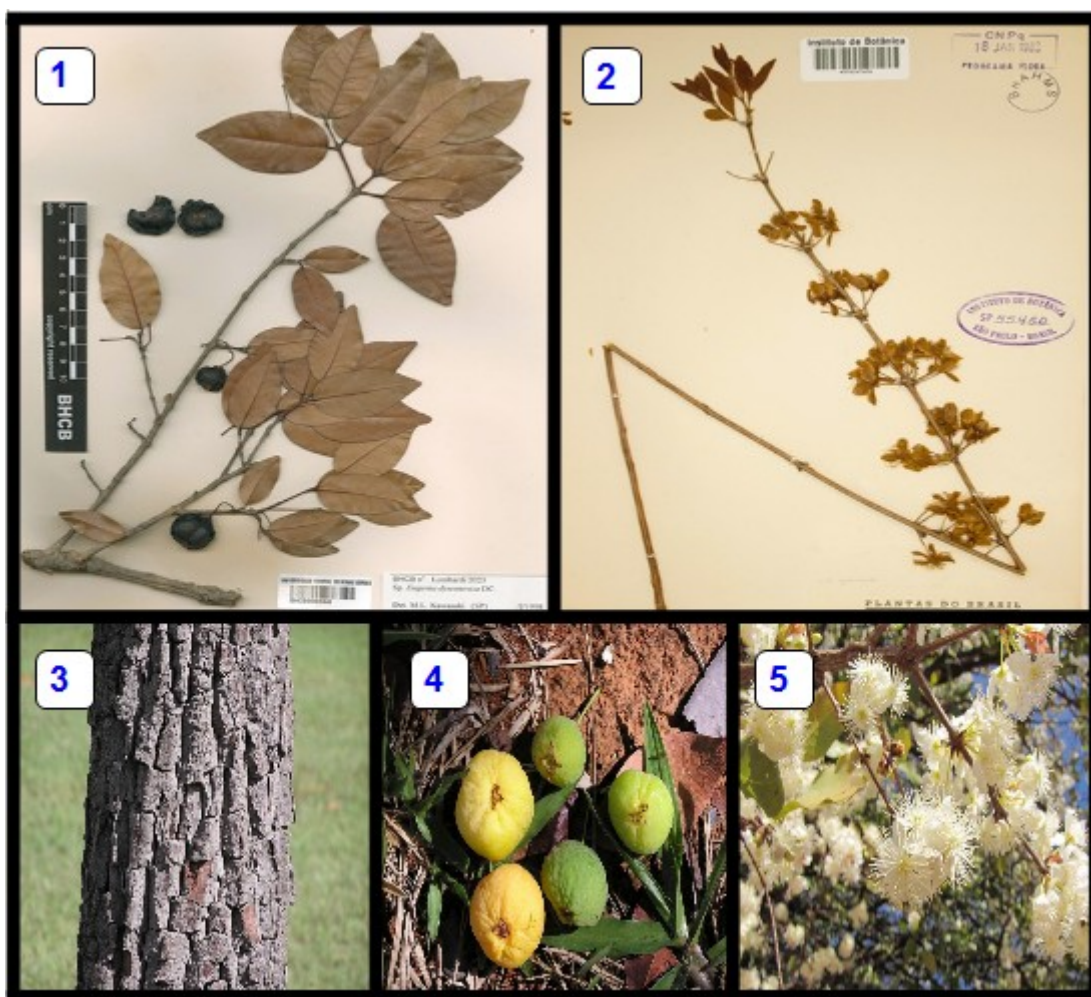


Figura 3: Fotos de identificação da *Eugenia dysenterica* DC. (1) Excicata com folhas e frutos secos; (2) Excicata com folhas e flores secas; (3) Tronco; (4) Frutos; (5) Flores.

Fonte: (1) Herbário BHCBC (1998); (2) Herbário do Instituto de Botânica (1956); (3), (4) e (5) Mercadante (2010).

A *E. dysenterica* apresenta significativa diferença qualitativa e quantitativa dos constituintes das folhas entre espécimes que pode ser atribuída às mudanças climáticas, composição do solo, época de coleta, altitude, métodos de extração e a diferentes biótipos da espécie (SANTOS; BRAZ-FILHO; CASTRO, 2015). A *E. dysenterica* vem sendo estudada para doenças como constipação crônica e síndrome do intestino irritado (OLIVEIRA *et al.*, 2012).

O valor de uso tradicional e social, bem como as propriedades comprovadas tanto

da *E. uniflora* quanto da *E. dysenterica*, chama atenção para o desenvolvimento de estudos na descoberta de moléculas bioativas para novas terapias. Formado por um grupo de três gêneros, os dermatófitos são o grupo de fungos patogênicos mais comuns mundialmente e se dividem em: *Trichophyton*, *Epidermophyton*, *Microsporum* e é comum a infecção por esses fungos estar associada a complicações causadas por leveduras do gênero *Candida* (KINGSBURY; HEITMAN; PINNELL, 2012).

Além de chamar atenção por estarem espalhados de forma global, a infecção por fungos e leveduras é preocupante no que tange à infecções oportunistas em pacientes imunodeprimidos (PERES *et al.*, 2010). São fatores que interferem na epidemiologia das dermatofitoses e leveduras: migração, certas práticas sociais, fatores climáticos, idade, aspectos genéticos, condições de higiene inadequadas, doenças como *diabetes mellitus*, quadros de imunodeficiência e mesmo fatores hormonais (RODRIGUES, 2014; PERES *et al.*, 2010).

A candidíase é formada por conjunto de síndromes clínicas causada por fungos do gênero *Candida*, constituído por cerca de 200 espécies de leveduras, que sobrevivem em diversas partes do corpo (PEIXOTO *et al.*, 2014). A Candidíase consiste numa infecção cosmopolita muito frequente no mundo todo, podendo afetar indivíduos de todas as idades e sexo, sendo de maior prevalência em mulheres (RODRIGUES, 2014). As colônias são de colorações que vão de branco a creme, de superfície lisa ou rugosa, se reproduzem por brotamento e formam pseudo-hifas e hifas nos tecidos (PEIXOTO *et al.*, 2014).

Embora faça parte da flora humana, a *Candida albicans* é uma das representantes mais comuns das infecções, chegando a representar 60% dos isolados clínicos em quadros de candidíase, no entanto, mesmo que em menor frequência, outras espécies podem ser infecciosas, são exemplos a *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*,

Candida krusei, *Candida lusitaniae* e *Candida guilliermondii* (PEIXOTO *et al.*, 2014; RODRIGUES, 2014; YANG *et al.*, 2014).

Ser reconhecida como uma das mais prevalentes em infecções pode estar ligado à ampla presença dessa levedura na natureza, o que a difere de outras espécies que possuem distribuição mais limitada (SANTANA *et al.*, 2013). Uma característica que contribui à virulência da *C. albicans* é a morfogênese, podendo se apresentar como pseudo-hifas ou hifas verdadeiras, além da capacidade de aderência e produção de toxinas (SILVA-ROCHA *et al.*, 2015; SANTANA *et al.*, 2013).

Em condições apropriadas como de imunodepressão, a *C. albicans* é capaz de, além da infecção superficial, difundir-se hematologicamente se espalhando para diversos órgãos; essa condição apresenta grande preocupação para paciente de imunidade frágil como portadores do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), além de ser descrita como importante fator no desenvolvimento de câncer (PEIXOTO *et al.*, 2014; RAMIREZ-GARCIA *et al.*, 2014; MATHÉ; VAN DIJCK, 2013). Outra peculiaridade é a capacidade da *Candida albicans* em formar biofilmes tanto sozinha quanto com a participação de outros microrganismos (SARDI *et al.*, 2012).

A *Candida tropicalis* tem sido relatada como o segundo agente etiológico mais comum em infecções sistêmicas nos pacientes com neoplasias, sendo encontrada em cerca de 50% dos casos de infecção (PEIXOTO *et al.*, 2014; RODRIGUES *et al.*, 2011). A *tropicalis* possui já relatada tolerância a 5-fluorocitosina e pouca resistência ao fluconazol (JIANG *et al.*, 2012). Atrás da espécie *glabrata*, a *Candida krusei* é o quarto patógeno de maior relevância clínica, principalmente pela facilidade em desenvolver resistência a antifúngicos como o fluconazol, anfotericina B e 5-fluorocitosina (PEIXOTO *et al.*, 2014; RODRIGUES *et al.*, 2011; BARBEDO; SGARBI, 2010). Tem forte presença em pacientes

neutropênicos expostos a longos tratamentos de profilaxia com fluconazol (SARDI *et al.*, 2012; COLOMBO; GUIMARÃES, 2003).

Atualmente, o tratamento de dermatofitoses se baseia em aplicações tópicas ou orais e se dividem em cinco principais classes: (1) polienos, que ao se ligarem em esteróis na membrana plasmática da célula fúngica, provoca evasão de eletrólitos, (2) análogos de pirimidina, que interferem na síntese de RNA, (3) os azóis, atuantes na biossíntese do ergosterol, (4) alilaminas, também atuam na síntese do ergosterol, (5) equinocandinas, as quais inibem a síntese de parede celular do fungo (MATHE; VAN DIJCK, 2013).

No entanto, os atuais medicamentos antifúngicos apresetam efeitos adversos como hepatotoxicidade, espectro de ação limitado, tratamento longo e resisistência (KINGSBURY; HEITMAN; PINNELL, 2012). O conhecimento sobre como a atividade patogênica ocorre ainda é insuficiente, somado ao uso irracional de medicamentos que leva à resistência e ou mutações de cepas, o desenvolvimentos de terapias eficazes e seguras se faz necessário.

Levando em consideração o cenário apresentado, o presente trabalho objetivou tanto caracterizar os compostos presentes no óleo essencial de *Eugenia uniflora* L e *Eugenia dysenterica* DC, quanto avaliar a atividade antioxidante e antimicrobiana com a finalidade de descobrir possíveis terapias para o tratamento de diferentes leveduras.

. Metodologia

Os testes foram realizados na Universidade de Brasília, na Faculdade de Ciências da Saúde, Campus Darcy Ribeiro, no laboratório de Farmacognosia, LTMAC (avaliação antioxidante) e LabTox (análise em Cromatografia gasosa acoplada ao espectrofotômetro de massa/massa - CG-MS/MS).

I – Obtenção do vegetal

As folhas de *Eugenia uniflora* L e *Eugenia dysenterica* DC foram coletadas nas adjacências da Universidade de Brasília – Campus Darcy Ribeiro, em seguida higienizadas com papel toalha e colocadas para secar à temperatura ambiente e ao abrigo de sol até atingirem peso constante.

II – Extração dos óleos essenciais

Os óleos essenciais foram obtidos por hidrodestilação em Clevenger, usando 4 L de água destilada e cerca de 70-80 g de massa vegetal previamente talhada com tesoura, deixada em ebulição por 3 horas. Por meio da técnica de separação líquido-líquido, com clorofórmio 100 mL, o óleo foi dissociado da água, repetindo o processo de separação 3 vezes. Em seguida, a fase orgânica foi seca com sódio anidro e filtrada com papel filtro a vácuo. Os óleos foram concentrados por rotaevaporador e deixados para secar à temperatura ambiente e ao abrigo de sol até atingirem peso constante. O óleo essencial foi pesado em balança analítica e o rendimento expresso em porcentagem, calculado segundo a fórmula $R\% = M_1/M_2 * 100$; onde M_1 é a massa total de folhas secas e M_2 é a massa de óleo expresso em gramas.

III – Teste de microdiluição em poço

Todo o teste foi realizado de acordo com o descrito por Theodoro (2009) que tem como base de metodologia os protocolos da CLSI, em especial o protocolo de testes para leveduras M27-A2 (NCCLS, 2002).

III.I – Preparo do meio RPMI

Foi utilizado o meio RPMI 1640 com vermelho de fenol e sem bicarbonato de sódio. Para a obtenção de um litro e meio, foi reconstituído 10,4 g de meio desidratado em água destilada. Após diluição, o meio foi tamponado com ácido MOPS 0,165 M (6,9 g em 200 mL de água deionizada) até pH 7,0, medido com o auxílio de um potenciômetro previamente calibrado.

O meio foi filtrado em uma capela de fluxo laminar utilizando um sistema de filtração a vácuo e um filtro com membrana de 0,22 µm. Em duplicata, uma alíquota de 3 mL desse meio foi colocada em estufa a 37 °C, por cinco dias para o controle de esterilidade, após esse tempo, o meio deveria estar ausente de turbidez e pode ser guardado a 4 °C por duas semanas.

III.II – Preparo das amostras

Os óleos essenciais foram diluídos em DMSO à 100 mg/mL e desta solução, foram diluídos em meio RPMI, até a concentração de 4000 µg/mL e concentração final de DMSO inferior a 5% (v/v).

III.III – Preparo dos controles positivos e negativos

Como controles positivos foram usados Itraconazol e Fluconazol. O Itraconazol, solúvel em DMSO, foi diluído em uma concentração de 16 µg/mL, enquanto o Fluconazol foi diluído a 64 µg/mL. Ambos foram diluídos em meio RPMI. Como controle negativo foi utilizado meio RPMI 100%.

III.IV – Preparo dos microrganismos

Foi inoculada uma colônia dos microrganismos *Candida albicans* ATCC 40177, *Candida krusei* ATCC 40147, *Candida tropicalis* ATCC 40042, para crescimento no período de 48 horas antes do teste, a 35°C, em meio ágar batata dextrose em diferentes tubos de ensaio. O inóculo foi produzido vertendo-se 5 mL de solução salina estéril a 0,85% no tubo de ensaio contendo o fungo. Com o auxílio de uma alça de plantina, a superfície do fungo foi raspada suavemente até que a suspensão adquirisse um grau de turbidez de 0,5 na escala de McFarland. Em seguida, foi feita uma diluição da suspensão na proporção de 1:100, onde uma parte é de suspensão e 99 partes são de meio RPMI. Dessa solução, fez-se uma segunda diluição de 1:20, obtendo-se o inóculo utilizado no teste, com uma concentração que varia de 5×10^2 a $2,5 \times 10^3$ células/mL.

III.V – Teste de microdiluição em poço

Inicialmente foi colocado 100 µL de meio RPMI em todos os poços de uma placa de 96 poços estéril. Em seguida 100 µL das amostras e controles positivos foram colocados nos poços da primeira fileira da placa de modo a se obter 200 µL nos primeiros poços. Com o auxílio de uma pipeta multicanal, regulada para 100 µL, foram feitas diluições seriadas da coluna 1 a 10, homogeneizando a cada diluição e desprezando os 100 µL finais.

Após, 100 µL do inóculo foi colocado nos poços da coluna 1 à coluna 10. Na coluna 11, que corresponde ao controle negativo, foram colocados 100 µL do inóculo. Na coluna 12, correspondente ao controle de esterilidade do meio e controle negativo, foi pipetado 100 µL RPMI. As placas foram tampadas, vedadas com parafilm e incubadas a 35°C por 48 horas.

O resultado foi lido observando se houve crescimento de fungos no fundo das

placas no sentido da direita para a esquerda. O primeiro poço onde não foi observado crescimento de fungos foi considerado o valor do CIM. Caso nenhum dos poços apresente crescimento de fungos, o teste deve ser realizado novamente.

IV – Avaliação da atividade antioxidante.

A atividade de retirada de radical livre com DPPH foi avaliada de acordo com o método descrito por Blois (1958) e Miranda (2010) com algumas modificações. Sobre abrigo de luz, foi preparado 170 mL de uma solução estoque de DPPH em metanol na concentração de 40 µg/mL. A partir da solução estoque foram feitas diluições de 35, 30, 25, 20, 15, 10, 5 e 1 µg/mL. Usando como branco o metanol, a curva analítica foi produzida por espectrofotômetro por meio das absorbâncias em 515 nm de todas as amostras.

Como controle positivo foi usado BHT. Os óleos essenciais de ambas as plantas e o controle positivo foram diluídos nas concentrações de 200, 150, 100, 50, 25 µg/mL. Uma alíquota de 0,3 mL de cada diluição foi adicionada a 2,7 mL da solução estoque de DPPH.

Como branco, foi utilizado uma alíquota de 0,3 mL da solução metanólica mais concentrada adicionada a 2,7 mL da solução de DPPH. Como controle negativo foi utilizado 0,3 mL de metanol adicionado a 2,7 mL da solução de DPPH. Todas as amostras foram analisadas em duplicata, com as absorbâncias medidas a 515 nm nos tempos de 30 minutos entre o início da primeira análise e 30 minutos para o início da segunda análise. Para os seguintes cálculos, foi utilizado a média das duplicatas. Os valores das absorbâncias foram convertidos em porcentagem de atividade antioxidante (%AA), por meio da equação:

$$\%AA = \{ [Abs_{controle} - (Abs_{amostra} - Abs_{branco})] \times 100 \} / Abs_{controle}$$

em que $Abs_{controle}$ é a absorvância inicial da amostra de metanólica de DPPH e $Abs_{amostra}$ é a absorvância da solução metanólica de amostra e DPPH.

V – Analise do perfil químico

A analise do perfil químico foi realizada por meio de um CG-MS/MS, sob as seguintes condições: As amostras foram diluídas na proporção de 1:1000 utilizando diclorometano PA como solvente; o volume de injeção foi de 1 μ L; rampa de temperatura 85 °C por 5 minutos, 25 °C por minuto ate 180 °C, 5 °C por minuto até 280 °C e 10 °C por minuto ate 300 °C por 10 minutos; o tempo da corrida foi de 40,8 minuto. O fluxo de gás de 1,2 mL/min foi mantido constante. A linha de transferência e fonte de ionização mantidas a 250 °C. Foi utilizado o modo Full Scan, com faixa de massa selecionada em 50 a 600 m/Z, com tempo de escaneamento 0,158 segundos. Filamento ligado dos 6 aos 40,6 minutos.

. Resultados e discussões

I. Rendimento e análise do perfil químico dos óleos essenciais

A tabela 1 mostra os rendimentos dos óleos essenciais em relação ao total de massa seca. Embora tenha sido utilizado cerca de três vezes mais massa seca de *E. dysenterica* DC em relação a *E. uniflora* L, o rendimento de *E. uniflora* foi por volta de dezesseis vezes maior em comparação com a *E. dysenterica*.

Tabela 1: Rendimento dos óleos essenciais de *E. dysenterica* DC e *E. uniflora* L.

ESPÉCIE	MASSA VEGETAL QUANTIDADE DE RENDIMENTO		
	SECA (g)	ÓLEO (g)	(%)
<i>E. dysenterica</i> DC	308,4	0,80	0,26
<i>E. uniflora</i> L	87,49	3,68	4,20

A *E. dysenterica* é caracterizada pela presença de componentes bioativos como α -Pineno, β -Pineno, β -ocimeno, δ -cadineno, α -humuleno, limoneno, cariofileno, monoterpenos e outros (VILELA, 2012; DUARTE, 2010). A *E. uniflora* é marcada por fitoconstituintes como germacreno A, B e D, curzereno, selina-1,3,7-trien-8-ona, além de linalol, spathulenol, longiborneol, viridiflorol, furandieno (SANTOS, 2015; VICTORIA, 2012; LAGO *et al.*, 2011). Sesquiterpenos foram descritos como os componentes mais prevalentes tanto no óleo de *E. dysenterica* como no óleo de *E. uniflora*, em ambos os óleos também são encontrados β -cariofileno, δ -cadineno, β -ocimeno, β -pineno (SANTOS; BRAZ-FILHO; CASTRO, 2015; VICTORIA, 2012; VILELA, 2012; LAGO *et al.*, 2011; DUARTE, 2010).

A tabela 2 mostra os compostos de picos mais expressivos na análise em CG-MS/MS. Os constituintes que apresentaram os picos mais significativos foram o naftaleno, ainda que apontado com uma probabilidade de 9,15 e o benzofurano, com uma

probabilidade de 95,6; respectivamente compostos da *E. uniflora* e *E. dysenterica*. O widdrol, encontrado no óleo de *E. uniflora*, vem sendo estudado por seu possível potencial antioxidante e participação na indução da inibição do ciclo celular (KWON *et al.*, 2010; NUÑEZ *et al.*, 2006).

Embora os compostos apresentados na tabela 2 para a *E. dysenterica* tenham apresentado picos muito evidentes, os demais picos foram de pouca visibilidade. Por outro lado, a análise do óleo de *E. uniflora* apontou um cromatograma com picos diversos e tempos de retenção muito próximos mesmo que bem expressivos. Em ambos os óleos foram observados diversos picos com compostos que pode-se sugerir que surgiram de degradação devido ao método de análise ou por contaminação no processo de obtenção do óleo até a análise do óleo.

Tabela 2: Constituintes dos óleos essenciais de *E. dysenterica* DC e *E. uniflora* L.

ESPÉCIE	Composto	P (%)	TR (min)
<i>E. uniflora</i> L	Germacreno	16,6	10,67
	Widdrol	21,3	11,25
	γ -himachaleno	44,4	9,68
	Cariofileno óxido	44,7	10,59
	Naftaleno	9,15	10,04
	β -guaineno	9,52	9,32
<i>E. dysenterica</i> DC	Benzofurano	95,6	9,82
	Spathulenol	42,7	10,52
	Procerin	39,7	12,77

P(%): Probabilidade em porcentagem; **TR:** Tempo de retenção em minutos.

A composição do óleo essencial de ambas as plantas tem sido descrito como variável de região para região, por fatores bióticos e abióticos como: sazonalidade, presença de herbívoros, patógenos, presença de outras espécies de planta, polinização e outros (SANTOS; BRAZ-FILHO; CASTRO, 2015; VICTORIA *et al.*, 2012; VILELA *et*

al., 2013; DUARTE *et al.*, 2010). No entanto, Vilela *et al* (2012) reportam que o óleo essencial de *E. dysenterica* possui fator de variação, em geral, ligado a fatores genéticos e não ambientais (VILELA *et al.*, 2012).

Esse conjunto de fatores podem ter influenciado no rendimento final dos óleos. Ambas as plantas foram colhidas logo após a floração, condição que pode ter motivado uma produção menor de óleos essenciais.

II. Avaliação antioxidante

Os radicais livres são moléculas produzidas naturalmente, altamente instáveis, que possuem um par de elétrons desemparelhado e desempenham função de oxidação nos organismos (MIRANDA, 2010). O excesso de radicais livres no organismo leva a problemas como lipo-peroxidação, danos a proteínas, membranas plasmáticas, enzimas e ao DNA (MIRANDA, 2010).

Por outro lado, agentes antioxidantes são substâncias que, mesmo em concentrações menores que os radicais livres, retardam ou inibem a atividade oxidante, transformando-se em radicais não reativos que, portanto, causam menos dano ao organismo (MIRANDA, 2010). Os agentes antioxidantes, que podem ser endógenos ou exógenos, normalmente precisam agir em conjunto com outros antioxidantes para ser observada uma boa atividade (MIRANDA, 2010).

O BHT é um agente antioxidante sintético, de baixo peso molecular e lipofílico (MIRANDA, 2010). É classificado como um antioxidante primário, ou seja, são compostos que atuam inibindo radicais livres por meio da doação de elétrons de BHT é largamente utilizado em testes de atividade antioxidante, bem como na indústria de alimentos e de cosméticos.

Saber a atividade antioxidante de um alimento ou composto é de extrema relevância para se ter claro as capacidades de proteção deste produto sobre ele mesmo e sobre a oxidação de outras células (RIBEIRO *et al.*, 2013). Embora não exista um teste que mensure de forma concreta a capacidade antioxidante de determinado produto, diversos testes são citados na literatura, entre eles o poder de redução do DPPH (RIBEIRO *et al.*, 2013). A atividade antioxidante de plantas pode variar de acordo com o órgão vegetal.

O DPPH é um radical livre que na presença de antioxidantes doadores de hidrogênio, é reduzido a 2,2-difenilpicril-hidrazina (DPPH-H) (MIRANDA, 2010; BLOIS, 1958). Inicialmente, o DPPH apresenta coloração violeta e com a atividade radical adquire coloração amarela quanto maior for a atividade antioxidante (MIRANDA, 2010; BLOIS, 1958). A ausência de descoloração implica na pouca ou ausente atividade antioxidante (MIRANDA, 2010).

O teste de DPPH é utilizado por ser rápido, permitir a avaliação antioxidante de diversas amostras, tem boa sensibilidade, não requer grande massa de amostras além de permitir a avaliação tanto de substância lipofílicas quanto hidrofílicas (MIRANDA, 2010).

A curva de calibração do DPPH, determinada pelas concentrações de 35, 30, 25, 20, 15, 10, 5 e 1 µg/mL é representada no gráfico 1. A reta da curva de calibração apontada pelo gráfico é $y=0,0145x-0,1224$. O R^2 encontrado foi de 0,7627, portanto, um valor abaixo do indicado que são valores próximos a 1.

O valor do R^2 encontrado neste trabalho entra em conflito com o descrito no trabalho de Moraes (2010), bem como de outros trabalhos realizados com a mesma metodologia. As baixas concentrações escolhidas para o ensaio podem ter influenciado o teste, uma vez que a possibilidade de erros de pesagem pode aumentar. Dado o R^2 da curva de calibração igual a 0,7627, este valor foi utilizado como referência para valores

dos testes antioxidante das amostras e controle positivo com o DPPH.

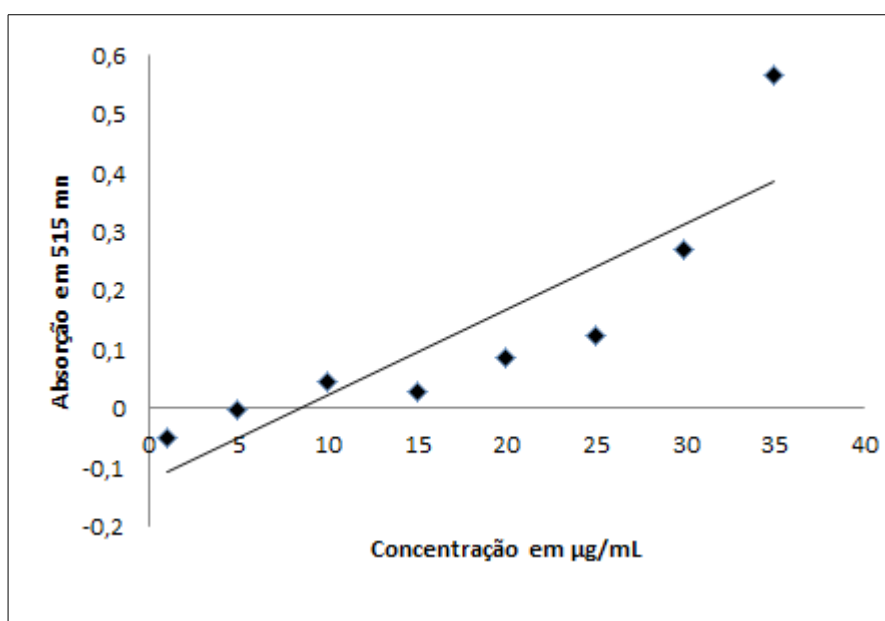


Gráfico 1: Gráfico representativo da curva de calibração.

A tabela 3 mostra a média da % AA nos tempos 1 e 2 das amostras e do controle positivo BHT. A capacidade de reduzir radicais DPPH pelos óleos essenciais das folhas secas de *E. uniflora* mostraram média maior que as folhas de *E. dysenterica*, tanto no tempo 1 quanto no tempo 2, no entanto, nenhuma das amostras teve porcentagem de atividade antioxidante próximas do controle. Ainda, tanto a *E. uniflora* quanto a *E. dysenterica* mostra um perfil de diminuição da atividade antioxidante no tempo dois, em contraste com o perfil do controle BHT que mostrou atividade antioxidante aumentada em relação ao tempo.

Tabela 3: Média da AA (%) das amostras e do controle positivo BHT.

Amostras	Tempo 1	Tempo 2
	Média AA (%)	Média AA (%)
<i>E. dysenterica</i> DC	13,378	11,203
<i>E. uniflora</i> L	13,654	12,611
BHT	45,134	62,112

A atividade antioxidante foi plotada com o eixo x sendo representado pelas concentrações das amostras utilizadas nos testes, enquanto o eixo y é representado pela AA em porcentagem, como pode ser visto nos gráficos 2 e 3 representando os tempos 1 e 2 respectivamente. Os gráficos 2 e 3 retratam bem a pouca diferença entre a capacidade antioxidante das amostras utilizadas nos teste, bem como, a linearidade do perfil de ambas em comparação com atividade de sequestro de radical crescente do controle BHT em relação à dose.

Um dado que chama atenção no gráfico 2, são as folhas de *E. dysenterica* que apresentaram maior pico de AA na concentração de 100 µg/mL, enquanto as folhas de *E. uniflora* mostraram maior atividade na concentração de 200 µg/mL, embora não muito expressiva em relação as concentrações de 50, 100 e 150 µg/mL que foi relativamente contínua.

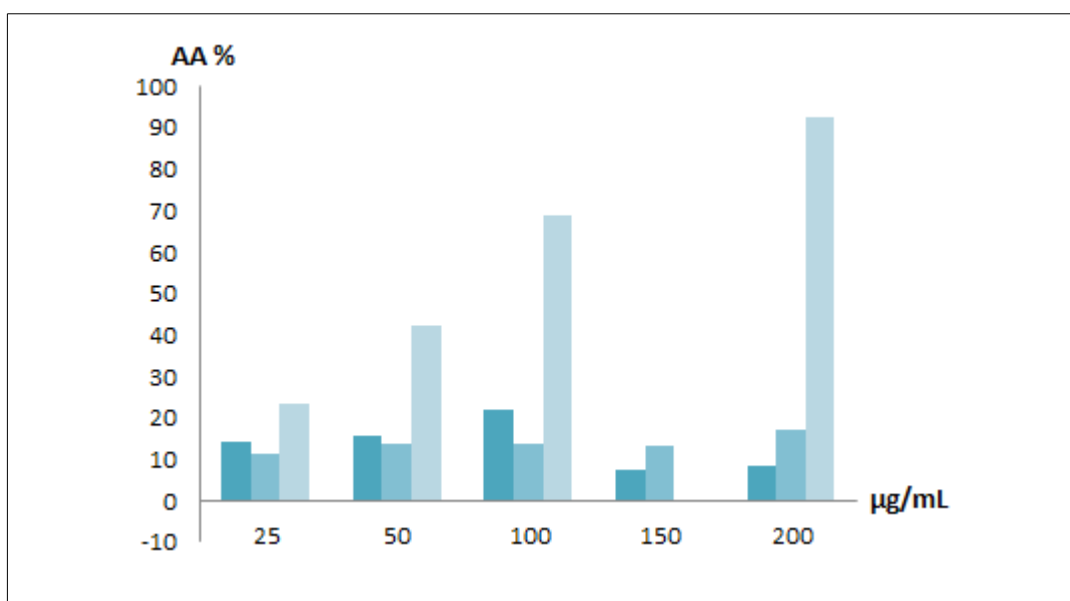


Gráfico 2: Atividade antioxidante em porcentagem no tempo de 30 minutos. Onde as barras azuis estão dispostas na seguinte ordem: *E. dysenterica*, *E. uniflora* e BHT.

Como é possível observar no gráfico 2, na concentração de 150 µg/mL o controle BHT demonstrou uma atividade de - 0,223, o valor negativo pode estar relacionado a erros

técnicos, condições de trabalho, diferenças entre aparelhos e outros, porém, o perfil da atividade do controle pode ser observada com facilidade por meio das demais concentrações.

O gráfico 3, que representa a % AA no tempo 2, trás um perfil relativamente diferente do observado no gráfico 1. A *E. dysenterica* apresentou o maior pico de AA na concentração de 50 µg/mL, as folhas de *E. uniflora* mostraram maior atividade na concentração de 100 µg/mL, ou seja, ambas apresentaram pico de atividade em concentrações no tempo 2 que representam metade da concentração de melhor pico no tempo 1.

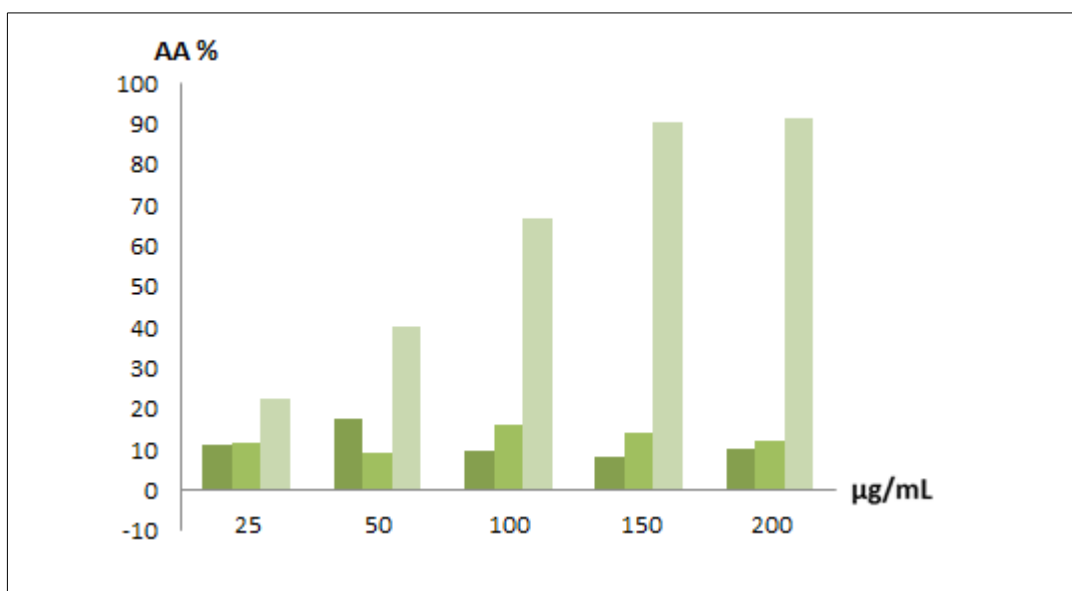


Gráfico 3: Atividade antioxidante em porcentagem 30 minutos após o tempo 1. Onde as barras verdes estão dispostas na seguinte ordem: *E. dysenterica*, *E. uniflora* e BHT.

O controle BHT demonstrou uma atividade que manteve o perfil de ação antioxidante crescente, no entanto, nas concentrações entre 150 e 200 µg/mL, como pode ser observado no gráfico 3, a atividade sequestrante foi de 90,285 e 91,221, apresentando portanto, linearidade, essa característica pode estar ligada tanto à atividade saturada do controle sobre o meio como sobre a atividade não estar relacionada à concentração de

agente antioxidante.

III. Avaliação microbiológica

O teste de microdiluição determina a concentração inibitória mínima das amostras e controles, capazes de inibir o crescimento de fungos (THEODORO, 2009). Os testes de microdiluição em poço foram realizados duas vezes, em triplicata cada um, sendo o segundo teste como confirmatório do primeiro. Para o presente trabalho considerou-se que amostras com CIM menores que 125 µg/mL são ativas e valores acima deste são vistos como não ativas. Ambos os testes apresentaram o mesmo perfil, onde nenhuma das concentrações foram ativas incluindo os controles positivos Itraconazol e Fluconazol.

O óleo de *E. dysenterica* foi descrito como potencial antimicrobiano frente a cepas de *Pyricularia grisea*, *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* e *Cryptococcus neoformans* var. *Gatti*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* (SARMENTO-BRUM *et al.*, 2014; COSTA *et al.*, 2000). Costa *et al* (2000) relatam não atividade do óleo de *E. dysenterica* sobre *Candida albicans* mesmo em concentrações acima de 1000 µg/mL, entrando em acordo com os resultados do presente trabalho. Não foi encontrado estudos sobre a atividade antimicrobiana de *Eugenia dysenterica* sobre cepas de *Candida krusei* e *Candida tropicalis*.

A atividade antifúngica da *E. uniflora* sobre cepas de *C. albicans* tem sido relatada com valores de MIC que variam de 1800 µg/mL a 280 µg/mL, sendo os compostos selina-1,3,7-trien-8-ona e germacreno apontados como possíveis responsáveis pela atividade antimicrobiana (VICTORIA *et al*, 2012). Lago *et al* (2011), descreve a atividade dos óleos de *E. uniflora* frente a *C. albicans* e *C. tropicalis* 1800 e 900 µg/mL respectivamente, além de outras espécies de *Candida*, no entanto, *C. krusei* não respondeu a atividade dos óleos.

A atividade de plantas depende dos compostos que a constituí. A concentração de certas moléculas bioativas sobre outras dependem tanto de fatores genéticos como diferenças quanto a altitude, riqueza nutricional do solo, temperatura e outros fatores. Ainda, a variabilidade nos resultados dos testes podem ser provenientes das diferenças genéticas entre as cepas dos microrganismos, bem como de idade das cepas (ainda que repicadas) e meio de crescimento.

. Conclusões

Uma vez que os óleos essenciais estão expostos a diversos fatores bióticos e abióticos que atuam afetando o rendimento e outras propriedades terapêuticas destes, faz-se necessário mais estudos que possam descrever melhor a que fatores está ligado a variação quantitativa e qualitativa dos óleos essenciais de *Eugenia uniflora* L e *Eugenia dysenterica* DC.

A avaliação antioxidante mostrou a necessidade de repetição dos testes em concentrações maiores de amostra para um melhor desenho das atividades antioxidantes. O desenvolvimento de outros ensaios antioxidantes para comparações entre resultados de testes é relevante, conferindo dessa forma melhor confiabilidade a atividade antioxidante das amostras.

Os testes microbiológicos mostram, em comparação com a literatura consultada, que ambos os óleos exigem concentrações mais altas de óleo para a performance dos testes. Dessa forma, são necessários estudos que usem doses maiores de óleos essenciais bem como outros estudos que possam ensaiar a eficiência dessas amostras quanto a relação entre dose e toxicidade. Sugere-se ainda, a realização de testes que façam uso do sinergismo entre os controles e os óleos essenciais uma vez que estes podem não apresentar atividade direta sobre os microrganismos, porém, podem agir como reforçadores de terapias já existentes.

. Referências bibliográficas

ALMEIDA, Durinezio José de; FARIA, Marcos Ventura; SILVA, Paulo Roberto da. Biologia experimental em Pitangueira: uma revisão de cinco décadas de publicações científicas. **Ambiência**, Parana, v. 8, n. 1, p.177-193, abr. 2012.

ALMEIDA, Mara Zélia de. **Plantas medicinais**. 3. ed. Brasil: Edufba, p. 221. 2011.

BARBEDO, Leonardo S; SGARBI, Diana Bg. Candidíase. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, Brasil, v. 22, n. 1, p.22-38, 2010.

BHCB, Herbário -. ***Eugenia dysenterica* DC.** 1998. Disponível em: <<http://inct.splink.org.br/>>. Acesso em: 25 nov. 2015.

BLOIS, Marsden S.. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. **Nature**. EUA, p. 1199-1200. abr. 1958.

BORDIGNON, Sergio. ***Eugenia uniflora* L.** 2006. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open_sp.php?img=11821>. Acesso em: 25 nov. 2015.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopéia Brasileira**. 5. ed. Brasil: Anvisa, 2010. 1 v.

BRASIL. AGÊNCIA SAÚDE. (Org.). **MS elabora Relação de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS.** 2009. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude/noticias-antiores-agencia-saude/3487-ms-elabora-relacao-de-plantas-medicinais-de-interesse-ao-sus>>. Acesso em: 04 out. 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS – PNPIC-SUS**. Brasília, 2006. 92 p. (Série B. Textos Básicos de Saúde).

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. **Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília, 2009. 136 p. (Série C. Projetos, Programas e Relatórios).

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos**. Brasília, 2006. 60 p. – (Série B. Textos Básicos de Saúde).

BRASIL. MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE; INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. Projeto de monitoramento do desmatamento dos biomas brasileiros por satélite: **MONITORAMENTO DO BIOMA Cerrado 2009 - 2010**. 2011. Disponível em: <http://siscom.ibama.gov.br/monitora_biomas/PMDBBS - Cerrado.html>. Acesso em: 25 nov. 2015.

BRASIL. MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. (Ed.). **O Bioma Cerrado**. 2015. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biomas/Cerrado>>. Acesso em: 7 out. 2015.

COLOMBO, Arnaldo Lopes; GUIMARÃES, Thaís. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasil, v. 36, n. 5, p.599-607, jan. 2003.

COSTA, Théo R. *et al.* Antifungal activity of volatile constituents of *Eugenia dysenterica* leaf oil. **Journal Of Ethnopharmacology**, Brasil, v. 72, n. 12, p.111-117, set. 2000.

DUARTE, Alessandra R. *et al.* Genetic and environmental influence on essential oil composition of *Eugenia dysenterica*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, Brasil, v. 21, n. 8, p.1459-1467, 2010.

DUARTE, Alessandra R. *et al.* Genetic and environmental influence on essential oil

composition of *Eugenia dysenterica*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, Brasil, v. 21, n. 8, p.1459-1467, 2010.

FILHO, Genival L. *et al.* Supercritical CO₂ extraction of carotenoids from pitanga fruits (*Eugenia uniflora* L.). **The Journal Of Supercritical Fluids**, Sao Paulo, v. 46, n. 1, p.33-39, ago. 2008. THAMBI, Mity *et al.* Composition and antimicrobial activities of th. **Int J Pharm Biomed Sci**, India, v. 4, n. 1, p.46-49, mar. 2013.

FIUZA, Tatiana S. *et al.* Caracterização farmacognóstica das folhas de *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae). **Revista Eletrônica de Farmácia**, Goiania, v. 2, n. 5, p.21-31, set. 2008.

GARMUS, Tábata T. *et al.* Extraction of phenolic compounds from pitanga (*Eugenia uniflora* L.) leaves by sequential extraction in fixed bed extractor using supercritical CO₂, ethanol and water as solvents. **The Journal Of Supercritical Fluids**, Brasil, v. 86, p.4-14, fev. 2014.

GRESSLER, Eliana; PIZO, Marco A.; MORELLATO, L. Patrícia C.. Polinização e dispersão de sementes em Myrtaceae do Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, Brasil, v. 29, n. 4, p.509-530, 2006.

GUZMAN, Frank *et al.* De novo assembly of *Eugenia uniflora* L. transcriptome and identification of genes from the terpenoid biosynthesis pathway. **Plant Science**. Brasil, p. 238-246. out. 2014.

HERBÁRIO DA ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA LUIZ DE QUEIROZ. *Eugenia uniflora* L. 1990. Disponível em: <<http://inct.splink.org.br/>>. Acesso em: 25 nov. 2015.

HERBÁRIO DO INSTITUTO DE BOTÂNICA. *Eugenia dysenterica* DC. 1956. Disponível em: <<http://inct.splink.org.br/>>. Acesso em: 25 nov. 2015

HERBÁRIO DR. ROBERTO MIGUEL KLEIN. *Eugenia uniflora* L. 2006. Disponível

em: <<http://inct.splink.org.br/>>. Acesso em: 25 nov. 2015.

JIANG, C. *et al.* Mechanisms of azole resistance in 52 clinical isolates of *Candida tropicalis* in China. **Journal Of Antimicrobial Chemotherapy**, Brasil, v. 68, n. 4, p.778-785, 7 dez. 2012.

KINGSBURY, Joanne M.; HEITMAN, Joseph; PINNELL, Sheldon R.. Calcofluor White Combination Antifungal Treatments for *Trichophyton rubrum* and *Candida albicans*. **Plos One**, Eua, v. 7, n. 7, p.1-9, 6 jul. 2012.

KWON, Hyun Ju *et al.* Widdrol induces cell cycle arrest, associated with MCM down-regulation, in human colon adenocarcinoma cells. **Cancer Letters**, Korea, v. 209, n. 1, p.96-103, abr. 2010.

LAGO, João Henrique G. *et al.* Chemical and Biological Evaluation of Essential Oils from Two Species of Myrtaceae — *Eugenia uniflora* L. and *Plinia trunciflora* (O. Berg) Kausel. **Molecules**, Brasil, v. 16, n. 12, p.9827-9837, 25 nov. 2011.

LAGO, João Henrique G. *et al.* Chemical and Biological Evaluation of Essential Oils from Two Species of Myrtaceae — *Eugenia uniflora* L. and *Plinia trunciflora* (O. Berg) Kausel. **Molecules**, Brasil, v. 16, n. 12, p.9827-9837, 25 nov. 2015.

LORENZI, Harri; MATOS, Francisco José de Abreu. **Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas**. 2. ed. São Paulo: Instituto Plantarum, 2008.

MATHÉ, Lotte; VAN DIJCK, Patrick. Recent insights into *Candida albicans* biofilm resistance mechanisms. **Current Genetics**, Belgica, v. 59, n. 4, p.251-264, ago. 2013.

MERCADANTE, Mauricio. *Eugenia dysenterica* (Mart.)DC. 2010. Disponível em: <<http://inct.splink.org.br/>>. Acesso em: 25 nov. 2015.

MIRANDA, Cíntia Alvarenga Santos Fraga de. **Atividade antioxidante de óleos essenciais de diversas plantas**. 2010. 152 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de

Agroquímica, Universidade Federal de Lavras, Brasil, 2010.

MOLZ, Martin. *Eugenia uniflora* L. 2009. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open_sp.php?img=949>. Acesso em: 25 nov. 2015.

NCCLS, CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **M27-A2**: Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts - Second Edition. 15 ed. Usa: Nccls, v. 22. 2002.

NUÑEZ, Yarelis Ortíz et al. The Antifungal Activity of Widdrol and Its Biotransformation by *Colletotrichum gloeosporioides* (penz.) Penz. & Sacc. and *Botrytis cinerea* Pers.: Fr. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, Espanha, v. 54, n. 20, p.7517-7521, set. 2006.

OLIVEIRA, Daniela Almeida; PIETRAFESA, José Paulo; BARBALHO, Maria Gonçalves da Silva. Manutenção da biodiversidade e o *hotspots* Cerrado. **Caminhos de Geografia**, Brasil, v. 9, n. 26, p.101-114, jun. 2008.

OLIVEIRA, Verena B. *et al.* Native foods from Brazilian biodiversity as a source of bioactive compounds. **Food Research International**. Brasil, p. 170-179. mar. 2012.

PEIXOTO, Juliana Vieira *et al.* CANDIDÍASE - UMA REVISÃO DE LITERATURA. **Brazilian Journal Of Surgery And Clinical Research**, Brasil, v. 8, n. 2, p.75-82, ago. 2014.

PEREIRA JÚNIOR, Alfredo C. *et al.* Modelling Fire Frequency in a Cerrado Savanna Protected Area. **Plos One**, Brasil, v. 9, n. 7, p.1-11, jul. 2017.

PERES, Nalu Teixeira de Aguiar *et al.* Dermatófitos: interação patógeno-hospedeiro e resistência a antifúngicos. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Brasil, v. 85, n. 5, p.657-667, 2010.

PRADO, Ligia Carolina da Silva *et al.* The Gastroprotective Effects of *Eugenia dysenterica* (Myrtaceae) Leaf Extract: The Possible Role of Condensed Tannins. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, Brasil, v. 37, n. 5, p.722-730, 2014.

RAMIREZ-GARCIA, Andoni *et al.* *Candida albicans* and cancer: Can this yeast induce cancer development or progression?. **Critical Reviews In Microbiology**, Espanha, p.1-13, jun. 2014.

RIBEIRO, Ediane Maria Gomes *et al.* An Overview on Cagaita (*Eugenia dysenterica* DC) Macro and Micro Components and a Technological Approach. **Food Industry**, Brasil, p.3-22, 16 jan. 2013.

RIBEIRO, Ediane Maria Gomes *et al.* An Overview on Cagaita (*Eugenia dysenterica* DC) Macro and Micro Components and a Technological Approach. **Food Industry**, Brasil, p.3-22, jan. 2013.

RIBEIRO, Sabina Cerruto *et al.* Above-and belowground biomass in a Brazilian Cerrado. **Forest Ecology And Management**, Brasil, v. 262, n. 3, p.491-499, ago. 2011.

RODRIGUES, Daniela *et al.* CANDIDÚRIA: REVISÃO ATUAL. **Revista Brasileira em Promoção da Saúde**, Brasil, v. 24, n. 2, p.142-150, abr. 2011.

RODRIGUES, Klinger Antonio da Franca *et al.* *Eugenia uniflora* L. Essential Oil as a Potential Anti-Leishmania Agent: Effects on *Leishmania amazonensis* and Possible Mechanisms of Action. **Research Article**. Brasil, p. 1-10. jan. 2013.

RODRIGUES, Nádia Cristina Silva. **Análise Retrospectiva da Candidíase Vaginal causada por *Cândida albicans* em pacientes grávidas atendidas no Hospital Agostinho Neto, na Cidade da Praia**. 2014. 107 f. Monografia (Especialização) - Curso de Licenciatura em Análises Clínicas e Saúde Pública, Universidade Jean Piaget de Cabo Verde, Santiago, 2014.

SANTANA, Diorgenes Pinto *et al.* Novas abordagens sobre os fatores de virulência de *Candida albicans*. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, Brasil, v. 12, n. 2, p.229-223, ago. 2013.

SANTOS, Frances R.; BRAZ-FILHO, Raimundo; CASTRO, Rosane N.. Influence of age of the leaves of *E. uniflora* L. on chemical composition of essential oil. **Química Nova**, Brasil, v. 38, n. 6, p.762-768, abr. 2015.

SANTOS, Karla Katiúcia Alves *et al.* Atividade leishmanicida in vitro de *Eugenia uniflora* e *Momordica charantia*. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Brasil, v. 34, n. 1, p.47-50, jan. 2013.

SARDI, J. C. O. *et al.* *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. **Journal Of Medical Microbiology**, Brasil, v. 62, n. 1, p.10-24, nov. 2012.

SARMENTO-BRUM, Rúbia Borges Cruz *et al.* Effect of plant oils in inhibiting the mycelial growth of pathogenic fungi. **Journal Of Biotechnology And Biodiversity**, Brasil, v. 5, n. 1, p.63-70, fev. 2014.

SILVA-ROCHA, Walicyranison Plinio *et al.* Effect of the crude extract of *Eugenia uniflora* in morphogenesis and secretion of hydrolytic enzymes in *Candida albicans* from the oral cavity of kidney transplant recipients. **Bmc Complementary Alternative Medicine**, Brasil, v. 15, n. 6, p.1-15, jan. 2015.

SIQUEIRA, H. F. ; SOUZA, L. F. ; AMARAL, E. V. E. J. ; SOUZA JUNIOR, V. Q. . A família Myrtaceae no Brasil. In: 64o Congresso Nacional de Botânica, 2013, Belo Horizonte. Anais 64o Congresso Nacional de Botânica, 2013.

SISTEMA DE IDENTIFICAÇÃO DENDROLÓGICA ONLINE. *Eugenia uniflora* L. Disponível em: <<http://florestaombrofilamista.com.br/sidol/>>

menu=species&menu=home&page=details&id=32>. Acesso em: 25 nov. 2015.

THEODORO, Phellipe Norato Estrela Terra. **Atividade in vitro de plantas da medicina tradicional do Cerrado em dermatófitos e leveduras**. 2009. 146 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Brasília, Brasil, 2009.

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

VICTORIA, Francine Novack *et al.* Involvement of serotonergic and adrenergic systems on the antidepressant-like effect of *E. uniflora* L. leaves essential oil and further analysis of its antioxidant activity. **Neuroscience Letters**, Brasil, v. 544, p.105-109, jun. 2013.

VIEIRA, Pabline Marinho *et al.* Detection of Genotoxic, Cytotoxic, and Protective Activities of *Eugenia dysenterica* DC. (Myrtaceae) in Mice. **Journal Of Medicinal Food**, Brasil, v. 15, n. 6, p.563-567, jun. 2012.

VILELA, Eliane C. *et al.* Spatial Chemometric Analyses of Essential Oil Variability in *Eugenia dysenterica*. **Journal Of The Brazilian Chemical Society**, Brasil, v. 24, n. 5, p.873-879, maio 2013.

VILELA, Eliane C. *et al.* Spatial structure of *Eugenia dysenterica* based on essential oil chemovariations and implications for conservation and management of the genetic diversity of its populations. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, Brasil, v. 23, n. 10, p.1776-1782, 2012.

YANG, Shulong *et al.* Baicalin prevents *Candida albicans* infections via increasing its apoptosis rate. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, China, v. 451, n. 1, p.36-41, ago. 2014.