

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, BIOATIVA E ANTIFÚNGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DOS PECÍOLOS DE *PROTIUM OVATUM* ENGL. (BURSERACEAE)

Chemical, bioactive and antifungal characterization of the essential oils of *Protium ovatum* Engl. (Burseraceae) petioles

Wendel Cruvinel de Sousa¹, Antônio Carlos Pereira de Menezes Filho², Cássia Cristina Alves³, Marcela Cristofoli⁴, Carlos Frederico de Souza Castro⁵, Josemar Gonçalves de Oliveira Filho⁶, Cristiane de Melo Cazal⁷, Moacir Rossi Fiorin⁸

¹ Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, Campus Rio Verde, Goiás, Brasil. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0405-1089>

² Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, Campus Rio Verde, Goiás, Brasil. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3443-4205>.

*E-mail para correspondência: astronomoamadorgoias@gmail.com

³ Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, Campus Rio Verde, Goiás, Brasil. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2004-3166>

⁴ Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, Campus Rio Verde, Goiás, Brasil. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3361-7747>

⁵ Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, Campus Rio Verde, Goiás, Brasil. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9273-7266>

⁶ Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Campus Araraquara, São Paulo, Brasil. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9755-7128>

⁷ Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, Campus Iporá, Goiás, Brasil. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5935-686X>

⁸ Universidade Federal de São Carlos, Campus São Carlos, São Paulo, Brasil. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8798-2921>

Palavras-chave

Protium ovatum
Candida albicans
Atividade antioxidante
Candida krusei

Protium ovatum é uma espécie vegetal presente nos mais variados tipos de Cerrado do Brasil, sendo esta espécie reconhecida como planta fitoterápica. O objetivo do estudo, foi caracterizar química e biologicamente os óleos essenciais de pecíolos de *Protium ovatum* coletados em três áreas do Cerrado no estado de Goiás, Brasil. Pecíolos foram coletados em três áreas do Cerrado. O óleo essencial foi extraído em Clevenger, sendo o rendimento determinado em porcentagem. As análises físico-químicas foram realizadas quanto à composição química por cromatografia gasosa com espectrometria de massas, densidade relativa, solubilidade, índice de refração e rotação óptica. Para determinar a atividade antioxidante biológica, foi utilizado o DPPH, determinado no IC_{50} , e a atividade antifúngica foi realizada pela diluição do óleo essencial pelo método de difusão em disco. Os óleos essenciais apresentaram rendimento de 0,35; 0,44 e 0,29%, densidade 0,905; 0,907 e 0,912 g mL⁻¹, solubilidade positiva, índice de refração de 1,3881; 1,3853 e 1,3799, rotação óptica de +40,6; +40,9 e +39,8 α_D e IC_{50} de 1,67; 1,57 e 2,19 μ L mL⁻¹, para Cerradão, Cerrado rupestre e Campo sujo, respectivamente. Foram obtidos cerca de 12 compostos majoritários, e excepcional atividade antifúngica sobre as cepas de *Candida*. Os óleos essenciais apresentam-se como uma nova fonte antioxidante e antifúngica contra às cepas de *Candidas*. As características físico-químicas são semelhantes às de outros óleos essenciais da literatura. As características fitofisionômicas devem ser avaliadas futuramente por análise genética entre os grupos de indivíduos nas três áreas de estudo.

Keywords

Protium ovatum
Candida albicans
Antioxidant activity
Candida krusei

Protium ovatum is a specie present in the most varied types from Cerrado in Brazil, and this specie is reconoced as a phytotherapeutic plant. The objective of the study was to characterize chemically and biologically the essential oils of *Protium ovatum* petioles collected in three areas of the Cerrado in the state of Goiás, Brazil. Petioles were collected in three areas of savanna Cerrado. The essential oil was extracted in Clevenger, the yield determined in percentage. Physicochemical analyzes were performed for chemical composition by gas chromatography with mass emitter, relative density, solubility, refractive index and optical rotation. To determine the biological antioxidant activity, the DPPH was used, and determined in IC_{50} , and the antifungal activity performed by diluting the essential oil in the disc diffusion method. Essential oils showed a yield of 0.35; 0.44 and 0.29%, density of 0.905; 0.907 and 0.912 g mL⁻¹, positive solubility, refractive index of 1.3881; 1.3853 and 1.3799, optical rotation of +40.6; +40.9 and +39.8 α_D , and IC_{50} of 1.67; 1.57 and 2.19 μ L mL⁻¹, for Cerradão, Cerrado rupestre and Cerrado sujo, respectively. There were about 12 major compounds and exceptional antifungal activity against *Candida* isolates. Essential oils presented as a new antioxidant and antifungal source against *Candida* isolates. The physicochemical characteristics similar to other essential oils in the literature. The phytophysionomic characteristics should in the future be evaluated through genetic analysis between groups of individuals in the three study areas.

INTRODUÇÃO

O domínio Cerrado apresenta incrível número de espécies vegetais, sendo esse ambiente, rico em fitofisionomias, onde vários desses vegetais são de espécies endêmicas ou compartilhadas com outros biomas brasileiros como: bioma Amazônico, Pantanal, Caatinga, dentre outros.

As formações vegetais vão desde bosques, savanas e zonas antropomorfizadas (TEIXEIRA *et al.*, 2016). É nesse ambiente natural com pluralidades, onde encontramos várias espécies pertencentes a família Burseraceae. Atualmente, esta família é composta por 21 gêneros e inúmeras espécies entorno de 600 classificadas. Só para o gênero *Protium*, são identificadas 135 espécies, sendo este o maior e principal gênero da família. A espécie *Protium ovatum* é endêmica do Brasil, sendo encontrada em várias áreas de Cerrado, bem como, nos biomas Pantanal e Amazônico brasileiro (MORAES; CAMARA; RAMOS, 2013; CABRAL *et al.*, 2018; ESTEVAM *et al.*, 2018).

Protium ovatum Engl. é conhecida popularmente por "almacega ou breu", apresentando porte arbustivo com até 4 metros de alt., florescendo entre os meses de abril a setembro, com frutos entre setembro a novembro. Os galhos, folhas, flores, pecíolos e os frutos apresentam ser aromáticos, isso devido a presença de óleos essenciais (OEs), característicos dessa família. A espécie apresenta reconhecimento na área fitomedicinal devido a presença de resina produzida em vários órgãos da planta. Estudos relatam ações biológicas como antiinflamatória, imunoestimulante, repelente para insetos, antinociceptivo e antineoplásico (CASTELO; MENEZZI, 2010; DIAS; HAMAERSKI; PINTO, 2011; ESTEVAM *et al.*, 2015). No estudo realizado por Estevam e colaboradores (2015), os pesquisadores observaram uma importante ação antiparasitária sobre *Trypanosoma cruzi*, e para a forma tripomastigota de *Leishmania amazonensis* avaliando o OE das folhas de *P. ovatum*.

Os OEs são produzidos naturalmente pelas plantas como parte de diferentes classes de compostos do metabolismo secundário. Estes OEs apresentam estruturas químicas voláteis, lipofílicas complexas, geralmente odoríferas, sendo a maioria líquidos e oleosos ao tato com uma ampla aplicação em indústrias farmacêuticas, cosméticas, de biotecnologia e agrícola (SANTOS *et al.*, 2013; CABRAL *et al.*, 2018; MENEZES FILHO; CASTRO, 2020). Vários estudos demonstraram que os OEs apresentam importantes atividades biológicas contra numerosas formas de microorganismos patogênicos e fitopatogênicos como vírus, bactérias, fungos, leveduras, protozoários, bem como, também apresentam ação larvicida, molusquicida e importantes resultados como agente antioxidante CARNEIRO; ALVES; ALVES, 2017).

O objetivo desse estudo, foi avaliar a composição química, bioativa e antifúngica do óleo essencial dos pecíolos de *Protium ovatum* coletados em três fitofisiognomias do Cerrado no estado de Goiás, Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

COLETA DO MATERIAL VEGETAL

Durante o período entre Junho a Julho de 2017 foram coletados pecíolos de *P. ovatum* em três regiões de Cerrado no estado de Goiás, Brasil, com as seguintes referências geográficas: Cerradão: 17°27'27.1''S 51°10'13.5''W, altura de 896 m; Cerrado rupestre: 16°24'14.9''S 51°06'40.0''W, altura de 707 m; e Campo sujo: 16°59'07.0''S 50°25'50.2''W, altura de 777 m. A espécie foi identificada pela Bióloga Erika Virgínia Estefâne de Jesus Amaral, e uma exsicata foi herborizada e depositada no Herbário do Instituto Federal Goiano, com o seguinte Voucher: HRV 628.

EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL

Para extração do OE, foram pesadas em balança analítica alíquotas de 100 g de pecíolos em triplicata. Em seguida, o material foi processado em processador doméstico com 500 mL de água destilada. O processo de extração foi realizado em equipamento tipo Clevenger durante 3,5 horas. O hidrolato foi lavado 3 vezes com 30 mL de diclorometano (Alphatec, P.A – ACS). Em seguida, as frações foram combinadas e secas com sulfato de sódio anidro (Neon, P.A – ACS). O sobrenadante foi transferido para um béquer envolto em papel de alumínio com pequenos furos até completa evaporação do solvente. Após esse período, o OE foi coletado e a massa determinada em porcentagem (m/v) conforme equação 1.

$$Rend = \left(\frac{OE_{ex}}{M_{fp}} \right) * 100 \quad \text{Eq. [1]}$$

Onde OE_{ex} = óleo essencial extraído; M_{fp} massa fresca de pecíolos.

DETERMINAÇÃO DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

A característica organoléptica para: cor, aroma e tato foram determinadas. A densidade relativa foi realizada em picnômetro (Color Glass) de 1 mL. O picnômetro teve sua massa inicial determinada em balança analítica (Marte, Mod. AW 220). Em seguida, o OE foi adicionado, depois da limpeza, o picnômetro com amostra foi pesado, e a densidade relativa do OE, foi expressa conforme equação 2.

$$Den_{g/mL} = \frac{[(P_{pic} + amostra) - (P_{pic})]}{V} \quad \text{Eq. [2]}$$

Onde P_{pic} = peso do picnômetro (g); V = volume do óleo essencial (mL).

A solubilidade do OE foi determinada através de uma solução hidroetanólica (LS Chemicals, P.A – ACS) 70% (v/v) conforme descrito por Alarcón e colaboradores (2019). Em

um tubo *Eppendorf* (Gene) de 1,5 mL, foi adicionada uma alíquota de 100 µL da solução hidroetanólica 70% contendo 2 µL de OE. O tubo foi homogeneizado em Vortex (Warmnest, Mod. VX 28) a 170 rpm durante 5 minutos. O índice de refração foi determinado em equipamento (Hanna Instruments, Mod. HI96800) com faixa entre 1,3330 a 1,5080, resolução de 0,0001 a 20 °C, conforme descrito por Alarcón e colaboradores (2019). A rotação óptica foi determinada em polarímetro com célula de 10 mL, em temperatura de 20 °C com luz α_D de sódio com faixa de 589,3 nm (Novainstruments, Mod. WXG-4), com medida entre -180° a +180° na escala Vernier. Uma solução a 10% (p/v) do OE em etanol 96% (LS Chemicals, P.A – ACS) foi utilizado para esta análise, conforme descrito por Alarcón e colaboradores (2019).

PERFIL QUÍMICO POR CROMATOGRAFIA GASOSA COM ESPECTRÔMETRO DE MASSAS (CG-EM)

O perfil químico do OE dos pecíolos de *P. ovatum* foram determinados em sistema de cromatografia gasosa com espectrômetro de massas (CG-EM), equipado com autoinjeter (Combi PAL AOC-5000), coluna Restek Rtx-5ms (30 m x 0,250 mm x 0,25 µm) e espectrômetro de massas sequencial (MSTQ8040 Shimadzu) com detector eletrônico por ionização por impacto (II) (70 eV). A temperatura inicial de coluna foi mantida a 60 °C durante 3 minutos, em seguida, houve um aumento de 3 °C min.⁻¹ até 200 °C e posteriormente, foi programado com aumento de temperatura de 15 °C min.⁻¹ até 280 °C, permanecendo nesta temperatura durante mais 1 min.

As temperaturas do injetor e do detector foram de 230 °C e 300 °C, respectivamente. As análises foram realizadas utilizando gás Hélio com pressão de injeção de 57,4 KPa, e velocidade de fluxo de 3 mL min.⁻¹. A identificação dos componentes do OE foi baseada pelo índice de retenção linear (Índice de Kovats - IK) calculado em relação com os tempos de retenção da série homóloga de *n*-alcanos (C-07 a C-40) e padrão de fragmentação observado nos espectros de massas, comparados com a literatura de Adams¹¹ e a espectroteca Nist[®] 11.

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A capacidade antioxidante foi determinada utilizando o método de redução do DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil). O método de sequestro do DPPH foi realizado em microdiluição em microplacas de 96 poços (Global Plast) proposto por Mezza e colaboradores (2018). Para cada poço, foi acrescido com 100 µL de uma solução de diclorometano com DPPH na concentração de 0,06 mMol mL⁻¹ e 100 µL de uma solução de diclorometano e OE em diferentes concentrações. A microplaca foi mantida em lugar protegido da luz e calor durante 1 hora. Em seguida, foi realizado a leitura em espectrofotômetro de microplacas (Hexis Científica, SpectraMax Plus, Mod. 384), em 517 nm. A porcentagem da capacidade antioxidante foi determinada conforme equação 3. A Cl₅₀ foi determinada em (µL mL⁻¹) capaz de reduzir 50%

da concentração inicial da solução padrão de DPPH 0,06 mMol mL⁻¹.

$$\%Red = \left(\frac{Abscon - Absol}{Abscon} \right) * 100 \quad \text{Eq. [3]}$$

Onde AC, absorção da solução controle e AS absorção da solução de OE que contém o radical DPPH.

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA PELO MÉTODO DE DIFUSÃO EM DISCOS

Para avaliação da atividade antifúngica de fungos do gênero *Candida*, o método adotado foi o de difusão em disco descrito por Rivera e colaboradores (2017), adaptado. Foram utilizadas cepas de *Candida* (ATCC) adquiridas comercialmente de *Candida albicans*, *C. guilliermondii*, *C. krusei* e *C. tropicalis*. O ensaio foi realizado em diferentes concentrações, sendo 100 µL mL⁻¹ (OE puro), e diluições respectivas em dimetilsulfóxido (DMSO) (Vetec, P.A – ACS, pureza de 98,9%) nas concentrações 50; 25; 12,5 e 6,25 µL mL⁻¹. Como controle negativo, foi usado DMSO e água, e como controle positivo, Cetoconazol (Medley, comprimido de 200 mg), em uma solução aquosa estéril com a concentração de 50 µg mL⁻¹.

As cepas foram resuspendidas em 20 mL de meio estéril Caldo Sabouraud Dextrose (Kasvi – CSD) estéril. A suspensão foi incubada sob agitação em mesa de incubação (Solab, Mod. Shaker SL-222) durante 24 horas a 36 °C. Partindo desse cultivo, foi preparado inóculos contendo aproximadamente 10⁶ a 10⁸ UFC mL⁻¹ padronizado conforme a turbidez em cubeta de vidro na escala 0,5 de McFarland, em espectrofotômetro UV-Vis/NIR (PerkinElmer – Mod. Lambda 850) em 530 nm. O ensaio antifúngico foi realizado em meio sólido (ASD) usando discos de papel de filtro estéril com diâmetro de 7 mm. O meio estéril ASD, foi vertido em placas de *Petri* com diâmetro de 10 cm, e após a solidificação, foi acrescido 1 mL da suspensão fúngica, homogeneizada com uma alça de *Drigalski*. Em seguida, foram depositados 5 discos contendo 50 µL mL⁻¹ de cada solução em diferentes concentrações (100, 50, 25; 12,5 e 6,25 µL mL⁻¹) do OE.

As placas foram incubadas em incubadora bacteriológica (SolidSteel, Mod. SSB40L) durante 24-46 horas a 35 °C. Após este período, foi considerado halos de inibição com 8 mm de diâmetro utilizando um paquímetro digital (Digimess, Mod.100.174BL) de 150 mm e resolução de 0,01mm/.0005”, e erro de aferição igual a (0,01 mm).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os ensaios foram realizados em triplicata seguido de ± erro padrão. Os testes de *Tukey* (p ≤ 0,05) e *Scott-Knott* a 5% de diferença, foram utilizados para determinação da diferença entre as parcelas.

RESULTADOS

Os OEs coletados nas três fitofisionomias apresentaram ser líquidos, incolores, transparentes, homogêneos, cristalinos, ligeiramente aromáticos e oleoso ao tato. Na

tabela 1, estão apresentados os resultados dos parâmetros físico-químicos e bioativo dos OEs dos pecíolos de *P. ovatum*.

Tabela 1. Parâmetros físico-químicos e bioativo dos óleos essenciais dos pecíolos de *P. ovatum*, coletados em três fitofisionomias de Cerrado no estado de Goiás, Brasil.

Parâmetros	Cerradão	Cerrado rupestre	Campo sujo
Rendimento %	0,35 ± 0,11	0,44 ± 0,01	0,29 ± 0,01
Densidade relativa g mL ⁻¹ 20 °C	0,905 ^b	0,907 ^b	0,912 ^a
Solubilidade 70% (v/v)	Positivo	Positivo	Positivo
Índice de refração	1,3881 ^a	1,3853 ^a	1,3799 ^b
Rotação óptica α _D	+40,6 ^a	+40,9 ^a	+39,8 ^a
DPPH CI ₅₀ μL mL ⁻¹	1,67 ± 0,33 ^b	1,57 ± 0,15 ^a	2,19 ± 0,64 ^c

Mesma letra na mesma linha, não diferem entre si, pelo teste de Tukey (p ≤ 0,05).

Na Tabela 2, estão apresentados os resultados do perfil químico dos OEs coletados nas três fitofisionomias de Cerrado no estado de Goiás, Brasil.

Tabela 2. Perfil químico dos óleos essenciais dos pecíolos de *Protium ovatum* colectados em diferentes fitofisionomias, tipo Cerradão, Cerrado rupestre e Campo sujo no estado de Goiás, Brasil.

Compostos	TR (min)	IRexp	IRlit	Porcentagem Relativa (%)		
				Ce	Cr	Cs
Triciclano	5.522	927	921	0,56	-	-
α-Pineno	5.721	934	932	4,45	0,75	4,63
β-Pineno	6.906	979	974	4,93	0,77	2,66
Mirceno	7.243	992	988	2,89	-	8,19
δ-3-Careno	7.901	1003	1011	11,35	-	10,26
O-Cimeno	8.354	1025	1026	0,35	-	-
Ciclo Hexeno	8.499	1029	1024	-	0,51	-
D-limoneno	8.503	1029	1025	13,65	-	16,61
O-Cimeno <(Z)-β->	8.766	1037	1032	-	1,20	-
Terpinoleno	10.244	1079	1086	-	-	1,18
α-Cubebeno	21.497	1352	1345	-	0,76	-
α-Copaeno	22.605	1379	1374	2,45	13,91	3,34
Sabireno	23.204	1396	1400	-	1,44	-
Cariofileno E	23.864	1409	1417	-	-	11,69
α-Gurjuneno	24.019	1413	1409	-	0,93	-
Cariofileno <4,8-β-Epoxi->	24.420	1423	1423	16,40	6,33	-
α-Humuleno	25.801	1457	1452	0,80	0,98	1,94
α-Acoradieno	26.092	1464	1464	-	-	1,03
Cariofileno <9-Epi-(E)->	26.362	1468	1468	-	-	10,42
Germacreno D	26.918	1484	1484	11,42	0,48	16,87
Germacreno A	27.553	1500	1508	-	25,78	-
1,5-Ciclododecadieno	27.555	1500	1508	11,72	-	-

α -Muuroloeno	27.693	1504	1500	-	3,57	-
β -Bisaboleno	27.997	1512	1505	-	0,99	-
δ -Cadineno	28.272	1519	1522	3,51	10,07	-
γ -Cadineno	28.601	1513	1513	-	8,49	5,13
γ -(E)-Bisaboleno	28.911	1535	1529	-	14,73	-
Sesquisabineno hidratado <Cis-> (IPP vs. OH)	29.347	1547	1542	-	-	2,82
Aromadendreno <Allo->	29.916		1558	-	-	-
Spatulenol	30.705	1582	1578	5,48	3,23	1,82
Óxido de Cariofileno	30.931	1587	1582	2,49	0,73	1,53
Viridiflorol	31.104	1592	1592	0,54	-	-
Globulol	31.245	1596	1590	0,66	-	-
Cadinol <Epi- α ->	32.520	1630	1638	-	-	0,71
Cubenol <1-Epi->	32.624	1633	1627	-	0,96	-
α -Muurolol	33.077	1645	1644	1,53	-	-
<Epi- α -> Muurolol	33.130	1647	1640	-	1,47	-
α -Cadinol	33.592	1659	1652	0,75	0,79	-
Monoterpenos					38,18	42,53
Sesquiterpenos					57,75	57,30
Total identificados					95,93	99,83

TR = Tempo de retenção em minutos. I_{exp} = Índice de retenção da coluna. I_{lit} = Índice de retenção de literatura (Adams, 2007). Ce = Cerradão, Cr = Cerrado rupestre e Cs = Campo sujo, Goiás, Brasil.

Os seguintes compostos majoritários foram identificados δ -3-careno, D-limoneno e germacreno D para Cerradão e Campo sujo; α -copaeno, δ -cadineno, γ -cadineno, γ -(E)-bisaboleno e germacreno A para Cerrado rupestre; cariofileno E, e cariofileno <9-Epi-(E)-> para Campo sujo; cariofileno <4,8- β -Epoxi-> e 1,5-clidodecadieno para Cerradão. A porcentagem de monoterpenos foram superiores para os OEs

Cerradão e Cerrado sujo, predominando os compostos sesquiterpenos para os três OEs.

Na Figura 1, estão apresentados os resultados da atividade antifúngica do OE dos pecíolos colectados na região de fitofisionomia Cerradão, para o estado de Goiás, Brasil.

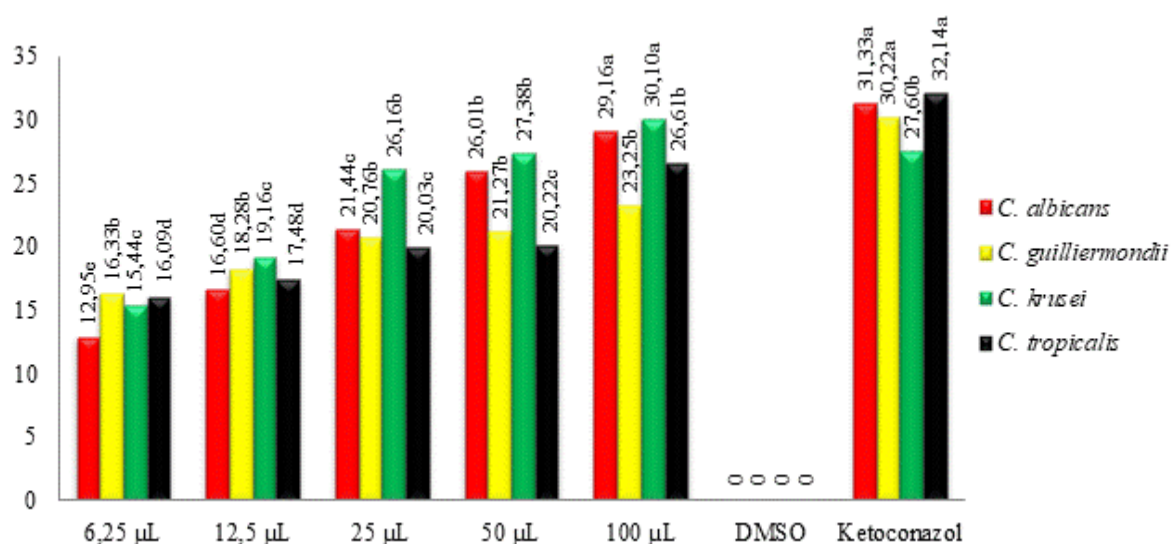


Figura 1. Atividade antifúngica do óleo essencial dos pecíolos colectados na fitofisionomia Cerradão, Goiás, Brasil. As mesmas letras não mostram diferenças significativas para cada cepa pelo teste de Scott Knott com 5% de diferença.

Em todas as concentrações, foram observadas importantes atividades de inibição sobre as espécies de

Candida. O OE na concentração mais alta para *C. albicans* e *C. krusei* não diferiram pelo teste estatístico, quando

comparado ao antifúngico comercial Cetoconazol 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Na concentração 100 μL do OE, demonstrou maior eficiência que o Cetoconazol segundo o teste de *Scott Knott* com nível de significância de 5% (Figura 1). As quatro espécies de *Candida* demonstraram ser sensíveis ao OE fitofisionomia Cerradão, mesmo nas concentrações mais baixas 6,25 e 12,5

$\mu\text{L mL}^{-1}$. Observando ainda os resultados, a cepa de *C. tropicalis* apresentou ser mais resistente que as demais.

Na Figura 2, estão apresentados os resultados da atividade antifúngica do OE dos pecíolos colectados em área de Cerrado rupestre, Goiás, Brasil.

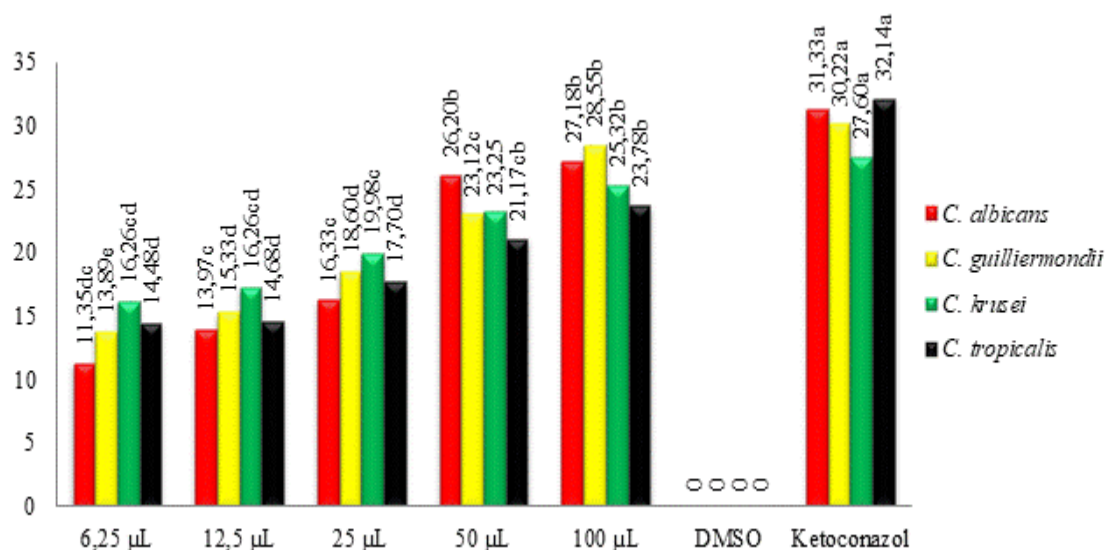


Figura 2. Atividade antifúngica do óleo essencial dos pecíolos colectados na fitofisionomia Cerrado rupestre, Goiás, Brasil. Mesmas letras para mesma cepa fúngica, não diferem entre si pelo teste de *Scott Knott* a 5% de diferença.

Observa-se na Figura 2, alta eficiência na atividade de inibição para todos as cepas de *Candida*, especialmente nas concentrações 50 e 100 $\mu\text{L mL}^{-1}$. O mesmo foi observado nas quatro cepas de *Candida* pelo OE dos pecíolos coletados em Cerradão, incluindo as concentrações mais baixas 6,25 e 12,5 $\mu\text{L mL}^{-1}$. Neste ensaio é possível demonstrar que as espécies de *Candida* utilizadas, são sensíveis as doses de OE, principalmente para *C. albicans*, *C. guilliermondii* e *C. krusei*.

A espécie *C. tropicalis* demonstrou ser mais resistente como na (Figura 1).

Na Figura 3, estão apresentados os resultados da atividade antifúngica do OE dos pecíolos colectados em área de Campo sujo, Goiás, Brasil.

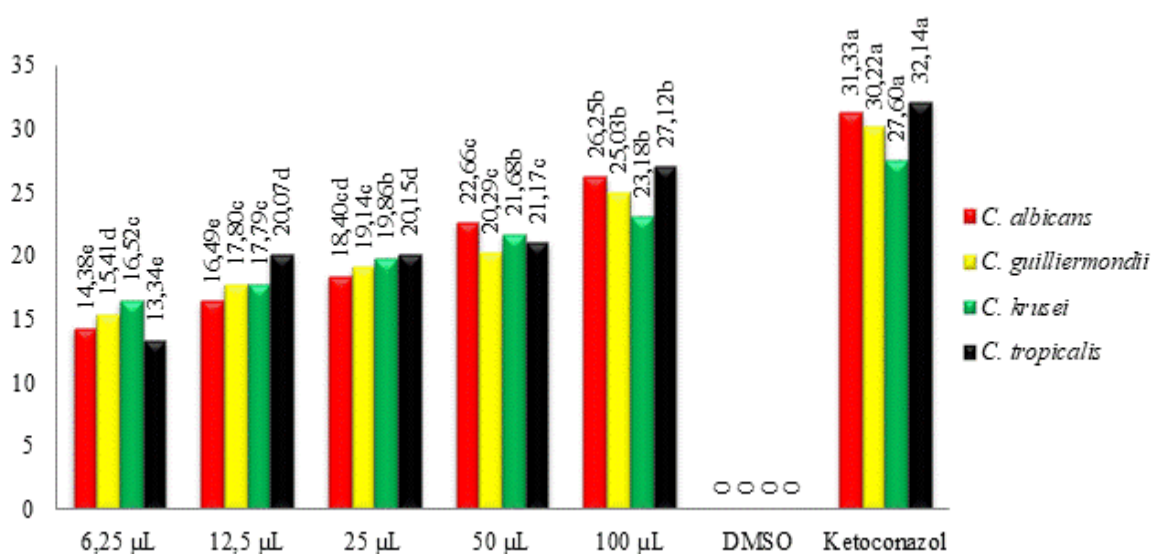


Figura 3. Atividade antifúngica do óleo essencial dos pecíolos coletados em Campo sujo, Goiás, Brasil. Mesmas letras para mesma cepa fúngica, não apresenta diferença significativa pelo teste de *Scott Knott* a 5% de diferença.

Na Figura 3, é possível observar também, importantes atividades de inibição de crescimento sobre as cepas de *Candida*. Principalmente nas concentrações mais altas 50 e 100 $\mu\text{L mL}^{-1}$. No entanto, são mais baixas que a concentração do antifúngico comercial. Como observado nos OEs anteriores, os resultados foram próximos aos observados, comparados aos obtidos pelo OE extraído dos pecíolos da área de Campo sujo, Goiás, Brasil. Novamente, para a cepa de *C. tropicalis* foi observada resistência sobre as concentrações de OE.

DISCUSSÃO

Os pecíolos de *P. ovatum* apresentaram um bom rendimento de extração de OE, e 12 compostos majoritários. Este é o primeiro relato para esta espécie, e para o gênero *Protium* em que se avaliam os pecíolos.

Pode-se sugerir que os diferentes ambientes de área de Cerrado e os tipos de solos podem ser os fatores extrínsecos capazes de causar a diferença química observada, bem como, quimiotipos vegetais na espécie. Outro ponto importante, seria a genética dos grupos de indivíduos dentro de cada área (fitofisionomia) coletadas, sendo necessário, uma investigação com bases moleculares, para complementação dos obtidos em relação a este estudo. Em comparação com outros órgãos vegetais da mesma espécie, Estevam e colaboradores (2018), encontraram rendimento de 0,5% de OE para os frutos de *P. ovatum*, e β -mirceno como composto majoritário. Estes mesmos pesquisadores encontraram rendimento de 0,30% para OE extraído das folhas de *P. ovatum* (ESTEVAM *et al.*, 2015).

Como não há estudos que avaliem as características físico-químicas dos OEs de *Protium*, este trabalho, comparou com outros estudos, de diversos vegetais para atividade antioxidante. Os resultados obtidos são similares aos estudos realizados por Santos *et al.* (2012); Torrenegra-Alarcón *et al.* (2016); Alarcón, Conde e Méndez, (2019), avaliando OEs. A redução do radical livre DPPH mostrou ser um excelente agente antioxidante com resultados para os Oes de Campo rupestre e Cerradão, e moderado para Campo sujo. Alarcón e colaboradores (2019), encontraram boa atividade antioxidante com Cl_{50} de 505,0 e 480,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para o OE de *Eucalyptus globulus*, e Mezza e colaboradores (2018), para as frações do OE de *Rosmarinus officinalis* com Cl_{50} entre 4,39 a 1,82 $\mu\text{L mL}^{-1}$.

A atividade de inibição de crescimento para as cepas de *Candida* foram satisfatórias para os OEs coletados nas três fitofisionomias. Onde as cepas de *C. albicans*, *C. guilliermondii* e *C. krusei* foram mais sensíveis aos OEs em todas as concentrações. Embora para *C. tropicalis* tenha demonstrado ser mais resistente as concentrações, os OEs apresentam boa atividade antifúngica. Segundo as Figuras 1, 2 e 3, não é possível sugerir que as amostras de OEs coletados em diferentes regiões dentro do estado de Goiás, Brasil, apresentem diferenças significativas para a atividade antifúngica, como se observa para a composição química, sendo necessários estudos fitomoleculares.

Oliveira e colaboradores (2016) observaram uma importante atividade antifúngica de 75,5; 70,1; 72 e 80,8% para isolados de *C. albicans* (ATCC 10231 e 64124), *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* usando OE das folhas de *Ocimum gratissimum*. Oliveira e colaboradores (2015) avaliaram o OE de *Baccharis dracunculifolia* onde obtiveram halo de antibiose maior que 10 mm na concentração de 10 $\mu\text{L mL}^{-1}$, onde *C. albicans* demonstrou ser sensível. Já nas concentrações mais baixas, o isolado demonstrou ser resistente. Pimenta e colaboradores (2019) avaliaram quatro isolados de *C. glabrata* onde apenas um, apresentou inibição de crescimento com o OE de *Pogostemon cablin*.

No estudo de Oliveira Lima e colaboradores (2006) os pesquisadores observaram a susceptibilidade de isolados de *C. krusei* e *C. tropicalis* avaliando o OE de *Peumus boldus*. No entanto, neste estudo, os pesquisadores encontraram apenas sensibilidade sobre o crescimento de *C. krusei* a partir do OE de *Rosmarinus officinalis*. He e colaboradores (2017) encontraram bons resultados de inibição para três cepas de *C. albicans* com halos de antibiose de 29,5; 21,8 e de 19,4 mm. Para as cepas de *C. glabrata*, os pesquisadores observaram inibição de crescimento de 29,6 e 31,0 mm, para duas cepas de *C. krusei* inibição de 32,9 e 14,2 mm, em *C. parapsilosis* com inibição de 33,2 mm, e para duas cepas de *C. tropicalis* com 27,2 y 21,8 mm de inibição, avaliando o OE da semente de *Carica papaya*. Ainda, Tahvilian e colaboradores (2016), encontraram excelente atividade inibitória do OE em diferentes partes aéreas de *Pistacia khinjuk* para o isolado de *C. albicans* com inibição de 64 mm, com uma concentração de 1 g mL^{-1} .

CONCLUSÃO

Conclui-se que os óleos essenciais dos pecíolos de *Protium ovatum* são promissores agentes com finalidades na atividade antioxidante e como antifúngicos sobre cepas de *Candidas*. A composição química variou significativamente para as três fitofisionomias, possivelmente estando vinculadas aos tipos de solos e as regiões de Cerrado onde foram coletados os pecíolos. Trabalho futuros deverão ser realizados avaliando a genética dos grupos de indivíduos de *Protium ovatum* onde foram coletadas as amostras, para que se possa obter mais dados sobre a espécie e os diferentes sítios de coletas, na verificação e discussão dos fatores extrínsecos e intrínsecos.

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto Federal Goiano, Campus Rio Verde; a Universidade do Estado de Goiás, Campus Santa Helena; a Universidade Federal de Jataí, Campus Jatobá; a Universidade Federal de São Carlos, Campus São Carlos; aos laboratórios de Produtos Naturais, Química Geral, Química Tecnológica, Bioensaios e Biomoléculas, Sistemática Vegetal e Fisiologia Vegetal.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. 4th Edition. Allured Publishing Corporation, Illinois, pp. 804.
- ALARCÓN, M. E. T.; CONDE, C. G.; MÉNDEZ, G. L. Extracción, caracterización y actividad antioxidante del aceite esencial de *Eucalyptus globulus* Labill. **Revista Cubana de Farmacia**, v. 52, n. 1, p. e266, 2019.
- CABRAL, R. S. C.; ALVES, C. C. F.; BATISTA, H. R. F.; SOUSA, W. C.; ABRAHÃO, I. S.; CROTTI, A. E. M.; SANTIAGO, M. B.; MARTINS, C. H. G.; MIRANDA, M. L. D. Chemical composition of essential oils from different parts of *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand and their *in vitro* antibacterial activity. **Natural Product Research**, 2018.
- CARNEIRO, N. S.; ALVES, J. M.; ALVES, C. C. F.; ESPERANDIM, V. R.; MIRANDA, M. L. D. Óleo essencial das flores de *Eugenia klotzschiana* (Myrtaceae): composição química e atividades tripanocida e citotóxica *in vitro*. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 3, p. 1381-1392, 2017.
- CASTELO, A. V. M.; MENEZZI, C. H. S. D.; RESCK, I. S. Rendimento e análises espectroscópicas (RMN ¹H, ¹³C, IV) da composição química dos óleos essenciais de quatro plantas do Cerrado. **Cerne**, v. 16, p. 573-584, 2010.
- DIAS, M. O.; HAMERSKI, L.; PINTO, A. C. Separação semipreparativa de α e β -amirina por cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, v. 34, p. 704-706, 2011.
- ESTEVAM, E. B. B.; ALVES, C. C. F.; ESPERANDIM, V. R.; CAZAL, C. M.; SOUZA, A. F.; MIRANDA, M. L. D. Chemical composition, anti-*Trypanosoma cruzi* and cytotoxic activities of the essential oil from green fruits of *Protium ovatum* (Burseraceae). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 40, n. 1, p. e-794, 2018.
- 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. *In vitro* antiparasitic and chemical composition of the essential oil from *Protium ovatum* leaves (Burseraceae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 89, n. 4, p. 3005-3015, 2017.
- HE, X.; MA, Y.; YI, G.; WU, J.; ZHOU, L.; GUO, H. Chemical composition and antifungal activity of *Carica papaya* Linn. seed essential oil against *Candida* spp. **Letters in Applied Microbiology**, v. 64, n. 5, p. 350-354, 2017.
- MENEZES FILHO, A. C. P.; CASTRO, C. F. S. Avaliação físico-química e atividade antifúngica do óleo essencial de *Myrcarpus fastigiatus* e óleo-resina de *Copaifera multijuga*. **Arquivos Científicos**, v. 3, n. 1, p. 117-123, 2020.
- MEZZA, G. N.; BORGARELLO, A. V.; GROSSO, N. R.; FERNANDEZ, H.; PRAMPARO, M. C.; GAYOL, M. F. Antioxidant activity of rosemary essential oil fractions obtained by molecular distillation and their effect on oxidative stability of sunflower oil. **Food Chemistry**, v. 242, p. 9-15, 2018.
- MORAES, M. M.; CAMARA, C. A. G.; RAMOS, C. S. Seasonal variation in the essential oil of *Protium bahianum* Daly (Burseraceae). **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 16, p. 300-307, 2013.
- OLIVEIRA, L. B. S.; BATISTA, A. H. M.; FERNANDES, F. C.; SALES, G. W. P.; NOGUEIRA, N. A. P. Atividade antifúngica e possível mecanismo de ação do óleo essencial de folhas de *Ocimum gratissimum* (Linn.) sobre espécies de *Candida*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, n. 2, p. 511-523, 2016.
- OLIVEIRA, C. F.; BOBEK, V. B.; PIETRUCHINSKI, E.; CARDOZO, A. G. L. Avaliação da atividade antifúngica do óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia* DC. frente à levedura da espécie *Candida albicans*. **Visão Acadêmica**, v. 16, n. 4, p. 4-11, 2015.
- OLIVEIRA LIMA, I.; OLIVEIRA, R.; OLIVEIRA LIMA, E.; FARIAS, N. M. P.; SOUZA, E. L. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 16, n. 2, p. 197-201, 2006.
- PIMENTA, E. S.; DA CRUZ, R. M. C.; DINIZ NETO, H.; SILVA, D. F.; DE OLIVEIRA, H. M. B. F.; BUCCINI, D. F.; LIMA, E. O.; DE OLIVEIRA FILHO, A. A. Avaliação da atividade antifúngica do óleo essencial de *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth. (Lamiaceae) contra cepas de *Candida glabrata*. **Scientia Plena**, v. 15, n. 6, p. 1-5, 2019.
- RIVERA, P. N.; PAREDES, E. A.; GÓMEZ, E. D.; LUECKHOFF, A.; ALMEIDA, G. A.; SUAREZ, S. E. Composición química y actividad antimicrobiana del aceite esencial de los rizomas de *Renalmia thyrsoides* (Ruiz & Pav) Poepp. & Eddl. (shiwanku muyu). **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 22, n. 2, 2017.
- SANTOS, M. R. A.; LIMA, R. A.; SILVA, A. G.; LIMA, D. K. S.; SALLET, L. A. P.; TEIXEIRA, C. A. D.; FACUNDO, V. A. Composição química e atividade inseticida do óleo essencial de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) sobre a broca-do-café (*Hypothenemus hampei*) Ferrari. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 4, p. 757-762, 2013.
- SANTOS, T. G.; REBELO, R. A.; DALMARCO, E. M.; GUEDES, A.; DE GASPER, A. L.; CRUZ, A. B.; SCHMIT, A. P.; CRUZ, R. C. B.; STEINDEL, M.; NUNES, R. K. Composição química e avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial das folhas de *Piper malacophyllum* (C. Presl.) C. DC. **Revista Química Nova**, v. 35, n. 3, p. 477-481, 2012.
- TAHVILIAN, R.; MORADI, R.; ZHALE, H.; ZANGENEH, M. M.; ZANGENEH, A.; YAZDANI, H.; HAJIALIANI, M. Ethnomedicinal Plants: Study on antifungal activity of essential oil of *Pistacia khinjuk* (combined with the dominance γ -terpinene) against *Candida albicans*. **International Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 8, n. 10, p. 1369-1373, 2016.

TEIXEIRA, P. R.; FERREIRA, R. Q. S.; CAMARGO, M. O.; SILVA, R. R.; SOUZA, P. B. Produção de serapilheira de duas fisionomias do domínio Cerrado, Gurupi, Tocantins. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 11, n. 5, p. 45-50, 2016.

TORRENEGRA-ALARCÓN, M.; GRANADOS-CONDE, C.; DURÁN-LENGUA, M.; LEÓN-MÉNDEZ, G.; YÁÑEZ-RUEDA, X.; MARTÍNEZ, C.; PÁJARO-CASTRO, N. Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de *Minthostachys mollis*. **Orinoquia**, v. 20, n. 1, p. 69-74, 2016.