



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAIBA

CENTRO DE CIÊNCIA DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DESENVOLVIMENTO E INOVAÇÃO  
TECNOLÓGICA EM MEDICAMENTOS



SARAGHINA MARIA DONATO DA CUNHA

**BIOPROSPECÇÃO DA ATIVIDADE ANTIGÚNGICA E DA CITOXICIDADE DO  
ÓLEO ESSENCIAL DE PATCHOULI( *POGOSTEMON CABLIN BENTH*)**

JOÃO PESSOA-PB  
2022

SARAGHINA MARIA DONATO DA CUNHA

**BIOPROSPECÇÃO DA ATIVIDADE ANTIGÚNGICA E DA CITOXICIDADE DO  
ÓLEO ESSENCIAL DE PATCHOULI( *POGOSTEMON CABLIN BENTH*)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para a obtenção do título de DOUTORA EM DESENVOLVIMENTO E INOVAÇÃO TECNOLÓGICA EM MEDICAMENTOS (DITM).

ORIENTADOR: Prof. Dr. Abrahão Alves  
de Oliveira Filho

JOÃO PESSOA-PB  
2022

**Catálogo na publicação**  
**Seção de Catálogo e Classificação**

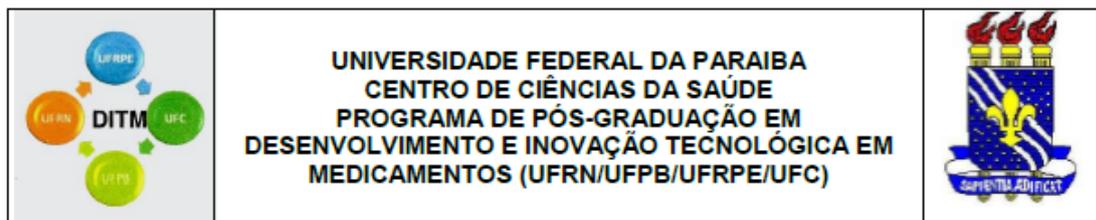
C972b Cunha, Saraghina Maria Donato da.  
Bioprospecção da atividade antigúngica e da  
citotoxicidade do óleo essencial de Patchouli (pogostemon  
cablin benth) / Saraghina Maria Donato da Cunha. - João  
Pessoa, 2022.  
74 f. : il.

Orientação: Abrahão Alves de Oliveira Filho.  
Tese (Doutorado) - UFPB/CCS.

1. Farmacologia. 2. Toxicologia. 3. Produto natural.  
I. Oliveira Filho, Abrahão Alves de. II. Título.

UFPB/BC

CDU 615(043)



Ata da vigésima oitava defesa de tese de doutorado no Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos SARAGHINA MARIA DONATO DA CUNHA, candidata ao Título de “Doutor” em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos/UFPB.

1 Às quatorze horas (14:00) do dia vinte e oito de outubro do ano de dois mil e vinte dois  
2 (28/10/2022), na sala virtual, reuniram-se em caráter de Solenidade pública os membros  
3 da Comissão designada para examinar a **SARAGHINA MARIA DONATO DA CUNHA**,  
4 candidata ao Título de “Doutor” em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em  
5 Medicamentos. Foram componentes da Banca Examinadora os Professores Doutores:  
6 Abrahão Alves de Oliveira Filho (orientador), Hilzeth de Luna Freire Pessoa (examinadora  
7 interna), Gymenna Maria Tenório Guênes (examinador externa-UFCG), Raline Mendonça  
8 dos Anjos (examinadora externa-UFCG) e Elizandra Silva da Penha (examinadora  
9 externa-UFCG). Dando início aos trabalhos o presidente da banca, Prof. Dr. Abrahão  
10 Alves de Oliveira Filho, após declarar os objetivos da reunião, apresentou a candidata,  
11 **SARAGHINA MARIA DONATO DA CUNHA**, a quem concedeu a palavra para que  
12 dissertasse oral e sucintamente sobre o tema apresentado e intitulado  
13 **“BIOPROSPECÇÃO DA ATIVIDADE ANTIGÚNGICA E CITOXICIDADE DO ÓLEO**  
14 **ESSENCIAL DE PATCHOULI (POGOSTEMON CABLIN BENTH)”**. Após discorrer sobre  
15 o referido tema durante cerca de cinquenta minutos, a candidata foi arguida pelos  
16 examinadores na forma Regimental. Em seguida passou a comissão, em caráter secreto,  
17 a proceder à avaliação e julgamento do trabalho, concluindo por atribuir-lhe o conceito  
18 APROVADO. Em face da aprovação declarou a presidente achar-se a examinada,  
19 **SARAGHINA MARIA DONATO DA CUNHA**, legalmente habilitado a receber o Título de  
20 “Doutor” em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos, área Farmácia,  
21 cabendo a Universidade Federal da Paraíba, providências, como de direito, a expedição  
22 do Diploma que a mesma faz jus. Os trabalhos foram encerrados determinando a leitura  
23 para fins de aprovação e a lavratura da presente ata devidamente assinada por todos os  
24 membros da Banca Examinadora.

João Pessoa, em 28 de outubro de 2022.

Prof. Dr. Abrahão Alves de Oliveira Filho (Presidente)

*Abrahão Alves de Oliveira*

Prof.ª Dr.ª Hilzeth de Luna Freire Pessoa (Examinadora Interna)

*Hilzeth de Luna Freire Pessoa*

Prof.ª Dr.ª Gymenna Maria Tenório Guênes (Examinadora Externa)

*Gymenna Maria Tenório Guênes*

Prof.ª Dr.ª Raline Mendonça dos Anjos (Examinadora Externa)

*Raline Mendonça dos Anjos*

Prof.ª Dr.ª Elizandra Silva da Penha (Examinadora Externa)

*Elizandra S. da Penha*

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, por ser essencial em minha vida, autor de meu destino, meu guia, socorro presente na hora da angústia.

À minha mãe Sonia Maria Donato Cunha, pelo apoio, incentivo e carinho demonstrados sempre que há algo importante acontecendo comigo, não me deixando fraquejar e por ter me proporcionado oportunidades para chegar até aqui. Amo você!

Aos meus filhos, que deu sentido especial a minha existência e tem me proporcionado grandes alegrias.

Aos meus irmãos, em especial a minha irmã Sydia Maria Donato da Cunha, bem como meu primo Francisco Cunha Nunes por sempre está torcendo e rezando por mim.

# *Agradecimentos*

A Deus, pela sua infinita bondade e fidelidade para comigo, onde jamais deixou-me faltar algo.

Ao meu orientador **Prof. Dr. Abrahão Alves de Oliveira Filho**, amigo e compadre, pelo carinho, amizade, ensinamento, compreensão, paciência. E acima de tudo, não ter deixado desistir desse sonho e ter me conduzido até aqui. Você e sua família sempre estará presente em minha vida. Serei eternamente grata.

À **Maria das Mercês Targino da Cruz**, que foi essencial para a execução deste trabalho, sempre solicita a me ajudar, cuidando dos meus filhos e de mim. Muito obrigada.

Aos professores **Maria das Graças Veloso Marinho de Almeida, Raline Mendonça dos Anjos, Gymenna Maria Tenório Guênes, Elizandra Silva da Penha, Hilzeth de Luma Freire Pessoa e Bárbara Viviana de Oliveira Santos** por terem aceitado participar da banca de doutorado, contribuindo significativamente para o meu trabalho.

Aos amigos do trabalho e de curso, em especial à **Leila Ribeiro, Cezar Augusto, Isabela Bezerra, Emanuela Batista, Débora Ribeiro e Romário Ataíde** pelas palavras de conforto, amizade, incentivo, companheirismo, e por todos os momentos bons e ruins que compartilhamos neste período.

À **Coordenação** e aos **funcionários do Programa de Pós-graduação** em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos.

À **UFCG** e **UFPB** pelo apoio financeiro e estrutural para o desenvolvimento deste estudo.

“Ter fé, acreditar e confiar em Deus são vertentes que materializam o seu poder de transformar derrotas em méritos.”

DA CUNHA, S.M.D. **Bioprospecção da atividade antifúngica e da citotoxicidade do óleo essencial de Patchouli (*Pogostemon cablin* Benth)**. 2022. 64 p. Tese (Pós-graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos) - UFPB / CCS, João Pessoa - PB.

## RESUMO

A incidência de infecções causadas por *Candida* tem aumentado em todo o mundo e essas cepas estão se tornando resistentes aos seus respectivos medicamentos. Sendo necessário a busca de novos fármacos com maior eficácia e segurança e nesta lógica, destaca-se os óleos essenciais (OEs), que são uma mistura complexa de compostos voláteis e apresentam várias atividades biológicas relevantes, porém há poucos estudos sobre os potenciais efeitos benéficos e/ou adversos. Neste sentido o objetivo desse estudo foi avaliar as atividades antifúngica e citotóxica do óleo essencial de Patchouli (*Pogostemon cablin* Benth). Na avaliação da atividade antifúngica utilizou-se diferentes cepas do gênero *Candida* e foi determinada a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e fungicida mínima (CFM), por técnica de microdiluição. A interferência do OE na parede celular e o potencial de ruptura do mesmo, foi feita através CIM na presença do sorbitol, e a interferência na membrana celular, foi realizada através CIM com ergosterol. Como também, foi avaliado a interferência do OE sobre a resistência ao antifúngico padrão, na ausência e na presença do OE em concentrações sub-inibitórias. Para estudos da atividade citotóxica utilizou-se hemácias humanas referentes aos tipos sanguíneos A, B e O e avaliou-se a atividade hemolítica e anti-hemolítica. As análises revelaram que o OE apresentou uma excelente atividade antifúngica frente as cepas clínicas de *C. parapsilosis* e *C. albicans* com uma CIM e CFM entre 4 e 16 µg/mL, sendo esse efeito de natureza fungicida. Seu mecanismo de ação não envolve efeito sobre a parede celular bem como na membrana plasmática. Promoveu um efeito sinérgico ao ser associado a anfotericina B. O efeito sob as hemácias revelou baixo percentual de hemólise para eritrócitos do sistema ABO na concentração de 50 a 100 µg/mL. Além disso, demonstra moderado efeito anti-hemolítico nas concentrações de 500 a 1000 µg/mL para os tipos sanguíneos B e O. Considerando os resultados obtidos no estudo *in vitro* de citotoxicidade e a atividade farmacológica, percebe-se que OE de Patchouli torna-se um possível candidato promissor para utilização de suas propriedades bioativas em fitoterápicos, porém são necessários estudos auxiliares como toxicidade *in vivo* e farmacológico para melhor elucidar os mecanismos de ação deste composto.

**Palavras chave:** Farmacologia; Produto natural; Toxicologia.

## ABSTRACT

The incidence of infections caused by *Candida* has increased worldwide and these strains are becoming resistant to their respective drugs. The search for new drugs with greater efficacy and safety is necessary and in this logic, essential oils (EOs) stand out, which are a complex mixture of volatile compounds and present several relevant biological activities, but there are few studies on the potential beneficial and/or adverse effects. In this sense, the objective of this study was to evaluate the antifungal and cytotoxic activities of Patchouli (*Pogostemon cablin* Benth) essential oil. In the evaluation of the antifungal activity it was used different strains of *Candida* genus and it was determined the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and the minimum fungicidal concentration (MFC), by microdilution technique. The interference of the EO on the cell wall and its potential for rupture was done by MIC in the presence of sorbitol, and the interference on the cell membrane was done by MIC with ergosterol. Also, the interference of EO on the resistance to standard antifungal drugs was evaluated, in the absence and in the presence of EO at subinhibitory concentrations. For cytotoxic activity studies, human RBCs of blood types A, B and O were used and the hemolytic and antihemolytic activity was evaluated. The analyses revealed that the EO showed excellent antifungal activity against clinical strains of *C. parapsilosis* and *C. albicans* with a MIC and MFC between 4 and 16  $\mu\text{g/mL}$ , this effect being fungicidal in nature. Its mechanism of action involves no effect on the cell wall as well as on the plasma membrane. It promoted a synergistic effect when associated with amphotericin B. The effect on red blood cells showed a low percentage of hemolysis for red blood cells of the ABO system at a concentration of 50 to 100  $\mu\text{g/mL}$ . In addition, it shows moderate anti-hemolytic effect at concentrations of 500 to 1000  $\mu\text{g/mL}$  for blood types B and O. Considering the results obtained in the in vitro cytotoxicity study and the pharmacological activity, it can be seen that Patchouli EO becomes a promising candidate for use of its bioactive properties in herbal medicines, but auxiliary studies are needed as in vivo toxicity and pharmacological to better elucidate the mechanisms of action of this compound.

**Key words:** Pharmacology; Natural product; Toxicology.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Mecanismo de resistência a antifúngicos.....	18
<b>Figura 2</b> - A estrutura química da paeoniflorina e a planta medicinal .....	21
<b>Figura 3</b> - Destilação para obtenção do óleo essencial.....	22
<b>Figura 4</b> - Planta do <i>Pogostemon cablin</i> Benth.....	23
<b>Figura 5</b> - Estrutura química de alguns contituíntes do óleo essencial de Patchouli ( <i>Pogostemon cablin</i> ).....	24
<b>Figura 6</b> - Algumas atividades farmacologia do óleo essencial de Patchouli ( <i>Pogostemon cablin</i> ).....	26
<b>Figura 7</b> - Avaliação hemolítica do Patchouli em eritrócitos do tipo A. (C <sup>-</sup> ) Controle negativo (suspensão a 0,5%), (C <sup>+</sup> ) Controle positivo (1% Triton X-100). P < 0.05, P < 0,01 e P < 0.001 (***) versus controle positivo .....	41
<b>Figura 8</b> - Avaliação hemolítica do Patchouli em eritrócitos do tipo B. (C <sup>-</sup> ) Controle negativo (suspensão a 0,5%), (C <sup>+</sup> ) Controle positivo (1% Triton X-100). P < 0.05, P < 0,01 e P < 0.001 (***) versus controle positivo .....	41
<b>Figura 9</b> - Avaliação hemolítica do <i>Patchouli</i> em eritrócitos do tipo O. (C <sup>-</sup> ) Controle negativo (suspensão a 0,5%), (C <sup>+</sup> ) Controle positivo (1% Triton X-100). P < 0.05, P < 0,01 e P < 0.001 (***) versus controle positivo .....	42
<b>Figura 10</b> - Avaliação anti-hemolítica do Patchouli em eritrócitos do tipo A. (C <sup>-</sup> ) Controle negativo (suspensão a 0,5%), (C <sup>+</sup> ) Controle positivo (1% Triton X-100). P < 0.05, P < 0,01 (**) e P < 0.001 (***) versus controle positivo .....	43
<b>Figura 11</b> - Avaliação anti-hemolítica do <i>Patchouli</i> em eritrócitos do tipo B. (C <sup>-</sup> ) Controle negativo (suspensão a 0,5%), (C <sup>+</sup> ) Controle positivo (1% Triton X-100). P < 0.05, P < 0,01 (**) e P < 0.001 (***) versus controle positivo .....	44
<b>Figura 12</b> - Avaliação anti-hemolítica do <i>Patchouli</i> em eritrócitos do tipo O. (C <sup>-</sup> ) Controle negativo (suspensão a 0,5%), (C <sup>+</sup> ) Controle positivo (1% Triton X-100). P < 0.05, P < 0,01 e P < 0.001 (***) versus controle positivo.....	44

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Resultados da avaliação da CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) e da avaliação da Concentração Fungicida Mínima CFM ( $\mu\text{g/mL}$ ) do óleo essencial de <i>Pogostemon cablin</i> sobre cepas de <i>Candida parapsilosis</i> .....	36
<b>Tabela 2</b> - Resultados da avaliação da CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) e da Concentração Fungicida Mínima CFM ( $\mu\text{g/mL}$ ) do óleo essencial de <i>Pogostemon cablin</i> sobre cepas de <i>Candida albicans</i> .....	37
<b>Tabela 3</b> - Efeito dos OE <i>Pogostemon cablin</i> sobre as cepas <i>C. albicans</i> ATCC 76485 e <i>C. albicans</i> LM- 62 na ausência e presença do ergosterol $400\mu\text{g/mL}$ e sorbitol 0,8M. ....	38
<b>Tabela 4</b> - Modulação da ação do antifúngico na sua CIM pelo <i>Pogostemon cablin</i> na CIM/8 frente cepas de <i>C. albicans</i> .....	39

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASD	Ágar Sabourand Dextrose
CCS	Centro De Ciências Da Saúde
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CG	Cromatografia gasosa
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CIM50	Concentração Inibitória Mínima Para 50%
CSD	Caldo Sabourand Dextrose
DCF	Departamento De Ciências Farmacêuticas
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra- acético
Hb	Hemoglobina
MTC	Medicina Tradicional Chinesa
OE	Óleo Essencial
OEs	Óleos Essenciais
PA	Álcool de Patchouli
RBC	Red Blood Cell
UACB	Unidade de Ciências Biológicas
UFCG	Universidade Federal de Campina Grande
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	13
2. OBJETIVO .....	16
2.1 Objetivo Geral .....	16
2.2 Objetivos Específicos.....	16
3. FUNDAMENTAÇÃO TEORICA .....	18
3.1 Aspectos gerais da candidíase .....	18
3.2 Uso terapeutico de plantas medicinais .....	19
3.3 Potencial terapêutico dos óleos essenciais .....	21
3.4 Óleo essencial de patchouli( <i>Pogostemon cablin</i> Benth).....	23
3.5 Toxicidade dos produtos a base de plantas medicinais.....	26
4. METODOLOGIA .....	29
4.1 Área de estudo e localização de testes experimentais.....	29
4.2 Produto a ser testado.....	29
4.3 Avaliação da atividade antifúngica.....	29
4.3.1 Meios de cultura.....	29
4.3.2 Cepas fúngicas.....	29
4.3.3 Inóculo.....	30
4.3.4 Determinação da concentração inibitória mínima(cim) .....	30
4.3.5 Determinação da concentração fungicida mínima (cfm) .....	31
4.3.6 Ação do produto na parede celular fúngica .....	31
4.3.7 Interação com o ergosterol.....	32
4.3.8 Avaliação da interferência do óleo essencial de patchouli ( <i>Pogostemon cablin</i> Benth) sobre a resistência aos antifúngicos licenciados( ensaio de modulação). .....	32
4.4 Avaliação da atividade citotóxica do óleo essencial de patchouli ( <i>Pogostemon cablin</i> Benth).....	33
4.4.1 Posicionamento ético.....	33
4.4.2 Eritrócito humanos .....	33
4.4.3 Avaliações da atividade hemolítica do óleo essencial de patchouli ( <i>Pogostemon cablin</i> Benth) .....	33
4.4.4 Avaliação da atividade anti-hemolítica do óleo essencial de patchouli ( <i>Pogostemon cablin</i> Benth).....	34
4.5 Análise estatística .....	34
5. RESULTADO E DISCUSSÃO .....	36
6. CONCLUSÃO.....	47
REFERÊNCIA.....	48
ANEXOS.....	62

# *Introdução*

## 1. INTRODUÇÃO

O estudo de produtos naturais na descoberta de medicamentos não é um conceito moderno, na verdade, muitas das terapias médicas mais bem-sucedidas foram originalmente encontradas na natureza (CARY; PETERLIN, 2018). Há relatos de antigos egípcios usando pão mofado para tratar infecções, o que pode ter levado à descoberta da penicilina em 1928 (HARE, 1982). O Prêmio Nobel de Medicina de 2015 foi compartilhado pela descoberta de duas dessas terapêuticas baseadas em produtos naturais, a artemisinina e a ivermectina (SU; MILLER, 2015; CARY; PETERLIN, 2018).

O uso e a busca por medicamentos e suplementos alimentares derivados de plantas têm se acelerado nos últimos anos, pois, os produtos naturais possuem diversas atividades biológicas relevantes para a saúde humana, incluindo atividades antibióticas, antifúngicas, anticancerígenas, imunossupressoras, anti-inflamatórias e inibidoras de biofilme (PHAM et al., 2019).

OEs têm se destacado entre os produtos naturais utilizados em todo o mundo. Assim, grandes quantidades de óleos essenciais são produzidas globalmente para abastecer as indústrias de fragrâncias e sabores, cosméticos, bem como fitoterápicos e aromaterapia (BAŞER; DEMIRCI, 2007; SHARMEEN et al., 2021). O mercado de OEs também tem sido liderado pelo crescimento da demanda por produtos higiênicos orgânicos e naturais, devido à crescente conscientização sobre problemas de saúde entre os consumidores (BARBIERI; BORSOTTO, 2018). Globalmente, a indústria de óleos essenciais (OEs) gera bilhões de dólares de receita anualmente. Portanto, mais atenção tem sido dada recentemente a este setor, como um recurso natural primário para fitoquímicos (BASER; BUCHBAUER, 2015; SHAHIN; ALYAFEI; JALEEL, 2021).

OEs, derivados de plantas aromáticas, são líquidos oleosos voláteis compostos principalmente por terpenoides e ácidos fenólicos (DA SILVA et al., 2021). Eles têm sido usados desde a antiguidade em diferentes culturas devido às suas propriedades bioativas. Algumas das propriedades mais relatadas dos OEs são: antibacteriana (NAZZARO et al., 2013), antifúngica (D'AGOSTINO et al., 2019), antiviral (MA; YAO, 2020) e antioxidante (LEYVA-LÓPEZ et al., 2017), principalmente devido ao rompimento de membranas bacterianas e fúngicas e envelopes virais (BOHME et al., 2014).

Neste contexto um óleo que merecem destaque é o Patchouli (“Guanghuoxiang”) ou cientificamente conhecido como *Pogostemon cablin* Benth, pertencente à família Lamiaceae. Vários compostos bioativos foram identificados no Patchouli, incluindo terpenoides, fitosteróis, flavonoides, ácidos orgânicos, ligninas, glicosídeos, álcoois, pirona e

aldeídos. Entre os numerosos compostos, o álcool de Patchouli,  $\beta$ -patchouleno, epóxido de patchouleno, pogostone e pachypodol são de grande importância. Os impactos farmacológicos desses compostos incluem efeito anti-úlceras pépticas, efeito antimicrobiano, efeito antioxidante, efeito anti-inflamatório, e outros (JUNREN et al., 2021). Patchouli é uma importante erva medicinal com grande potencial de mercado na indústria de fragrâncias; é também o ingrediente principal em vários medicamentos patenteados chineses (LIU et al., 2014).

Portanto, diante da existência de poucos estudos envolvendo o óleo essencial de Patchouli torna-se necessário mais avaliações não clínicas das atividades farmacológicas e toxicológicas desse produto natural.

*Objetivos*

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Avaliar as atividades antifúngica e citotóxica do óleo essencial de Patchouli (*Pogostemon cablin* Benth).

### **2.2 Objetivos Específicos**

- 2.2.1 Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do óleo essencial de Patchouli contra cepas do gênero *Candida*.
- 2.2.2 Identificar a Concentração fungicida Mínima (CFM) do óleo essencial de Patchouli contra cepas do gênero *Candida*.
- 2.2.3 Investigar o mecanismo de ação antifúngico do óleo essencial de Patchouli contra cepas do gênero *Candida*.
- 2.2.4 Avaliar a associação do óleo essencial de Patchouli a antifúngicos sintéticos contra cepas do gênero *Candida*.
- 2.2.5 Identificar a atividade antihemolítica do óleo essencial de Patchouli em células sanguíneas humanas.
- 2.2.6 Avaliar a citotoxicidade do óleo essencial de Patchouli frente as células sanguíneas do tipo A, B e O humanas.

# *Fundamentação Teórica*

### 3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 3.1 Aspectos gerais da candidíase

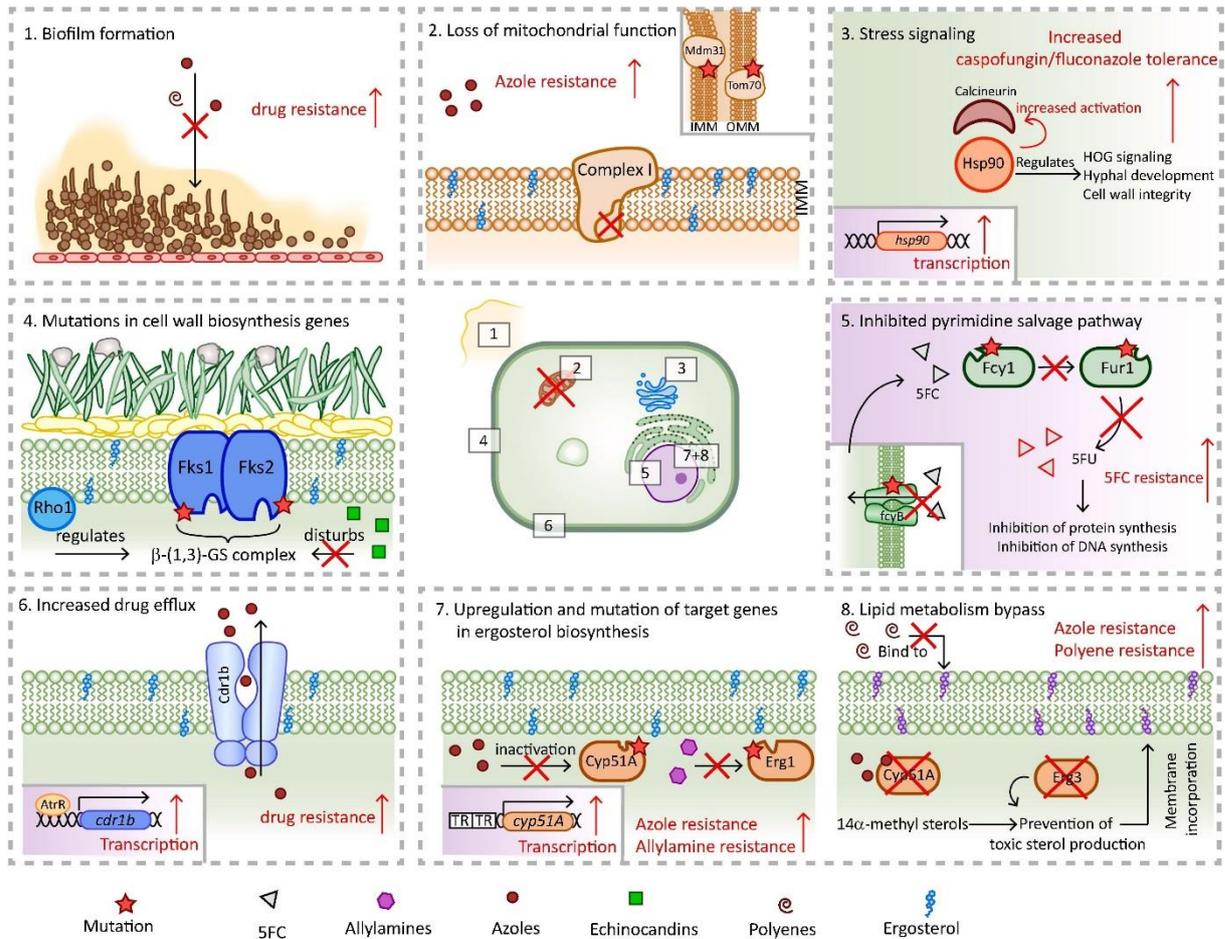
A incidência de infecções causadas por *Candida* tem aumentado em todo o mundo, com taxas de mortalidade superiores a 70% em certas populações de pacientes. *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. krusei* são responsáveis por mais de 90% das infecções por *Candida* (SINGH; TÓTH; GÁCSEK, 2020).

*C. albicans* é o patógeno fúngico de humanos mais clinicamente relevante, devido em grande parte a ser um comensal residente dos nichos oral, dérmico, gastrointestinal e genital (CALDERONE, 2011). O uso em excesso de esteroides ou antibióticos, imunossupressão e distúrbios autoimunes aumentam o risco de infecções mucosas e sistêmicas por *C. albicans* que mais comumente resultam do crescimento excessivo da flora normal do paciente (ZHENG et al., 2020; MISHRA; FORCHE; ANDERSON, 2021).

O impacto dos fungos na saúde humana é amplificado pelo fato de que apenas três classes de medicamentos antifúngicos estão disponíveis para tratar infecções fúngicas sistêmicas. Estes incluem os azóis que têm como alvo a biossíntese do ergosterol, as equinocandinas que inibem a biossíntese da parede celular fúngica e os polienos que se ligam ao ergosterol na membrana celular fúngica levando à lise celular (PERFECT, 2017; ROBBINS et al., 2017). Nosso limitado arsenal de antifúngicos está ainda mais ameaçado pelo desenvolvimento de cepas de fungos multirresistentes e o surgimento de patógenos intrinsecamente resistentes, veja a Fig. 1 (REVIE et al., 2018).

Espectro antifúngico, tolerabilidade e toxicidade são os desafios para lançar novos medicamentos. Embora a anfotericina B tenha se tornado o tratamento padrão para infecções fúngicas graves por mais de 40 anos, os efeitos adversos relacionados à infusão e a nefrotoxicidade limitante da dose levaram à busca contínua de alternativas igualmente eficazes, mas menos tóxicas, que pudessem ser administradas por via intravenosa e oral. Portanto, embora um progresso considerável tenha sido alcançado desde o início da terapia antifúngica sistêmica na década de 1950, o atual arsenal antifúngico está longe de ser perfeito (LEWIS, 2011).

**Figura 1** – Mecanismo de resistência a antifúngicos



Diante desta premissa surge grande necessidade de desenvolvimento de novos fármacos com maior eficácia e segurança, e nesta lógica, voltam-se os olhares para os fitoterápicos como um meio alternativo de tratamento. As vantagens dos fitoterápicos frente aos medicamentos sintéticos está na grande variedade molecular, visto que inúmeros compostos derivados de plantas medicinais têm sido utilizados como protótipos para a semi-síntese de novos fármacos antimicrobianos, menos tóxicos e mais eficientes, o que proporciona um campo vasto para descobertas de novos fármacos para o tratamento de casos de candidíase (ANDRADE et al., 2012; PIMENTA et al., 2019; BARBOSA-FILHO et al., 2007).

Atualmente, os poucos antifúngicos presente no mercado ainda são a principal escolha para tratar infecções por *Candida*. No entanto, cada vez mais as cepas do gênero *Candida* estão se tornando resistentes aos medicamentos (CHOWDHARY et al., 2017). Sendo necessário assim, o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas como as baseadas em produtos naturais oriundas de plantas medicinais.

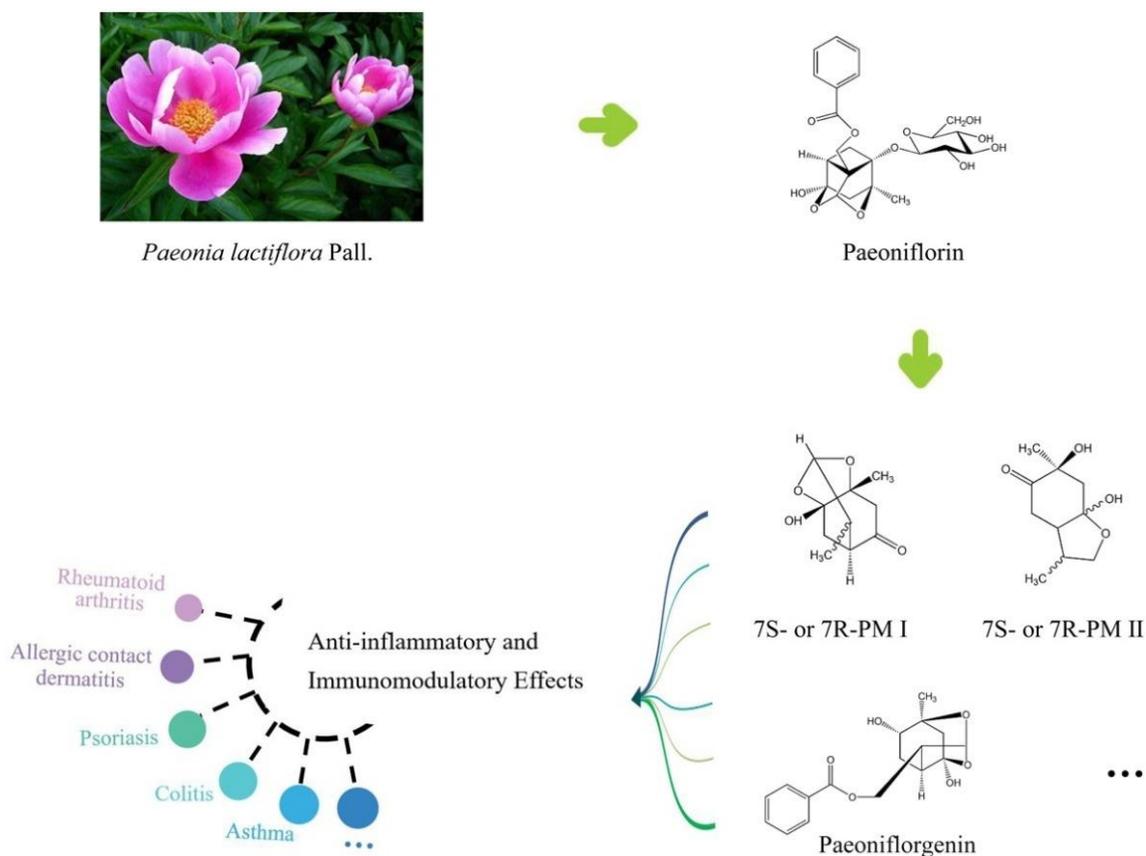
### 3.2 Uso terapêutico de plantas medicinais

As plantas formam um rico arsenal de produtos químicos, orgânicos e inorgânicos, com diferentes potenciais para exploração pelo homem. Muitas vezes são utilizadas como terapia complementar a tratamentos instituídos, por influência de práticas milenares ou por indicação de familiares/pessoas próximas ao longo de gerações (MACHADO et al., 2014; JÜTTE et al., 2017; PEDROSO; ANDRADE; PIRES, 2021).

Os “medicamentos tradicionais ou fitoterápicos” são aqueles originários de fontes vegetais e geralmente considerados seguros na dosagem de mistura, com base em seu uso histórico em várias culturas (UZODIMMA, 2013). Assim, as plantas continuam sendo a fonte primária natural mais abundante de drogas ativas e são inestimáveis no tratamento etnomédico de diversas doenças (OLASEHINDE et al., 2016; UGBOKO et al., 2020). Elas são geralmente fontes de vários fitoquímicos, alguns dos quais geralmente são responsáveis por suas atividades biológicas (UGBOKO et al., 2020).

Desde os primórdios da descoberta de medicamentos, constituintes químicos isolados de fontes naturais têm sido explorados como fonte de novas terapias. Estatisticamente, cerca de 50% das novas entidades químicas são obtidas de produtos naturais ou análogos de produtos naturais (FROS et al., 2010; KOEHN; CARTER, 2005; OLIVEIRA et al., 2017). A aplicação de medicamentos derivados de produtos naturais trouxe uma enorme contribuição para a saúde humana, por exemplo, a penicilina para o tratamento de doenças bacterianas infecciosas (RAMMELKAMP; KEEFER, 1943), a estreptomicina para o tratamento a longo prazo da tuberculose (ERTLI et al., 1980), o significativo anti-inflamatório glicosídeo monoterpeneo derivado de plantas, paeoniflorina (ZHANG et al., 2008), o composto anti-HIV derivado de plantas medicinais, patenteiflorina A (figura 2), (ZHANG et al., 2017), a ciclosporina, que possui efeitos imunomoduladores (KAHAN, 1989), lovastatina, que possui função hipolipidêmica (ROSENSON; TANGNEY, 1998) e ecteinascidina-743, que possui atividade antitumoral (GROSSO et al., 2007; HUANG et al., 2019).

**Figura 2** - A estrutura química da paeoniflorina e a planta medicinal



Fonte: (ZHOU et al., 2020).

A maioria das plantas encontraram aplicação na etnomedicina foram documentadas com base em suas atividades promissoras contra múltiplos microrganismos causadores de doenças (CHIKEZIE; IBEGBULEM; MBAGWU, 2015). A necessidade urgente de novos produtos farmacêuticos para o tratamento do câncer, HIV e outras doenças, exige uma exploração vigorosa de todas as abordagens para a descoberta de medicamentos, e é claro que a natureza desempenhou e continuará a desempenhar, um papel vital neste processo (CRAGG; NEWMAN, 2013).

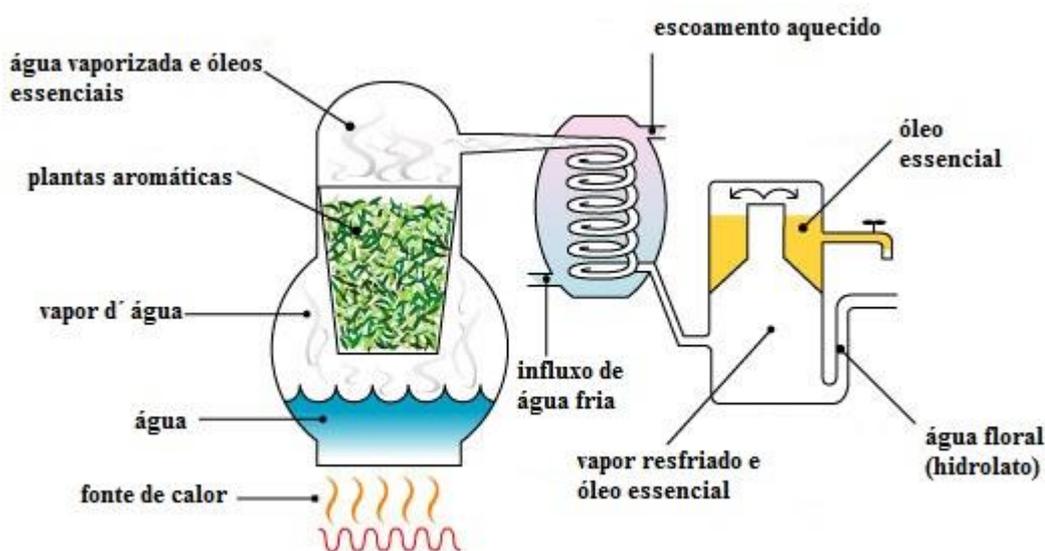
### 3.3 Potencial terapêutico dos óleos essenciais

Dentre os produtos naturais bastante estudados na literatura destacam-se os OEs, que são líquidos, voláteis, lípidos e raramente coloridos; pode ser lipossolúvel e solúvel em solventes orgânicos; e geralmente apresentam densidades inferiores à da água (DHIFI et al., 2016).

Em geral, os OEs são misturas complexas de compostos voláteis que estão presentes em plantas aromáticas (DIMA; DIMA, 2015). Esses compostos podem ser isolados de partes

anatômicas distintas das plantas principalmente por destilação e prensagem (figura 3) (FRANZ; NOVAK, 2015). Os principais componentes dos OEs são os terpenos, mas os aldeídos, álcoois e ésteres também estão presentes como componentes menores (ZUZARTE; SALGUEIRO, 2015). Os OEs são sintetizados pelas plantas para se protegerem de pragas e microrganismos, para atrair insetos polinizadores e para processos de sinalização, mas estudos recentes demonstraram que os OEs podem ter efeitos benéficos na saúde humana (LENARDÃO et al., 2016; LEYVA-LÓPEZ et al., 2017).

**Figura 3** - Destilação para obtenção do óleo essencial



Fonte: (DAVY BERNARDINO, 2016).

Os OEs têm sido amplamente estudados devido às suas propriedades antipatogênicas. Numerosas pesquisas *in vitro* e *in vivo* foram realizadas para avaliar as atividades antibacterianas, antivirais e antifúngicas potenciais dos OEs (RODRIGUEZ-GARCIA et al., 2016; ADAME-GALLEGOS; ANDRADE-OCHOA; NEVAREZ-MOORILLON, 2016). Esse tipo de estudo é de grande importância devido ao surgimento de cepas resistentes a antibióticos, ao aumento da população com menor imunidade e ao aumento da incidência de infecções associadas a biofilmes resistentes a medicamentos (ADAME-GALLEGOS; ANDRADE-OCHOA; NEVAREZ-MOORILLON, 2016; LEYVA-LÓPEZ et al., 2017).

A indústria de OE desenvolveu-se em um mercado altamente ativo e bem-sucedido na última década. As pessoas estão usando regularmente produtos contendo OEs, incluindo aromatizantes de alimentos, sabonetes, loções, xampus, produtos para penteados, colônia e

detergentes para a roupa (DE GROOT; SCHMIDT, 2016). Elas parecem considerar os óleos essenciais como alternativas seguras às formas farmacológicas de tratamento mais invasivas devido ao conceito de que são mais “naturais”. No entanto, devido à diversidade biológica dos OEs, percebe-se há necessidade de mais pesquisas. Isso deixa os potenciais efeitos benéficos e/ou adversos pouco claros, tornando-se necessária a investigação desses óleos a fim de verificar seus verdadeiros efeitos na saúde humana (RAMSEY et al., 2020).

### 3.4 Óleo essencial de patchouli (*Pogostemon cablin* Benth)

*Pogostemon cablin* Benth., também conhecido como Patchouli, ou “Guanghuoxiang” na medicina tradicional chinesa (MTC), é um membro da família Lamiaceae de plantas com flores, sendo uma importante planta aromática nativa do sudeste da Ásia e agora amplamente cultivada em muitas regiões tropicais e subtropicais, incluindo China, Indonésia, Filipinas e Tailândia (XIE et al., 2017). E também tem sido usado para tratar resfriados, náuseas, febre, dor de cabeça e diarreia (JUNREN et al., 2021).

**Figura 4** - Planta do *Pogostemon cablin* Benth



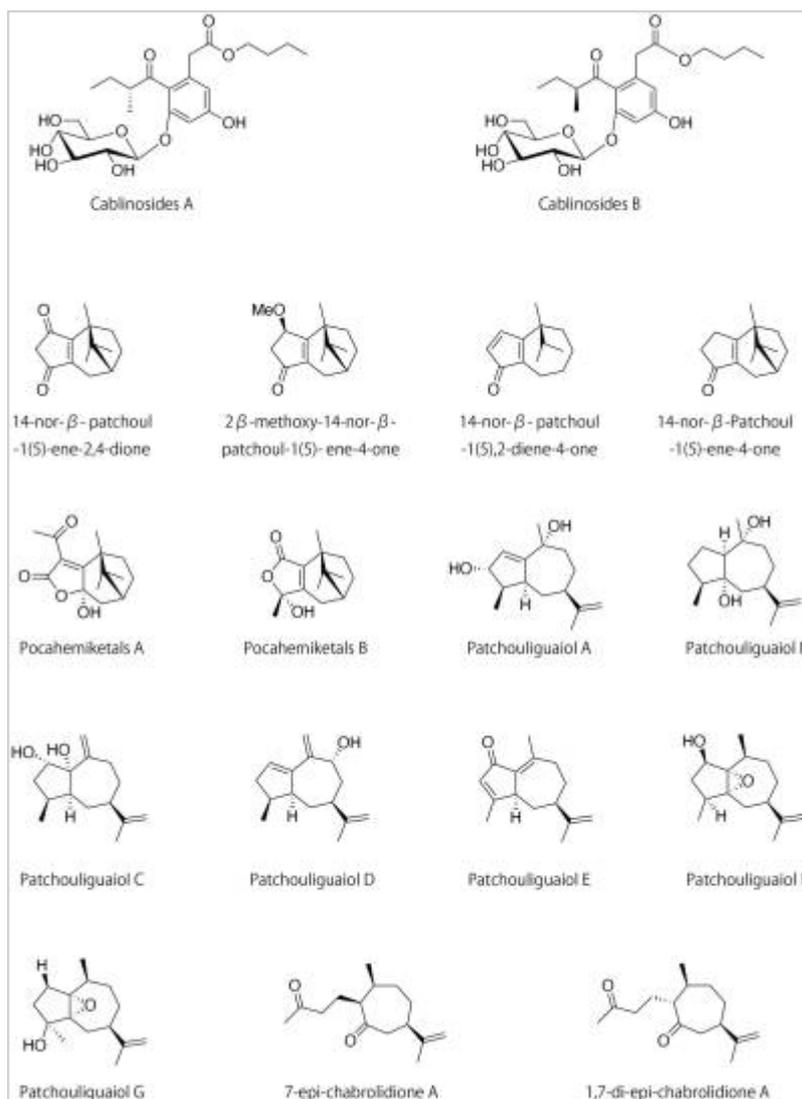
Fonte: (DO TERRA, 2022)

Patchouli também é conhecido como patchouly, *tamala patra* em sânscrito, *patcholi* em hindi, *patche tene* em Kannada, *pacchilai* em tâmil, *patchilla* em malaiala, *patchapanou patcha* em Marathi e *guang hou xiang* em chinês, *nilam* na Malásia e

Indonésia, *phimsen* na Tailândia. Morfologicamente, o Patchouli é uma erva perene resistente adaptada às condições climáticas quentes e úmidas. Cresce até 1 a 1,2 m de altura com um caule ereto e folhas largas (0,85 polegadas). As margens das folhas são lobadas e abundantes pelos estão presentes em sua superfície dorsal (ANGADI; VASANTHAKUMAR, 1995; SWAMY; SINNIHAH, 2015).

O óleo de Patchouli tem características únicas, incluindo um odor duradouro, lenhoso, canforado e terroso (DONELIAN et al., 2009). É listado como geralmente considerado seguro (GRAS) e, portanto, aprovado como aditivo alimentar natural pela Food and Drug Administration dos EUA (MANOJ; MANOHAR; MURTHY, 2012). O óleo extraído de todas as partes aéreas do Patchouli consiste em álcool de Patchouli (PA) (55,7%),  $\alpha$ -guaieno (13,1%),  $\alpha$ -bulneseno (11,1%) e outros compostos. No entanto, o óleo das raízes consiste principalmente em pogostone (70,2%), com PA compreendendo apenas 4% (VERMA et al., 2019). Em geral, a PA é maior nas folhas e caules do que nas raízes. O conteúdo de PA no óleo de Patchouli foi analisado em várias outras literaturas 32,3% (PRAKASH; JOSHI; SHUKLA, 2007), 37,5–51,0% (CHEN et al., 2014), 40,0% (ZHU et al., 2003), 44,5% (KOCEVSKI et al., 2013) e 50,7–54,3% (SINGH; SHARMA; RAMESH, 2002) e os teores de PA variam de acordo com o período de colheita, local de cultivo e condição experimental. No entanto, PA (C<sub>15</sub>H<sub>26</sub>O), um sesquiterpeno tricíclico, é considerado um dos principais componentes do óleo de Patchouli e um importante indicador para controle de qualidade (LEE et al., 2020).

**Figura 5** - Estrutura química de alguns constituintes do óleo essencial de Patchouli (*Pogostemon cablin*).

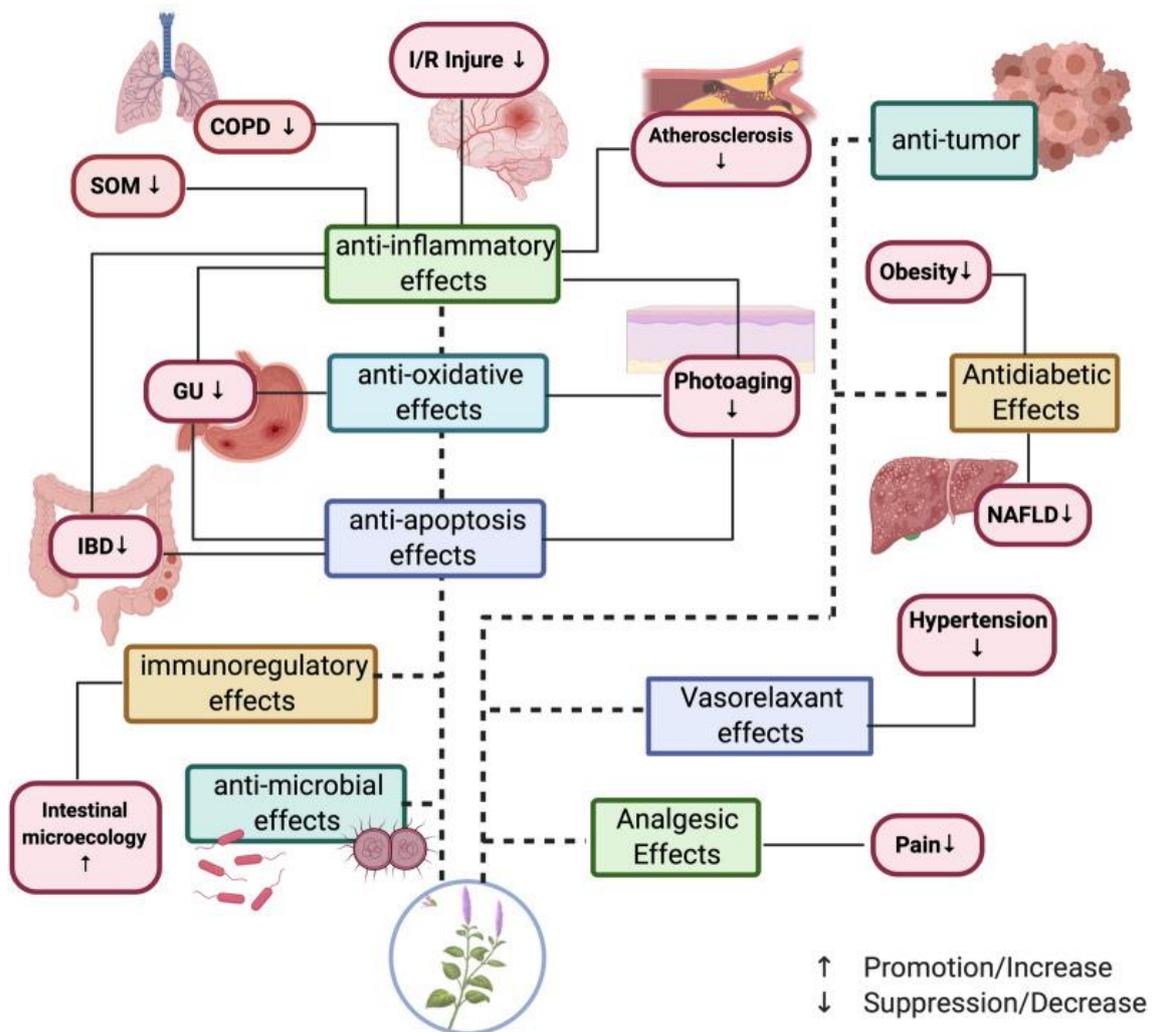


Fonte: (JUNREN et al., 2021).

Além do óleo volátil, o Patchouli também contém uma variedade de componentes não voláteis com atividade biológica significativa. Até agora, mais de 50 compostos não voláteis foram descobertos e suas estruturas químicas determinadas por vários métodos analíticos (SWAMY; SINNIHAH, 2015). Esses compostos podem ser divididos em terpenóides, flavonóides, glicosídeos, aldeídos, ácidos orgânicos e ligninas de acordo com suas estruturas químicas (WANG et al., 2010; JUNREN et al., 2021).

Dada a sua natureza multicomponente, descobriu-se que o Patchouli promove inúmeras atividades farmacológicas e demonstrou proteger contra inflamação, microorganismos, tumores, envelhecimento, oxidação, analgésica, antiplaquetária, antitrombótica, afrodisíaca, antidepressiva, antimutagênica, antiemética, fibrinolítica e citotóxica (SWAMY; SINNIHAH, 2015; JUNREN et al., 2021).

**Figura 6** - Algumas atividades farmacologia do óleo essencial de Patchouli (*Pogostemon cablin*).



Fonte: (JUNREN et al., 2021).

### 3.5 Toxicidade dos produtos a base de plantas medicinais

Os medicamentos fitoterápicos estão se tornando cada vez mais populares com a impressão de que causam menos efeitos colaterais em comparação com as drogas sintéticas; no entanto, podem contribuir consideravelmente para incidentes de envenenamento agudos ou crônicos. A maioria desses casos são toxicidades insignificantes envolvendo a ingestão pediátrica de plantas medicinais em baixa quantidade (EKOR, 2014). Nos casos de intoxicações graves, os pacientes são adultos que consumiram erroneamente uma planta venenosa como comestível ou ingeriram a planta em relação às suas propriedades medicinais para terapia ou propriedades tóxicas para fins ilegais (FARZAEI et al., 2020).

Existem vários casos de nefropatia com o uso de plantas medicinais chinesas específicas (JHA et al., 2013). Por exemplo, *Aristolochia fangchi*, um fitoterápico chinês usado para perda de peso, causou nefropatia e casos mórbidos (FROBERG; IBRAHIM; FURBEE, 2007). Por

outro lado, uma vez que as informações toxicológicas e antídotos de algumas ervas medicinais não são disponíveis, a toxicidade das plantas merece maior atenção. Portanto, há preocupações sobre a toxicologia das plantas medicinais e o impacto em humanos (FARZAEI et al., 2020).

A toxicidade apresentada por uma espécie vegetal pode ser dependente de fatores relacionados às plantas e ao indivíduo. No primeiro caso, fatores como estocagem do material vegetal, a dose utilizada, a forma de uso, as interações entre plantas medicinais utilizadas conjuntamente (RATES, 2001) e, ainda, problemas relacionados à contaminação das plantas por toxinas fúngicas, pesticidas e metais pesados contribuem para a toxicidade da planta (EFFERTH; KAINA, 2011; CAMPOS et al., 2016).

A avaliação de toxicidade inicialmente é baseada em testes de toxicidade *in vitro*. De acordo com o Órgão Internacional de Padronização (International Standard Organization), ISO 10993, o ensaio de citotoxicidade *in vitro* é o primeiro teste para avaliar a biocompatibilidade de qualquer material para uso em dispositivos biomédicos. A avaliação da citotoxicidade é um exame biológico fundamental de teste de medição e triagem aplicado em células de tecido para distinguir a taxa de proliferação celular, reprodução, bem como os efeitos morfológicos de substâncias (TOLOSA; DONATO; GOMEZ-LECHON, 2015). Foi um método preliminar crucial necessário para desenvolver drogas ou compostos de biomateriais e prever as doses iniciais que são capazes de tratar doenças sem afetar as células normais (HUSSEIN et al., 2016; GOLLA, 2019).

O método tradicional de teste baseado em animais é lento e caro. A baixa eficiência e o alto custo geram um enorme acúmulo de produtos químicos existentes não testados e produtos químicos recém-inventados aguardando aprovação para entrar no mercado comercial. Por último, mas não menos importante, há uma pressão social crescente em torno do uso ético de animais de laboratório para benefício humano (HARTUNG, 2010; ZHANG et al., 2018).

Embora os estudos de desfechos apicais em animais continuem sendo a abordagem de teste de toxicidade predominante exigida por regulamentos governamentais, a abordagem de toxicidade *in vitro* baseada em células ou organoides está ganhando aceitação constante (ATTENE-RAMOS et al., 2013; ZHANG et al., 2018).

Com base nessas informações, verifica-se a importância da investigação da atividade toxicológica dos óleos essenciais, em especial a citotoxicidade do óleo essencial *Pogostemon cablin* Benth.

*Metodologia*

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 Área de estudo e localização de testes experimentais

A avaliação do potencial antifúngica foi feita pelo Laboratório de Pesquisa de atividade Antibacteriana e Antifúngica de Produtos Naturais e/ ou Sintéticos Bioativos, do Departamento de Ciências Farmacêuticas/Centro de Ciências da Saúde/Universidade Federal da Paraíba coordenado pela Prof. Dra Edeltrudes de Oliveira Lima.

A pesquisa de citotoxicidade foi realizada no Laboratório de Bioquímica da Unidade Acadêmica de Ciências Biológicas (UACB) do Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CSTR) da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG) coordenado pelo Prof. Dr. Abrahão Alves de Oliveira Filho.

### 4.2 Produto a ser testado

O produto puro submetido aos ensaios biológicos foi a substância codificada por : OE-*Pogostemon cablin* Benth oriundo da industria Quinarí localizado em Ponta Grossa-Paraná.

Esse OE foi devidamente solubilizado em tween 80 a 0,02% e dimetil-sulfóxido (DMSO) numa proporção de até 0,5% e completada com água destilada esterilizada.

### 4.3 Avaliação da atividade antifúngica

#### 4.3.1 Meios de cultura

Os meios de cultura utilizados nos ensaios de avaliação da atividade biológica foram o Ágar Sabouraud Dextrose (ASD), Caldo Sabouraud Dextrose (CSD) (DIFCO LABORATORIES/ USA/FRANCE) e RPMI 1640-L-glutamina sem bicarbonato (LGC BIOTECNOLOGIA/BRASIL), os quais foram preparados segundo as descrições dos fabricantes.

#### 4.3.2 Cepas fúngicas

Para os ensaios de atividade biológica do OE, foram utilizadas as seguintes leveduras do gênero *Candida*:

- *Candida albicans* (C a ATCC 76485, C a LM – 62, C a LM – 106, C a LM – 108 e C a LM – 111);

- *Candida parapsilosis* (C. p. ATCC 22019, C. p. LM – 02, C. p. LM – 04, C. p. LM – 09 e C. p. LM – 14).

Estas pertencem a MICOTECA do Laboratório de Micologia, Laboratório de Pesquisas: Atividade Antibacteriana e Antifúngica de Produtos Naturais e/ ou Sintéticos Bioativos Departamento de Ciências Farmacêuticas (DCF), Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal da Paraíba. Todas as cepas foram mantidas em ASD à temperatura de 4 °C. Foram utilizados para os ensaios, repiques de 24-48 horas em ASD, incubados a  $35 \pm 2$  °C.

### 4.3.3 Inóculo

Para preparação do inóculo, colônias obtidas de culturas das cepas de *Candida spp.* mantidas em ASD, foram suspensas em solução de NaCl 0,85% estéril e ajustadas de acordo com o padrão 0,5 de McFarland para primeiramente obter um inóculo de  $10^6$  UFC/mL e em seguida diluída em solução salina numa proporção de 1:9, para enfim resultar numa suspensão fúngica contendo  $10^5$  UFC/mL que foi utilizada nos ensaios (KONEMAN et al., 2008; OSTROKY et al., 2008).

### 4.3.4 Determinação da concentração inibitória mínima(CIM)

Os ensaios de atividade antifúngica foram realizados conforme os protocolos de Cleeland; Squires (1991), Hadacek; Greger (2000) e NCCLS/CLSI (2002). A determinação da CIM do óleo essencial sobre cepas de *Candida* foi realizada através da técnica da microdiluição em caldo em placa para cultura de células (TPP/ SWITZERLAND/EUROPA) contendo 96 poços. Inicialmente, foram distribuídos 100 µL de RPMI 1640 duplamente concentrado nos orifícios das placas de microdiluição. Em seguida, 100 µL da emulsão do óleo essencial teste duplamente concentrado, foram dispensados nas cavidades da primeira linha da placa. E por meio de uma diluição seriada a uma razão de dois, foi obtida concentrações de 1024 µg/mL até 4 µg/mL. Por fim, foi adicionado 10 µL dos inóculos de *Candida spp.* nas cavidades, onde cada coluna da placa refere-se a uma cepa fúngica, especificamente. Paralelamente, foi realizado o controle do inóculo (RPMI 1640 + leveduras); e controle droga padrão (RPMI 1640+ inóculo+ anfotericina B 100µg). As placas preparadas e assepticamente fechadas foram submetidas à incubação numa temperatura de  $35 \pm 2$  °C por 24 - 48 horas. A CIM foi definida como a menor concentração do OE, capaz de produzir inibição visível sobre o crescimento fúngico verificado nos orifícios, quando em comparação com seus controles. O resultado foi expresso pela média aritmética das CIM's obtidas no ensaio realizado em duplicata.

A atividade antifúngica do óleo essencial foi interpretada e considerada como ativa ou inativa, conforme os seguintes critérios: 50-500 µg/mL= forte/ótima atividade; 600-1500 µg/mL= moderada atividade; > acima de 1500 µg/mL=fraca atividade ou OE inativo (HOLETZ et al., 2002; SARTORATTO et al., 2004; HOUGHTON et al., 2007).

#### **4.3.5 Determinação da concentração fungicida mínima (CFM)**

Após leitura da CIM, alíquotas de 10 µL do sobrenadante das cavidades onde foi observada completa inibição do crescimento fúngico (CIM, CIM x 2 e CIM x 4) nas placas de microdiluição, foram subcultivadas em 100 µL de RPMI 1640 contidos em novas placas de cultura de células. Posteriormente, as mesmas devidamente preparadas, foram incubadas a 35± 2 °C por 24-48 horas. A CFM foi considerada como a menor concentração em que não houve crescimento de leveduras no meio de cultura. Os ensaios foram realizados em duplicata e o resultado expresso pela média aritmética das CFM's obtidas nos dois ensaios (NCUBE; AFOLAYAN; OKOH, 2008).

#### **4.3.6 Ação do produto na parede celular fúngica**

Para investigar a ação do OE na parede celular fúngica foi realizado ensaio com sorbitol, um protetor osmótico usado para estabilizar os protoplastos de fungos. Caso o OE atue de alguma forma sob a parede celular do fungo, ele provocará lise de suas células quando na ausência de um estabilizador osmótico, mas permitirá seu crescimento na presença desse suporte osmótico. Dessa maneira, este ensaio compara as CIM do OE na ausência e presença de sorbitol a 0,8 M.

A determinação da CIM do OE, na presença do sorbitol (0,8M), foi realizada pelo método de microdiluição, utilizando placas de microdiluição contendo 96 cavidades, semelhante ao item 6., sendo este ensaio realizado com as cepas *C. albicans* ATCC 76485 e *C. albicans* LM-62. Em uma coluna de duas placas distintas, foi adicionado em todos os 12 poços 100 µL do meio líquido caldo Sabouraud dextrose - CSD previamente adicionado de sorbitol 0,8 M. Na coluna seguinte adicionou-se em todos os 12 poços 100 µL de CSD sem sorbitol. Posteriormente, 100 µL da solução do OE de *Pogostemon cablin* Benth, na concentração de 1024µg/mL, foram dispensados nas cavidades da primeira linha da coluna da placa a qual foi determinado. Por meio de uma diluição seriada a uma razão de dois obteve-se concentrações de 512 até 1µg/mL dos OE - *Pogostemon cablin* Benth.

Por fim, foi adicionado 10 µL do inóculo das espécies nas cavidades de ambas as placas, onde cada coluna da placa refere-se a uma cepa fúngica (FROST et al., 1995).

Um controle de micro-organismo foi realizado colocando-se nas cavidades 100 µL do mesmo CSD e sorbitol (0,8 M) também duplamente concentrados, e 10 µL do inóculo de cada espécie. Um controle de esterilidade também foi realizado, onde foi colocado 200 µL do CSD em um orifício sem a suspensão dos fungos. Também, foi realizado o mesmo procedimento com um antifúngico que atua em parede e outro que não atua em parede, para servirem de controle dos resultados. As placas foram assepticamente fechadas e incubadas a 35 °C por 48 horas e foi realizada a leitura (FROST et al., 1995; ZACCHINO, 2001).

#### **4.3.7 Interação com o ergosterol**

Muitos fármacos disponíveis para o uso clínico interagem diretamente com o ergosterol, ocasionando a ruptura da membrana celular fúngica e perda de conteúdo intracelular. Para determinar se o OE ou seus constituintes se ligam a esteróis da membrana fúngica, a CIM destes produtos para *C. albicans* foi determinada com e sem a adição de ergosterol. Se a atividade do óleo essencial for causada pela ligação ao ergosterol, o ergosterol exógeno impedirá a ligação com o ergosterol da membrana fúngica e como consequência, a CIM desse OE tende a aumentar na presença do ergosterol exógeno em relação ao ensaio controle. Caso a CIM do OE permaneça inalterada na presença de diferentes concentrações exógenas de ergosterol, sugere-se que este OE não age ligando-se ao ergosterol da membrana. Da mesma forma, pode-se observar se este comportamento é específico para o ergosterol ou se ele acontece semelhantemente com colesterol.

A determinação da CIM dos produtos (OE e anfotericina B) contra cepas de *C. albicans* ATCC 76485 e *C. albicans* LM- 62, foi realizada por microdiluição, utilizando placas de microdiluição contendo 96 cavidades, semelhante ao protocolo exposto no item 6. O meio de cultura (CSD) utilizado na ausência e na presença de 400 µg/mL de ergosterol. Um controle de micro-organismo foi realizado colocando-se nas cavidades 100 µL do mesmo CSD e ergosterol nas mesmas concentrações e 10 µL do inóculo de cada espécie. Um controle de esterilidade também foi realizado, onde foi colocado 200 µL do CSD em um orifício sem a suspensão dos fungos. Por último, foi realizado o mesmo procedimento com o anfotericina B, cuja interação com ergosterol já é conhecida, para servir de controle positivo dos resultados. As placas foram seladas e incubadas a 35°C por 24 - 48 horas e realizou-se a leitura (ESCALANTE et al., 2008).

#### **4.3.8 Avaliação da interferência do óleo essencial de patchouli (*Pogostemon cablin* Benth) sobre a resistência aos antifúngicos licenciados( ensaio de modulação).**

Para avaliar se o OE modularia a ação da anfotericina B frente às cepas de *C. albicans* ATCC 76485 e *C. albicans* 62 a CIM deste antifúngico foram determinadas, pela técnica de microdiluição, na ausência e na presença do OE em concentrações sub-inibitórias (CIM/8). Os valores de CIM do antifúngico foram então comparados na ausência e presença do OE CIM/8. As placas foram incubadas durante 24 horas a 35-37 °C. Os testes foram realizados em triplicata e o resultado expresso pela média geométrica dos resultados (COUTINHO et al., 2008; ELIOPOULOS; MOELLERING, 1991).

#### **4.4 Avaliação da atividade citotóxica do óleo essencial de patchouli (*Pogostemon cablin* Benth)**

##### **4.4.1 Posicionamento ético**

Os eritrócitos humanos referentes aos tipos sanguíneos A, B e O foram oriundos de doadores saudáveis. Para a realização desse ensaio foi levado em consideração os aspectos legais e éticos da pesquisa envolvendo humanos. O comitê de ética em pesquisa da fundação Francisco Mascarenhas/ faculdade integrada de Patos aprovou essa pesquisa, Protocolo de N 2.373.249.

##### **4.4.2 Eritrócito humanos**

Amostras de sangue intravenoso de voluntários adultos saudáveis (25-30 anos) coletadas em frascos de EDTA foram diluídas com solução salina normal (0,9% NaCl) e centrifugadas a 1000 rpm por 10 min. Este procedimento foi repetido duas vezes e finalmente o sedimento RBC (Red Blood Cell) foi recolhido e diluído com solução salina para ter uma densidade celular de  $2 \times 10^4$  células / mL (VERMA; RAVAL, 1991).

##### **4.4.3 Avaliações da atividade hemolítica do óleo essencial de patchouli (*Pogostemon cablin* Benth)**

Amostras de sangue humano A, B e O foram misturadas com NaCl 0,9 % na proporção de 1:30 e centrifugadas a 2500 rpm durante 5 minutos para obtenção dos eritrócitos. Este procedimento foi repetido por mais duas vezes e, o sedimento da última centrifugação ressuspenso em NaCl 0,9% para obter uma suspensão a 0,5% livre de componentes da série branca e plaquetas. Foi adicionado o óleo essencial *Pogostemon cablin* Benth a 2 mL da

suspensão de hemácias nas diferentes concentrações (50, 100, 500 e 1000 µg/mL). Foi realizado o controle negativo (suspensão de eritrócitos sem adição dos produtos - 0 % de hemólise) e o controle positivo (suspensão de eritrócitos acrescida de Triton X-100 a 1% - 100 % de hemólise). Após isso, as amostras foram incubadas por 1 hora à  $22 \pm 2$  °C sob agitação lenta e constante. Decorrido este tempo as amostras foram centrifugadas a 2500 rpm durante 5 minutos e a hemólise quantificada por espectrofotometria em comprimento de onda de 540 nm (RANGEL et al., 1997). Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Os resultados expressos como uma porcentagem que representa a média aritmética de três medidas.

#### **4.4.4 Avaliação da atividade anti-hemolítica do óleo essencial de patchouli (*Pogostemon cablin* Benth)**

A avaliação da fragilidade osmótica dos eritrócitos humanos foi realizada com uma suspensão de eritrócitos a 0,5%. As soluções contendo concentrações diferentes (50, 100, 500 e 1000 µg/mL) do óleo essencial *Pogostemon cablin* Benth, foram incubadas em tubos contendo 2 mL de uma suspensão de eritrócitos por 1h a  $22 \pm 2$  °C. Decorrido este tempo, as preparações foram centrifugadas a 2500 rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado.

Os eritrócitos foram ressuspensos em solução hipotônica de cloreto de sódio 0,24% e agitadas a 100 rpm, por uma hora a  $22 \pm 2$  °C. Após este período, as amostras foram centrifugadas a 2500 rpm por 5 minutos e a hemólise foi quantificada por espectrofotometria em comprimento de onda de 540 nm (DACIE; LEWIS, 2001). Foi realizado o controle negativo (suspensão de eritrócitos sem adição do óleo essencial *Pogostemon cablin* Benth - 0 % de hemólise) e o controle positivo (suspensão de eritrócitos acrescida da solução hipotônica - 100 % de hemólise). Os testes foram realizados em triplicata. Os resultados expressos como uma porcentagem que representa a média aritmética de três medidas.

#### **4.5 Análise estatística**

Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados expressos em porcentagens representando a média aritmética  $\pm$  erro padrão da média. Os dados foram analisados por meio da Análise de Variância (ANOVA) One-way e do teste post-hoc de Bonferroni, utilizando o software graphpad prism 7.0. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

## *Resultados e Discussão*

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) em meio líquido foi testada e determinada para o óleo essencial de *Pogostemon cablin* Benth nas diferentes concentrações sugeridas na metodologia e determinada pela concentração mais baixa capaz de inibir visualmente. Os resultados dos ensaios da avaliação da atividade antifúngica do óleo essencial de Patchouli (*Pogostemon cablin* Benth) contra cepas de *C. parapsilosis* e *C. albicans* encontram-se a seguir.

Observou-se que para *C. parapsilosis* todas as cepas clínicas testadas foram sensíveis ao óleo essencial de *Pogostemon cablin* Benth apresentando uma CIM de 8 µg/mL para maioria das cepas, como mostra tabela 1.

Com relação a Concentração Fungicida Mínima (CFM) do óleo essencial de *Pogostemon cablin* Benth sobre sobre cepas de *Candida parapsilosis* observou-se que os valores foram 8 µg/mL para maioria das cepas, mostrado na Tabela 1.

**Tabela 1** - Resultados da avaliação da CIM (µg/mL) e da avaliação da Concentração Fungicida Mínima CFM (µg/mL) do óleo essencial de *Pogostemon cablin* sobre cepas de *Candida parapsilosis*.

<i>Cepas fúngicas</i>	<i>OE de Pogostemon cablin</i>		<i>Anfotericina B (100µg)</i>	<i>Controle da levedura</i>
	<b>CIM</b>	<b>CFM</b>		
<b><i>C. p. ATCC 22019</i></b>	NI	NI	-	+
<b><i>C. p. LM - 02</i></b>	8	8	-	+
<b><i>C. p. LM - 04</i></b>	8	8	-	+
<b><i>C. p. LM - 09</i></b>	8	8	-	+
<b><i>C. p. LM - 14</i></b>	8	8	-	+

(-) ausência do crescimento de leveduras; (+) crescimento de leveduras; (NI) Não identificado.

Semelhante a *C. parapsilosis*, todas as cepas clínicas de *C. albicans* testadas foram sensíveis para o óleo essencial de *Pogostemon cablin* Benth apresentando a CIM variando entre 4 a 16 µg/mL para todas as cepas, mostrado na Tabela 2. Pode-se perceber que o óleo essencial de Patchouli apresentou uma atividade contra cepas de *Candida albicans* superior comparando-se a atividade frente as cepas *C. parapsilosis*.

**Tabela 2** - Resultados da avaliação da CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) e da Concentração Fungicida Mínima CFM ( $\mu\text{g/mL}$ ) do óleo essencial de *Pogostemon cablin* sobre cepas de *Candida albicans*

<i>Cepas fúngicas</i>	<i>OE de Pogostemon cablin</i>		<i>Anfotericina B</i> (100 $\mu\text{g}$ )	<i>Controle da</i> <i>levedura</i>
	<b>CIM</b>	<b>CFM</b>		
<b>C a ATCC 76485</b>	4	4	-	+
<b>C a LM - 62</b>	4	4	-	+
<b>C a LM - 106</b>	4	4	-	+
<b>C a LM - 108</b>	4	4	-	+
<b>C a LM - 111</b>	16	16	-	+

(-) ausência do crescimento de leveduras; (+) crescimento de leveduras; (NI) Não identificado.

Segundo Sartorato et al., (2004) a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais é classificada como forte quando eles têm CIM de até 500  $\mu\text{g/mL}$ , moderados para CIM de 600 a 1500  $\mu\text{g/mL}$  e fraco para CIM acima de 1500  $\mu\text{g/mL}$ . O óleo essencial de *Pogostemon cablin* Benth apresentou um efeito fungicida forte frente as todas as cepas, pois a CIM para o gênero *Candida* foi menor que 500  $\mu\text{g/mL}$ .

De acordo com Hafidh et al., (2011) para um composto ser considerado fungicida ou fungistático a Concentração Fungicida Mínima (CFM) deve ser igual ou duas vezes maior que a CIM ou a CFM deve ser maior que o dobro da CIM. Analisando o resultado do CFM pode-se observar que *Pogostemon cablin* possui atividade fungicida contra todas as cepas já que a CIM foi igual para CFM. Esse resultado corrobora com a literatura, em que se demonstrou a atividade antifúngica contra *Candida albicans* com valores de CIM de 300 a 500  $\mu\text{M}$  do óleo *Pogostemon cablin* Benth (ZHOU et al., 2018).

Outros estudos que corroboram com a importância desse OE e com os dados dessa pesquisa, têm-se: PIMENTA et al., (2019), ao avaliar a atividade antifúngica do óleo essencial *Pogostemon cablin* Benth, observou atividade antifúngica sobre cepa de *C. Glabrata*. Como também, CAVALCANTE et al., (2018), testou a capacidade antifúngica do óleo de patchouli contra as cepas de *Candida tropicalis*. O autor em questão concluiu que o óleo *Pogostemon cablin* pode ser considerado um forte inibidor contra as cepas de *Candida tropicalis*, pois apresentou uma CIM de 128  $\mu\text{g/ml}$ .

Além do mais, ALVES et al., (2019), demonstraram que o óleo *Pogostemon cablin* tem capacidade antifúngica contra as cepas de *Candida krusei*, apresentando CIM e CFM de 32 µg/mL. Já, ADHAVAN et al., (2017), demonstraram que o óleo de patchouli possui atividade antimicrobiana contra microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos, com CIM de 25 mg/mL contra isolados de *Streptococcus mutans* e 12,5 mg/mL contra *Shigella flexneri* e *S. aureus* em estudos realizados em in vitro.

A atividade antifúngica também foi demonstrada por AISYAH; YUNITA; AMANDA, (2021), que relataram a combinação com o óleo de citronela e o óleo de Patchouli, resultando na inibição mais efetiva do fungo *Aspergillus niger* em comparação com a nistatina, que é um antifúngico comercial e com efeito conhecido.

A parede celular fúngica atua como uma barreira, conferindo rigidez e força. É composto por várias macromoléculas essenciais para a sobrevivência de fungos como β-glucana, quitina e outras proteínas e é um importante alvo para agentes antifúngicos (LEE; KIM, 2016). Para avaliar a ação na parede celular utilizou-se a técnica do sorbitol e observou-se que mesmo na presença quanto na ausência do sorbitol o óleo essencial *Pogostemon cablin* apresentou o mesmo valor de CIM em ambas as situações, o mesmo perfil foi observado quando analisados na presença e na ausência do ergosterol.

**Tabela 3** - Efeito dos OE *Pogostemon cablin* sobre as cepas *C. albicans* ATCC 76485 e *C. albicans* LM- 62 na ausência e presença do ergosterol 400µg/mL e sorbitol 0,8M.

Micro-organismo	CIM OE <i>Pogostemon cablin</i> (µg/mL)		CIM OE <i>Pogostemon cablin</i> (µg/mL)	
	Ausência de sorbitol	Presença de sorbitol	Ausência do ergosterol	Presença do ergosterol
<i>C. albicans</i> ATCC 76485	512	512	512	512
<i>C. albicans</i> LM-62	256	256	64	64

Como mostrado na Tabela 3, o OE de *Pogostemon cablin* Benth não teve alteração na CIM tanto na presença como na ausência do sorbitol e ergosterol, demonstrando que o

mecanismo de ação não envolve a parede celular e nem membrana plasmática, sugerindo assim a realização de mais estudos para compreender o mecanismo de ação.

Outros mecanismos podem ser sugeridos pelos quais os óleos essenciais podem atuar, promovendo sua ação antifúngica, como: inibição da bomba de efluxo, a atuação sobre a membrana das mitocôndrias fúngicas, inibição do desenvolvimento do biofilme, da síntese/produção de micotoxinas, entre outros (NAZZARO et al., 2017).

Outra hipótese a ser analisada, é a resistência das cepas que resulta na redução da sensibilidade a certos compostos e é causada por um ajuste hereditário do fungo a esse composto. Isso ocorre normalmente devido a mutações genéticas únicas ou múltiplas. A resistência aos fungicidas pode ser devido a vários procedimentos (FLUIT; VISSER; SCHMITZ, 2001), incluindo (a) redução da ligação fungicida devido à alteração do sítio alvo, (b) superexpressão da proteína alvo, (c) absorção reduzida do fungicida devido para bomba de efluxo removendo compostos tóxicos, e (d) degradação metabólica do fungicida através da desintoxicação (SÁNCHEZ-TORRES, 2021).

Também se avaliou a combinação do óleo essencial de Patchouli (*Pogostemon cablin* Benth) com o fármaco padrão, anfotericina B, mostrado na tabela 4.

**Tabela 4** - Modulação da ação do antifúngico na sua CIM pelo *Pogostemon cablin* na CIM/8 frente cepas de *C. albicans*.

Micro-organismo	Anfotericina B CIM (µg/mL)	
	Sozinho	Associado ao óleo (CIM/8)
<i>C. albicans</i> ATCC 76485	0,5	0,5
<i>C. albicans</i> LM-62	2	0,5

Alguns trabalhos relataram a combinação de diferentes agentes antifúngicos ou de produtos naturais e drogas padrão na redução de seus valores de CIM (FARIA et al., 2011; LIU et al., 2014).

Com a realização desse trabalho, pode-se observar que os dois tipos de cepas do gênero *Candida* exposto a combinação do OE e o fármaco padrão obtiveram como valor de CIM 0,5, dando ênfase para a cepa clínica *C. albicans* LM-62, mostrado na tabela 4.

O efeito sinérgico foi evidenciado ao associar a anfotericina B com o óleo essencial de Patchouli (*Pogostemon cablin* Benth) pela redução do CIM, de acordo com LEWIS et al., 2002. Logo, uma interação sinérgica é observada quando a capacidade de matar do primeiro agente é aumentada por uma concentração subinibitória do segundo agente. Uma interação antagônica está presente se o efeito antimicrobiano do primeiro componente for inibido pelo segundo. Como um agente é usado em concentrações subinibitórias, este ensaio não pode distinguir interações aditivas (atividade combinada é igual à soma das atividades individuais) de interações indiferentes (SINGH et al., 2000).

A anfotericina B é um agente crucial no tratamento de infecções fúngicas sistêmicas graves. No entanto, seus efeitos colaterais e toxicidade bem conhecidos às vezes exigem a descontinuação da terapia, apesar de uma infecção fúngica sistêmica com risco de vida (LANIADO-LABORÍN; CABRALES-VARGAS, 2009). Observando a tabela 4, o óleo essencial de Patchouli (*Pogostemon cablin* Benth) poderá a vir ser utilizado em conjunto com anfotericina B na prática clínica e dessa forma diminuir a sua dose e conseqüentemente a toxicidade presente nesse fármaco.

A importância do sinergismo na pesquisa clínica é evidenciada em alguns estudos, FU et al., (2007), observaram aumento dos efeitos antifúngicos causados por combinações (1:5, 1:7 e 1:9) de óleos essenciais de *S. aromaticum* (cravo) e *R. officinalis* contra *C. albicans*.

Logo, esse resultado é bastante significativo, pois o uso de terapia antifúngica combinada ao um OE para obter um efeito sinérgico poderá ser uma opção terapêutica. Já que tem se observado a necessidade de novos medicamentos antifúngicos e das resistências cada vez maior de cepas fúngicas frente o repertório limitado de antifúngicos comercializado (LEE et al., 2021).

As substâncias naturais/sintéticas com alto potencial citotóxico podem causar a morte de células ou tecidos presentes na mucosa, gerar absorção local e sistêmica e/ou causar efeitos danosos à saúde do indivíduo (PITHON et al., 2011).

O efeito tóxico produzido por determinadas substâncias candidatas à fármacos pode estar diretamente relacionado a altas capacidades hemolíticas, uma vez que, as hemácias são facilmente sensibilizadas por certas substâncias, promovendo lise e liberando hemoglobina (SOUSA et al., 2021).

Os testes *in vitro* de citotoxicidade, utilizando os eritrócitos, são frequentemente realizados para rastrear e determinar a toxicidade de vários compostos (MARKOWICZ-PIASECKA et al., 2018). Este perfil citotóxico avalia a interação direta de vários compostos químicos sob os eritrócitos. Ensaio hemolíticos são amplamente utilizados para examinar a

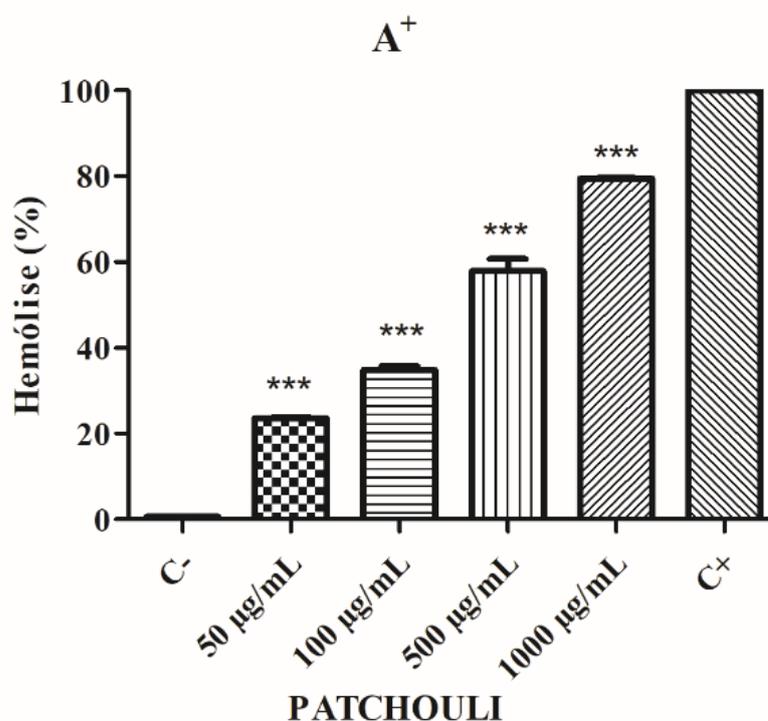
toxicidade de um xenobiótico, principalmente para investigar efeitos diretos sobre a integridade das membranas celulares (ARAGÃO NETO et al., 2022).

Nesse estudo, utilizou-se o teste de citotoxicidade para avaliar o potencial tóxico do óleo essencial de Patchouli contra células sanguíneas humanas, visto que através desta análise pode ser evidenciado possíveis efeitos danosos do óleo essencial à membrana das células.

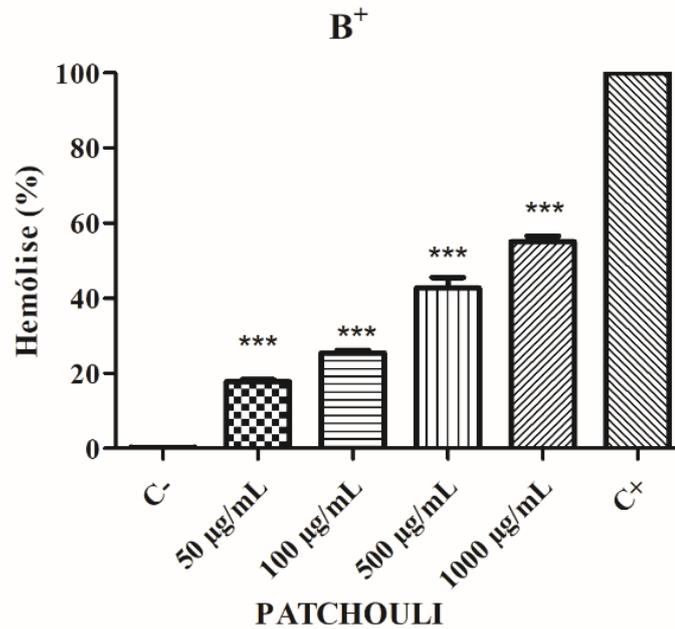
Rangel et al., (1997) classificaram através da hemólise de eritrócitos diferentes níveis de citotoxicidade celular onde: a percentagem de hemólise entre (0 a 40%) é considerado como baixo, entre (40 a 80%) moderado e acima de (80%) considerado como alto.

Os resultados obtidos revelam uma similaridade entre o percentual de hemólise nos diferentes tipos sanguíneos testados, apresentaram baixa percentual de hemólise < 40% as concentrações testadas de 50µg/mL e 100 µg/mL. No entanto, as concentrações 500µg/mL e 1000 µg/mL demonstraram moderado efeito hemolítico com percentual variando entre 50% a 75% de hemólise, conforme pode ser visto nas figuras 7,8 e 9.

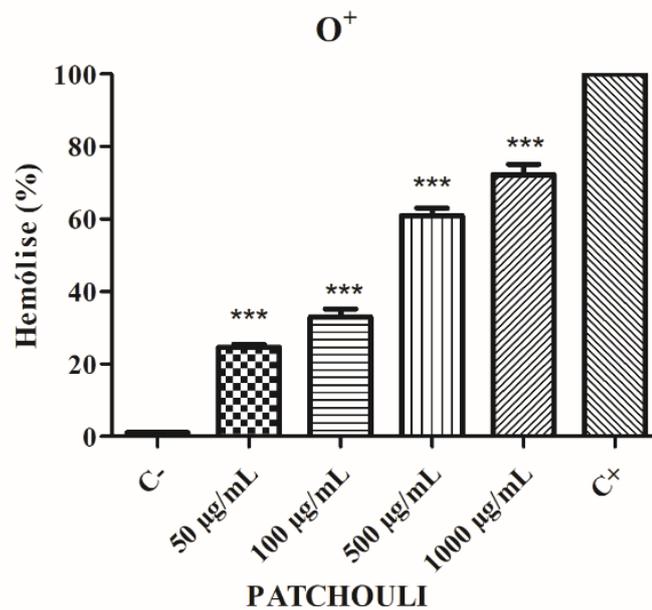
**Figura 7** - Avaliação hemolítica do Patchouli em eritrócitos do tipo A. (C-) Controle negativo (suspensão a 0,5%), (C+) Controle positivo (1% Triton X-100). P < 0,05, P < 0,01 e P < 0,001 (\*\*\*) versus controle positivo



**Figura 8** - Avaliação hemolítica do Patchouli em eritrócitos do tipo B. (C-) Controle negativo (suspensão a 0,5%), (C+) Controle positivo (1% Triton X-100). P < 0,05, P < 0,01 e P < 0,001 (\*\*\*) versus controle positivo



**Figura 9** - Avaliação hemolítica do *Patchouli* em eritrócitos do tipo O. (C<sup>-</sup>) Controle negativo (suspensão a 0,5%), (C<sup>+</sup>) Controle positivo (1% Triton X-100). P < 0,05, P < 0,01 e P < 0,001 (\*\*\*) versus controle positivo



Os óleos essenciais são produtos aromáticos de metabolismo secundário das plantas. A sua composição possui diversas propriedades farmacológicas, grande parte em função de sua volatilidade (GAUTAM et al., 2014).

O óleo essencial de *Pogostemon cablin* Benth. (Patchouli) demonstra atividades biológicas como: antimicrobiana, anti-inflamatória, antifúngica, cicatrizante, antisséptica,

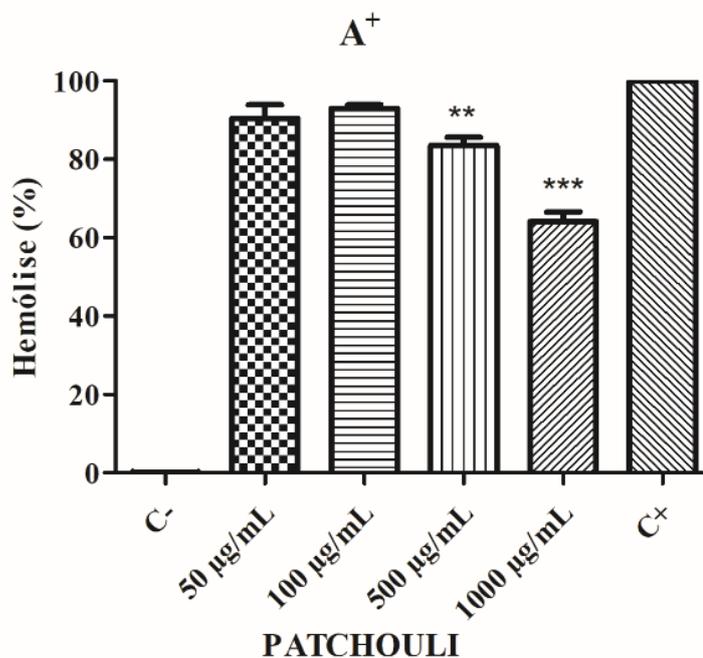
neuroprotetora, anti-influenza e anti-helmíntica (SOBRAL et al., 2014). Quimicamente este óleo essencial é caracterizado por apresentar compostos sesquiterpenos, onde o seu principal componente é o Patchouli (RAMYA et al., 2013).

Estudos *in vitro* e *in vivo* têm mostrado resultados efetivos em diferente tipo de óleos essenciais, das mais diversas espécies vegetais, contra câncer de boca, pulmão, mama, próstata, fígado, colón, cérebro e leucemias (GAUTAM et al., 2014). Segundo os resultados de Maeda (2016), o vapor do óleo essencial de *Pogostemon cablin* inibiu o crescimento de células cancerígenas.

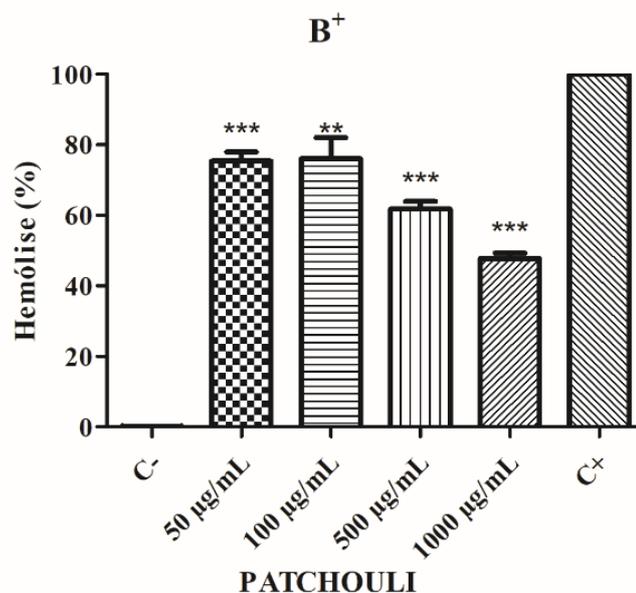
Em um segundo momento, foi realizado o teste anti-hemolítico para verificar o efeito do óleo essencial de Patchouli sobre a fragilidade osmótica dos eritrócitos. Dessa forma, pode-se observar divergência na forma de ação da substância frente aos diferentes grupos sanguíneos.

O tipo A não demonstrou potencial anti-hemolítico em nenhuma concentração avaliada. Os eritrócitos do tipo B e O obtiveram hemólise moderada variando entre o percentual de 59% a 75% nas concentrações avaliadas de 500µg/mL e 1000 µg/mL, conforme pode ser visto nas figuras 10,11 e 12.

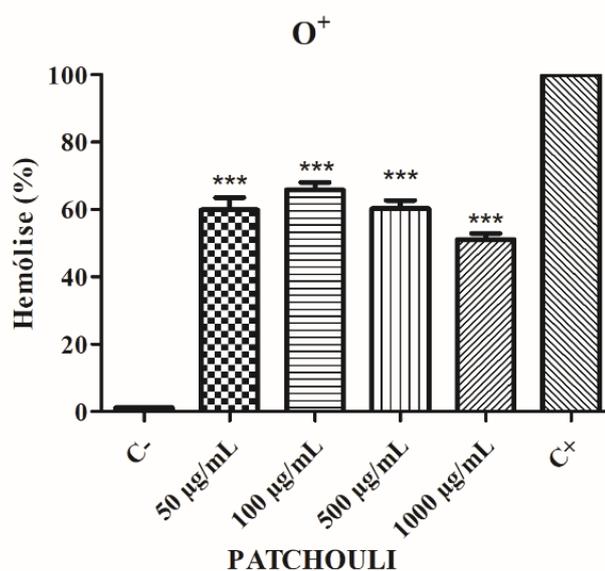
**Figura 10** - Avaliação anti-hemolítica do Patchouli em eritrócitos do tipo A. (C-) Controle negativo (suspensão a 0,5%), (C+) Controle positivo (1% Triton X-100). P < 0,05, P < 0,01 (\*\*) e P < 0,001 (\*\*\*) versus controle positivo



**Figura 11** - Avaliação anti-hemolítica do *Patchouli* em eritrócitos do tipo B. (C<sup>-</sup>) Controle negativo (suspensão a 0,5%), (C<sup>+</sup>) Controle positivo (1% Triton X-100). P < 0,05, P < 0,01 (\*\*) e P < 0,001 (\*\*\*) versus controle positivo



**Figura 12** - Avaliação anti-hemolítica do *Patchouli* em eritrócitos do tipo O. (C<sup>-</sup>) Controle negativo (suspensão a 0,5%), (C<sup>+</sup>) Controle positivo (1% Triton X-100). P < 0,05, P < 0,01 e P < 0,001 (\*\*\*) versus controle positivo



O teste anti-hemolítico é considerado um importante teste de triagem na determinação da biocompatibilidade do composto. A característica de estabilidade osmótica de uma substância atribui valor ao seu potencial de aplicação farmacológica. Uma vez que a hemólise

libera os produtos contidos no interior dos eritrócitos, levando maior susceptibilidade das células adjacentes sofrer impacto dos efeitos citotóxicos gerados por espécies reativas de oxigênio, cujo nível aumenta consideravelmente em virtude da liberação de ferro e hemoglobina (PODSIEDLIK et al., 2020).

*Conclusão*

## 6. CONCLUSÃO

Neste estudo pode-se observar que o óleo essencial de *Pogostemon cablin* Benth apresentou um efeito fungicida forte frente as cepas de *C. albicans* e *Candida parapsilosis*. E em relação a *C. albicans*, observou-se o efeito independente da ação sobre a parede celular bem como na membrana plasmática e o OE apresenta efeito sinérgico quando associado com o farmaco padrão, anfotericina B.

Considerando os resultados obtidos no estudo *in vitro* de citotoxicidade no óleo essencial de Patchouli, conclui-se que o produto de origem natural testado apresentou baixo percentual de hemólise para eritrócitos humanos do sistema ABO na concentração de 50 a 100 µg/mL. Além disso, demonstra moderado efeito anti-hemolítico nas concentrações de 500 a 1000 µg/mL para os tipos sanguíneos B e O.

Diante disso, o óleo essencial de Patchouli torna-se um possível candidato promissor para utilização de suas propriedades bioativas em fitoterápicos. Todavia são necessários estudos auxiliares como toxicidade *in vivo* e farmacológico para melhor elucidar os mecanismos de ação deste composto.

## REFERÊNCIAS

- ADAME-GALLEGOS, J.R.; ANDRADE-OCHOA, S; NEVAREZ-MOORILLON, G.V. Potential Use of Mexican Oregano Essential Oil against Parasite, Fungal and Bacterial Pathogens. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 19, p. 553-567, 25 maio 2016.
- ADHAVAN, P; KAUR, G; PRINCY, A; MURUGAN, R. Essential oil nanoemulsions of wild patchouli attenuate multi-drug resistant gram-positive, gram-negative and *Candida albicans*. **Industrial Crops Products**, v. 100, p. 106–16, 2017.
- AISYAH, Y; YUNITA, D; AMANDA, A. Antimicrobial activity of patchouli (*Pogostemon cablin* Benth) citronella (*Cymbopogon nardus*), and nutmeg (*Myristica fragrans*) essential oil and their mixtures against pathogenic and food spoilage microbes. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, 2021. 667. 012020. 10.1088/1755-1315/667/1/012020.
- ALVES M.S; DE MEDEIROS, M.A.A; PEREIRA, C.T; SIMÃO, K de LA; SIMÃO, B de LA; DINIZ, A de F; DE SOUSA, A.P; MEDEIROS, C.I.S; GUÊNES, G.M.T; SILVA, D de F; DE MEDEIROS, R.S; DOS ANJOS, R.M; DE BRITO JÚNIOR, L; LIMA, E de O; DE OLIVEIRA FILHO, A.A. Determinação da ação antifúngica do óleo de *Pogostemon cablin* (Lamiaceae) em combate a cepas de *Candida Kruse*. **International Journal of Development Research**, v. 09, p. 29640-29644, 2019.
- ANDRADE, M.A; DAS GRAÇAS CARDOSO, M; BATISTA, L.R; MALLET, A.C.T; MACHADO, S.M.F. Óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale*: composição, atividades antioxidante e antibacteriana. **Rev Ciênc Agrônômica**, v.43, p. 399–408, 2012.
- ANGADI, S.P.; VASANTHAKUMAR, T. Patchouli. *In: Advances in Horticulture: Medicinal and Aromatic Plants*. Malhotra Publishing House: Reprint, v. 11, 1995.
- ARAGÃO Neto, H. D. C; DE SOUSA, A. P; DE MEDEIROS, M. A. A; DE SOUZA ALVES, M; DE ALMEIDA, R. N; DE OLIVEIRA FILHO, A. A. Avaliação da citotoxicidade do ácido 3-cumarino carboxílico em eritrócitos humanos. **Research, Society and Development**, v. 11, 2022, e31711729965-e31711729965.
- ATTENE-RAMOS, Matias S Attene-Ramos; MILLER, Nicole; HUANG, Ruili Huang; MICHAEL, Sam; ITKIN, Misha; KAVLOCK, Robert J; AUSTIN, Christopher P Austin; SHINN, Paul; SIMEONOV, Anton; TICE, Raymond R; XIA, Menghang. The Tox21 robotic platform for the assessment of environmental chemicals--from vision to reality. **Drug Discov Today**, v. 18, n. 15-16, 12 ago. 2013.

- BARBIERI, C; BORSOTTO, P. Essential Oils: Market and Legislation: Potential of Essential Oils. *In: ESSENTIAL Oils: Market and Legislation*. London: IntechOpen: Hany El-Shemy, 2018.
- BARBOSA-FILHO, J.M; NASCIMENTO JUNIOR, F.A do, TOMAZ, A. C de A; ATHAYDE-FILHO, P.F de; SILVA, M.S da; CUNHA, E.V. et al. Natural products with antileprotic activity. **Rev Bras Farmacogn**, v. 17, p. 141-148, 2007.
- BASER, K.H.C.; BUCHBAUER, G. **Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications**; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2015.
- BAŞER, K.H.C; DEMIRCI, F. Chemistry of essential oils. In: Berger R.G., editor **Flavours and Fragrances: Chemistry, Bioprocessing and Sustainability**. Springer; New York, NY, USA p. 43–86, 2007.
- BOHME, K., BARROS-VELÁZQUEZ, J., CALO-MATA P., AUBOURG S. P. Antibacterial, antiviral, and antifungal activity of essential oils: mechanisms and applications, **Antimicrobial Compound**. *Curr. Strateg. New Altern.*, eds Villa T. G., Veiga-Crespo P. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, p. 51–81, 2014.
- CALDERONE, Richard A.; CLANCY, Cornelius J. (Ed.). **Candida and candidiasis**. American Society for Microbiology Press, 2011.
- CAMPOS, S.C.; SILVA, C.G.; CAMPANA, P.R.V.; ALMEIDA, V.L. Toxicidade de espécies vegetais. **Rev. bras. plantas med**, v. 18, n. 1, 2016.
- CARY, D.C.; PETERLIN, B.M. Natural Products and HIV/AIDS. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 34 p. 31-38, jan 2018. doi:10.1089/AID.2017.0232.
- CAVALCANTE, J.N.M; SIQUEIRA, D.S; FERREIRA, J.L.S; BEZERRA, R.V; DELGADO, LA, SILVA, R.C.M.O; FIGUEIRA, R.C; SILVA, D.F; DE OLIVEIRA, HMBF; LIMA, E.O; DE OLIVEIRA FILHO, AA. Antifungal Activity of the Essential Oil of *Pogostemon cablin* (Lamiaceae) against *Candida tropicalis* Strains. **International journal pharmacy and pharmaceutical research**, v. 13, 2018.
- CHEN, Y; WU, Y; XU, Y; ZHANG, J; SONG, X; ZHU, G; HU, X. Dynamic accumulation of sesquiterpenes in essential oil of *Pogostemon cablin*. **Rev. Bras. Farmacogn**, v. 24(6) p. 626–634, 2014. doi: 10.1016/j.bjp.2014.11.001
- CHIKEZIE, P.C; IBEGBULEM, C.O; MBAGWU, F.N. Bioactive Principles from Medicinal Plants. **Research Journal of Phytochemistry**, v. 9, p. 88-115, 2015.
- CHOWDHARY, A; SHARMA, C; MEIS, J.F. Candida auris: A rapidly emerging cause of hospital-acquired multidrug-resistant fungal infections globally. **PLoS Pathog**, v. 13, 2017. e1006290.

- CLELAND, R.; SQUIRES, E. Evaluation of new antimicrobials “*in vitro*” and in experimental animal infections. In: LORIAN, V. M. D. **Antibiotics in Laboratory Medicine**. Willians & Wilkins, p. 739-788, 1991.
- COUTINHO, H. D. M.; COSTA, J. G. M; LIMA, E. O.; FALCÃO-SILVA, V. S.; SIQUEIRA-JÚNIOR J. P. Enhancement of the antibiotic activity against a multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and chlorpromazine. **Chemotherapy**, v. 54, p. 328–330, 2008.
- CRAGG, G.M; NEWMAN, D.J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochim Biophys Acta**, v. 1830(6) p.3670-95, 2013 Jun. doi: 10.1016/j.bbagen.2013.02.008.
- DACIE, J. V; LEWIS, S. M. Practical Haematology. Harcourt Publishers Limited, 9th Editio, p. 444–451, 2001.
- D'AGOSTINO, M., TESSE, N., FRIPPIAT, J.P., MACHOUART, M., DEBOURGOGNE, A. Essential Oils and Their Natural Active Compounds Presenting Antifungal Properties. **Molecules**. v. 24, n. 20, p. 3713, 2019. doi: 10.3390/molecules24203713. PMID: 31619024; PMCID: PMC6832927
- DAVY BERNARDINO, Magazine. Aromas do Cumbuco: aromas dos orixás que transformam a sua vida. In: **Aromas do Cumbuco**: aromas dos orixás que transformam a sua vida. 2 dez. 2016. Disponível em: <http://aromasdocumbuco.blogspot.com/2016/12/tipos-de-destilacao-para-obtencao-de.html>. Acesso em: 23 jun. 2022.
- DHIFI, W; BELLILI, S; JAZI, S; BAHLOUL, N; MNIF, W. Essential Oils' Chemical Characterization and Investigation of Some Biological Activities: A Critical Review. **Medicines (Basel)** v. 3, n. 4, p. 1-16, 2016. doi: 10.3390/medicines3040025. PMID: 28930135; PMCID: PMC5456241.
- DIMA, C; DIMA, Stefan. Essential oils in foods: extraction, stabilization, and toxicity. **Current Opinion in Food Science**, v. 5, p. 29-35, 2015.
- DONELIAN, A; CARLSON, L; LOPES, T; MACHADO, R. Comparison of extraction of patchouli (*Pogostemon cablin*) essential oil with supercritical CO<sub>2</sub> and by steam distillation. **J. Supercrit. Fluids**. v. 48, n. 1, p. 15-20, 2009. doi: 10.1016/j.supflu.2008.09.020.
- DO TERRA. **Óleo Essencial de Patchouli do TERRA**. Do TERRA consultor de bem estar. Disponível em:< <https://viveroleoessencial.com.br/produto/oleo-essencial-de-patchouli-3/>>. Acesso em: 18 set 2022.
- EFFERTH, T; KAINA, B. Toxicities by herbal medicines with emphasis to traditional Chinese medicine. **Current Drug Metabolism**, v.12, n.10, p.989-96, 2011.

- EKOR, M. The growing use of herbal medicines: issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety. **Front Pharmacol**, v. 4, p. 177, 2014. doi: 10.3389/fphar.2013.00177.
- ELIOPOULOS, G.M; MOELLERING, R.C. Antimicrobial combinations, In: **Antibiotics in laboratory medicine**. Baltimore: Williams & Wikins. p. 434–441, 1991.
- ERTLI, A.A; AGKATSEV, T.V; KOZHEVNIKOV, S.F; ALBEGOV, E.A. Treatment of newly detected destructive pulmonary tuberculosis with antibacterial preparations by the maximum concentration limit method. **Probl Tuberk**, n. 5, p. 46-48, 1980.
- ESCALANTE, A; GATTUSO, M; PÉREZ, P.; ZACCHINO, S. Evidence for the mechanism of action of the antifungal phytolaccoside B isolated from *Phytolacca tetramera* Hauman. **Journal of Natural Products**, v. 71, p. 1720-1725, 2008.
- FARIA, N.C; KIM, J.H; GONÇALVES, L.A; MARTINS, M.DEL; CHAN, K.L; CAMPBELL, B.C. Enhanced activity of antifungal drugs using natural phenolics against yeast strains of *Candida* and *Cryptococcus*. **Lett Appl Microbiol**, v. 54, n. 6, p. 487-493, 2012. doi: 10.1111/j.1472-765X.2011.03032. x. Epub 2011 Mar 14. PMID: 21332761.
- FARZAEI, Mohammad Hosein; BAYRAMI, Zahra; FARZAEI, Fatemeh; ANEVA, Ina; DAS, Swagat Kumar; PATRA, Jayanta Kumar; DAS, Gitishree; ABDOLLAHI, Mohammad. Poisoning by Medical Plants. **Arch Iran Med**, v. 23, n. 2, feb 2020.
- FLUIT A.C; VISSER M.R; SCHMITZ F.J. Molecular detection of antimicrobial resistance. **Clin Microbiol Ver**, v 4, n 4, p. 836-71, 2001. table of contents. doi: 10.1128/CMR.14.4.836-871.2001. PMID: 11585788; PMCID: PMC89006.
- FRANZ, C; NOVAK, J. 3 Sources of essential oils. In: Baser K.H.C., Buchbauer G., editors. **Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications**. CRC Press; Boca Raton, FL, USA: p. 39–82, 2015.
- FROBERG, B; IBRAHIM, D; FURBEE, R.B. Plant poisoning. **Emerg Med Clin North Am**, v. 25, n. 2, p. 375-433, 2007.
- FROS, J.J; LIU, W.J; PROW, N.A; GEERTSEMA, C; LIGTENBERG, M; VANLANDINGHAM, D.L; SCHNETTLER, E; VLAK, J.M; SUHRBIER, A; KHROMYKH, A.A; et al. A proteína não estrutural 2 do vírus Chikungunya inibe a sinalização JAK-STAT estimulada por interferon tipo I/II. **J. Virol**, v. 84, p. 10877-10887. 2010.doi: 10.1128/JVI.00949-10.
- FROST, D.J; BRANDT, K.D; CUGIER, D; GOLDMAN, R. A whole-cell *Candida albicans* assay for the detection of inhibitors towards fungal cell wall synthesis and assembly. **The Journal of Antibiotics**, v. 28, p. 306-309, 1995.

FU, Y; ZU, Y; CHEN, L; SHI, X; WANG, Z; SUN, S. Efferth T. Antimicrobial activity of clove and rosemary essential oils alone and in combination. **Phytother Res**, v. 21, n. 10, p. 989-994, 2007.doi: 10.1002/ptr.2179. PMID: 17562569.

GAUTAM, N.; MANTHA, A.K.; MITTAL, S. Essential Oils and Their Constituents as Anticancer Agents: A Mechanistic View. **BioMed Research International**, INCA, v. 2014, 2014.

GROOT, A.C de; SCHMIDT, E. Essential Oils, Part I: Introduction. **Dermatitis: Contact, Atopic, Occupational, Drug**. v. 27, n. 2, p. 39-42, 2016. DOI: 10.1097/der.0000000000000175. PMID: 26983089.

GROSSO, F; JONES, R.L.; DEMETRI, G.D.; JUDSON, I.R.; BLAY, J.Y; CESNE, A.L; SANFILIPPO, R; CASIERI, P; COLLINI, P; DILEO, P; SPREAFICO, C; STACCHIOTTI, S; TAMBORINI, E; TERCERO, J.C; JIMENO, J; D'INCALCI, M; GRONCHI, A; FLETCHER, J.A; CASALI, P.G.; PILOTTI, S. Efficacy of trabectedin (ecteinascidin-743) in advanced pretreated myxoid liposarcomas: a retrospective study. **The Lancet Oncology**, v. 8, n. 8, p. 595-602, JUL 2007.

HADACEK, F; GREGER, H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. **Phytochemical Analyses**, v. 11, p. 137-147, 2000.

HAFIDH, R; ABDULAMIR, A; VERN, L; BAKAR, F; ABAS, F; JAHANSHIRI, F, et al. Inhibition of growth of highly resistant bacterial and fungal pathogens by a natural product. **Open Microbiol J**, v. 5, p. 96, 2011.

HARE R: Nova luz sobre a história da penicilina. **Med Hist**, v. 26, p. 1–24, 1982.

HARTUNG, T. Food for thought ... on alternative methods for chemical safety testing. **ALTEX - Alternatives to animal experimentation**, v. 27, n. 1, p. 3–14, 2010.

HOLETZ, F.B.; HOMES, M. J.; LEE, C. C.; STEVENTON, G. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002.

HOUGHTON, P. J.; HOWES, M. J.; LEE, C. C.; STEVENTON, G. Uses and abuses of *in vitro* tests in ethnopharmacology: visualizing an elephant. **Journal of Ethnopharmacology**, v.110, p.391-400, 2007.

HOKKEN, M.W.J.; ZWAAN, B.J.; MELCHERS, W.J.G.; VERWEIJ, P.E. Facilitators of adaptation and antifungal resistance mechanisms in clinically relevant fungi. **Fungal Genetics and Biology**, v. 132, p. 103254, 1 nov. 2019.

- HUANG, X.M.; YANG, Z.J.; XIE, Q; ZHANG, Z. K.; ZHANG, H; MA, J. Y. Natural products for treating colorectal cancer: A mechanistic review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 117, p. 109142, 2019.
- HUSSEIN, KH; PARK, K.M; KANG, K.S; WOO, H.M. Biocompatibility evaluation of tissue-engineered decellularized scaffolds for biomedical application. **Materials Science and Engineering C**, v. 67, p. 766-778, 2016.
- International standard: Biological Evaluation of Medical Devices – Part 5: Tests for Cytotoxicity: in vitro methods. ISO 10993-5, 1992
- JHA, V; GARCIA-GARCIA, G; ISEKI, K; LI, Z; NAICKER, S; PLATTNER, B; SARAN, R; MOON-YEE, A. W; YANG, C.W. Chronic kidney disease: global dimension and perspectives. **Lancet**. v. 382 n. 9888 p. 260-72, 2013. doi: 10.1016/ S0140-6736(13)60687-X
- JUNREN, C; XIAOFANG, X; MENGTING, L; QIUYUN, X; GANGMIN, L; HUIQIONG, Z; GUANRU, C; XIN, X; YANPENG, Y; FU, P; CHENG, P. Pharmacological activities and mechanisms of action of *Pogostemon cablin* Benth: a review. **Chin Med**, v. 16, n. 1, p. 1-20, 2021. doi: 10.1186/s13020-020-00413-y. PMID: 33413544; PMCID: PMC7791836.
- JUTTE, R; HEINRICH, M; HELMSTADTER, A; LANGHORST, J; MENG, G; NIEBLING, W; POMMERENING, T; TRAMPISCH, H.J. Herbal medicinal products - Evidence and tradition from a historical perspective. **J Ethnopharmacol**, v. 213, p. 92-100, 2018. doi: 10.1016/j.jep.2017.06.047.
- KAHAN, Barry D. Cyclosporine. **N Engl J Med**, v. 321, n. 1725-38, ed. 25, dec 1989.
- KOCEVSKI, D; DU, M; KAN, J; JING, C; LACANIN, I; PAVLOVIC, H. Antifungal effect of *Allium tuberosum*, *Cinnamomum cassia*, and *Pogostemon cablin* essential oils and their components against population of *Aspergillus* species. **J. Food Sci**, v. 78, n. 5, p. 731-737, 2013. doi: 10.1111/1750-3841.12118.
- KOEHN, F.E; CARTER, G.T. A evolução do papel dos produtos naturais na descoberta de medicamentos. **Nat. Rev. Droga. Descobrir**, v. 4 p. 206-220, 2005 doi: 10.1038/nrd1657.
- KONEMAN, E.W; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M; SCHRECKENBERGER, P.C; WIN, W.C; **J. Diagnóstico Microbiológico**. 6 ed. São Paulo: Médica e Científica Ltda, 2008. p. 1565.
- LANIADO-LABORÍN, R; CABRALES-VARGAS, M.N. Anfotericina B: efeitos colaterais e toxicidade Anfotericina B: efeitos adversos e toxicidade. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 26, ed. 4, p. 223-227, 2009.
- LEE, H.S.; LEE, J; SMOLENSKY, D; LEE, S. H. Potential benefits of patchouli alcohol in prevention of human diseases: A mechanistic review. **Elsevier Public Health Emergency Collection**, v. 89, n. 107056, 8 out. 2020.

- LEE, Y; PUUMALA, E; ROBBINS, N; COWEN, L.E. Antifungal Drug Resistance: Molecular Mechanisms in *Candida albicans* and Beyond. **Chem Rev**, v. 121, n. 6, p. 3390-3411, 2020. doi: 10.1021/acs.chemrev.0c00199. Epub 2020 May 22. PMID: 32441527; PMCID: PMC8519031.
- LEE, H.S; KIM, Y. Antifungal activity of *Salvia miltiorrhiza* against *Candida albicans* is associated with the alteration of membrane permeability and (1,3)- $\beta$ -d-glucan synthase activity. **J Microbiol Biotechnol**, v. 26, n. 3, p. 610-617, 2016.
- LENARDÃO, E.J.; SAVEGNAGO, L; JACOB, R.G; VICTORIA, F.N; MARTINEZ, D.M. Ntinociceptive Effect of Essential Oils and Their Constituents: an Update Review. **J. Braz. Chem. Soc**, v. 27, p. 435-474, 2016.
- LEWIS, R.E; DIEKEMA, D.J; MESSER, A.S; PFALLER, M.A; KLEPSE, M.E. Comparison of E-test, chequerboard dilution and time–kill studies for the detection of synergy or antagonism between antifungal agents tested against *Candida* species. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 49, p. 345–351, 2002.
- LEWIS, R.E. Conceitos atuais em farmacologia antifúngica. In: **Anais da Clínica Mayo. Elsevier**, p. 805-817, 2011.
- LEYVA-LÓPEZ, N; GUTIÉRREZ-GRIJALVA, E.P; VAZQUEZ-OLIVO, G; HEREDIA, J.B. Essential Oils of Oregano: Biological Activity beyond Their Antimicrobial Properties. **Molecules**, v. 22, n. 6, p. 989, 2017. doi: 10.3390/molecules22060989. PMID: 28613267; PMCID: PMC6152729
- LIU, Y; LIU, W; PENG, Q.X; PENG, J.L; YU, L.Y; HU, J.L. Protective effect of huoxiang zhengqi oral liquid on intestinal mucosal mechanical barrier of rats with postinfectious irritable bowel syndrome induced by acetic Acid. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2014, n. 218383, 2014.
- MA, L; YAO, L. Antiviral Effects of Plant-Derived Essential Oils and Their Components: An Updated Review. **Molecules**, v. 25, n. 11, p. 2627, 2020. doi: 10.3390/molecules25112627. PMID: 32516954; PMCID: PMC7321257
- MACHADO, H.L.; MOURA, V.L.; GOUVEIA, N.M.; COSTA, G.A.; ESPINDOLA, F S.; BOTELHO, F.V. Pesquisa e atividades de extensão em fitoterapia desenvolvidas pela Rede FitoCerrado: uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos por idosos em Uberlândia-MG. **Rev. bras. plantas med.** v. 16, ed. 3, 2014.
- MAEDA, L.E. AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DA FASE VAPOR DO ÓLEO ESSENCIAL de *Pogostemon cablin* Benth. EM CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA DE

- PULMÃO - CALU-3. Trabalho de Conclusão de Curso apresentado para obtenção do título de Bacharel em Farmácia na Universidade Estadual de Ponta Grossa; p.1-47, 2016.
- MANOJ, G; MANOHAR, S.H; MURTHY, H.N. Chemical constituents, antioxidant and antimicrobial activity of essential oil of *Pogostemon paniculatus* (Willd.). **Nat. Prod. Res**, v. 26, n. 22, p. 2152-2154, 2012. doi: 10.1080/14786419.2011.633082.
- MARKOWICZ- PIASECKA, M; HUTTUNEN, K. M; MIKICIUK- OLASIK, E; SIKORA, J. Biocompatible sulfenamide and sulfonamide derivatives of metformin can exert beneficial effects on plasma haemostasis. **Chemico-Biological Interactions**, v. 280, p. 15-27, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2017.12.005>
- MISHRA, A M; FORCHE, A.; ANDERSON, M.Z. Parasexuality of *Candida* Species. **Front Cell Infect Microbiol**, [s. l.], v. 11, n. 796929, 13 dez. 2021.
- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS-NCCLS. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. 7 ed. Villanova. PA: NCCLS, 2000.
- NAZZARO, F; FRATIANNI, F; COPPOLA, R., FEO, V.D. Essential Oils and Antifungal Activity. **Pharmaceuticals**, v. 10, n. 4, p. 86, 2017.
- NAZZARO, F; FRATIANNI, F; De MARTINO, L; COPPOLA R; De FEO V. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. **Pharmaceuticals (Basel)**, v. 6, n. 12, p. 1451-1474, 2013. doi: 10.3390/ph6121451. PMID: 24287491; PMCID: PMC3873673.
- NCUBE, N. S.; AFOLAYAN A. J.; OKOH A. I. Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: current methods and future trends. **African Journal of Biotechnology**, v.7, n. 12, p. 1797-1806, 2008.
- OLASEHINDE, G.I.; AYANDA, O.I.; EGWARI, L.O.; AJAYI, A.A.; AWOFOESO, T. In vivo Antiplasmodial Activity of Crude Ethanolic and N-hexane Extracts of *Moringa oleifera* Leaves. **International journal of agriculture & biology**, [s. l.], v. 18, n. 906–910, nov 2016.
- OLIVEIRA, A.F.C.S; TEIXEIRA, R.R; DE OLIVEIRA, A.S; DE SOUZA, A.P.M; SILVA, M.L; PAULA, S.O. Potential Antivirals: Natural Products Targeting Replication Enzymes of Dengue and Chikungunya Viruses. **Molecules**, [s. l.], v. 22, n. 505, ed. 3, 22 mar. 2017.
- OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M.E.L.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana de determinação de concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008.
- PEDROSO, R. S.; ANDRADE, G; PIRES, R.H. Plantas medicinais: uma abordagem sobre o uso seguro e racional. **Physis: Revista de Saúde Coletiva**, v. 31, ed. 02, 16 jul. 2021.

PHAM, J.V; YILMA, M.A; FELIZ, A; MAJID, M.T; MAFFETONE, N; WALKER, J.R; KIM, E; CHO, J.H.; REYNOLDS, M.J.; SONG, C. M.; PARK, R. S.; YOON, Y.J. A Review of the Microbial Production of Bioactive Natural Products and Biologics. **Frontiers in microbiology**, v. 10, ed. 1404, 2019.

PERFECT, J.R. The antifungal pipeline: a reality check. **Nat Rev Drug Discov**, v. 16, n. 9, p. 603-616, 1 set. 2017.

PIMENTA, E.; DA CRUZ, R; DINIZ-NETO, H; SILVA, D; DE OLIVEIRA, H; BUCCINI, D; LIMA, E; DE OLIVEIRA FILHO, A. Avaliação da atividade antifúngica do óleo essencial de *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth. (Lamiaceae) contra cepas de *Candida glabrata*. **Scientia Plena**, [s. l.], v. 15, ed. 6, 12 jul. 2019.

PITHON, M.M; SANTOS, R.L; RIBEIRO, D.L.R; FREITAS, L.M.A; SOUZA, R.A; MARTINS, F.O; ROMANOS, M.T.V. Avaliação in vitro da citotoxicidade de enxaguatórios bucais Listerine®. **Revista de Cirurgia e Traumatologia Buco-maxilo-facial**, v. 11, n. 4, p. 83-88, 2011.

POFDIEDLIK, M; MARKOWICZ-PIASECKA, M; SIKORA, J. Erythrocytes as model cells for biocompatibility assessment, cytotoxicity screening of xenobiotics and drug delivery. **Chemico-Biological Interactions**, v. 332 p. 109305. 2020 <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2020.109305>

PRAKASH, O; JOSHI, S; SHUKLA, A. Pant A. Sesquiterpenoid rich essential oil from the leaves of *Pogostemon patchouli* pellet grown organically under tarai conditions. **J. Essent. Oil-Bear. Plants**. v. 10, n. 2, p. 157-161, 2007. doi: 10.1080/0972060X.2007.10643535.

RAMMELKAMP, C.H; KEEFER, C.S. PENICILLIN: Its antibacterial effect in whole blood and serum for the hemolytic streptococcus and staphylococcus aureus. **J Clin Invest**, [s. l.], v. 22, n. 649–657, ed. 5, sep 1943.

RAMSEY, J T.; SHROPSHIRE, B C.; NAGY, T. R; CHAMBERS, K. D; LI, Yin; KORACH, K. S. Essential Oils and Health. **Yale J Biol Med**, [s. l.], v. 93, ed. 2, 29 jun. 2020.

RAMYA, H.G. et al. An introduction to patchouli (*Pogostemon cablin* Benth.) – A medicinal and aromatic plant: It's importance to mankind. Agricultural Engineering International: **CIGR Journal**, v. 15, n. 2, p. 243-250, 2013.

RANGEL, M; MALPEZZI, E. L. A; SUSINI, S. M. M; DE FREITAS, J. Hemolytic activity in extracts of the diatom *Nitzschia*. **Toxicon**, v. 35, n. 2, p. 305-309, 1997.

RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v.39, p.603-13, 2001.

RODRIGUEZ-GARCIA, I; SILVA-ESPINOZA, BA; ORTEGA-RAMIREZ, L A; LEYVA, J M; SIDDIQUI, M W; CRUZ-VALENZUELA, M R; GONZALEZ-AGUILAR, G A; AYALA-

ZAVALA, J F. Oregano Essential Oil as an Antimicrobial and Antioxidant Additive in Food Products. **Crit Rev Food Sci Nutr**, [s. l.], v. 56, n. 10, p. 1717-1727, 26 jul. 2016.

REVIE N.M; IYER K.R; ROBBINS N; COWEN L.E. Antifungal drug resistance: evolution, mechanisms and impact. *Curr Opin Microbiol*, v. 45, p. 70-76, Oct 2018. doi: 10.1016/j.mib.2018.02.005. Epub 2018 Mar 13. PMID: 29547801; PMCID: PMC6135714.

ROBBINS N; CAPLAN T; COWEN L.E. Molecular Evolution of Antifungal Drug Resistance. **Annu Rev Microbiol**, v. 8, n. 71, p. 753-775, Sep 2017. doi: 10.1146/annurev-micro-030117-020345. PMID: 28886681.

ROSENSON, R.S; TANGNEY, C.C. Antiatherothrombotic Properties of Statins: Implications for Cardiovascular Event Reduction. **Jama**. v. 279, n. 1, p. 6432650, 1998.

SÁNCHEZ-TORRES, P. Molecular Mechanisms Underlying Fungicide Resistance in Citrus Postharvest Green Mold. **J Fungi (Basel)**, v. 7, n. 9, p. 783, 2021. doi: 10.3390/jof7090783. PMID: 34575821; PMCID: PMC8471628.

SARTORATTO, A.; MACHADO, A. L. M.; DELARMELENA, C.; FIGUEIRA, G. M.; DUARTE, M.C.T; REHDER, V.L.G. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 275-280, 2004.

SHAHIN, S.M; JALEEL, A; ALYAFEI, M.A.M. The Essential Oil-Bearing Plants in the United Arab Emirates (UAE): An Overview. **Molecules**, v. 26, n. 21, p. 6486, 2021. doi: 10.3390/molecules26216486. PMID: 34770890; PMCID: PMC8587291.

SHARMEEN, J.B; MAHOMOODALLY, F.M; ZENGIN, G; MAGGI, F. Essential Oils as Natural Sources of Fragrance Compounds for Cosmetics and Cosmeceuticals. **Molecules**, v. 26, n. 3, p. 666, 2021. doi: 10.3390/molecules26030666. PMID: 33514008; PMCID: PMC7865210.

SILVA, B.D da; BERNARDES P.C; PINHEIRO P.F; FANTUZZI, E; ROBERTO, C.D. Chemical composition, extraction sources and action mechanisms of essential oils: Natural preservative and limitations of use in meat products. **Meat Sci**, v. 176, p. 108463, 2021. doi: 10.1016/j.meatsci.2021.108463.

SINGH, D. K; TÓTH, R.; GÁCSEER, A. Mechanisms of Pathogenic *Candida* Species to Evade the Host Complement Attack. **Front Cell Infect Microbiol**, [s. l.], v. 10, ed. 94, 12 mar. 2020.

SINGH, M; SHARMA, S; RAMESH, S. Herbage, oil yield and oil quality of patchouli [*Pogostemon cablin* (Blanco) Benth.] influenced by irrigation, organic mulch and nitrogen

application in semi-arid tropical climate. **Ind. Crop. Prod.**, v. 16, n. 2, p. 101-107, 2002. doi: 10.1016/S0926-6690(02)00013-4.

SINGH, PK, TACK, BF; MACCRAY, PB Jr; WELSH, MJ. Synergistic and additive killing by antimicrobial factors found in human airway surface liquid. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 279, p. 799-805, 2000. doi: 10.1152/ajplung.2000.279.5.L799. PMID: 11053013.

SOBRAL, M.V. et al. Antitumor Activity of Monoterpenes Found in Essential Oils. **The Scientific World Journal**, v. 2014, p. 1-35, 2014.

SOUSA, A.P; FERREIRA, M.D.L; FERNANDES, D.A; CORDEIRO, L.V; SOUZA, M. F.V; PESSOA, H.L.F; OLIVEIRA, A.A.; Sá, R.C. S. In silico, in vitro and ex-vivo Toxicological Profiling of 5,7,4'-Trihydroxyflavone-8 -C- $\beta$ -Glucopyranoside - *Vitexin*. **Revista de Ciências Farmacêutica Básica e Aplicadas - RCFBA**, 42, 2021. <https://doi.org/10.4322/2179-443X.0709>

SU, X.Z; MILLER, L.H. The discovery of artemisinin and the Nobel Prize in Physiology or Medicine. **Sci China Life Sci.** v. 58(11) p. 1175-1179, nov 2015. doi: 10.1007/s11427-015-4948-7. PMID: 26481135; PMCID: PMC4966551.

SWAMY, M.K; SINNIHAH, U.R. A Comprehensive Review on the Phytochemical Constituents and Pharmacological Activities of *Pogostemon cablin* Benth.: An Aromatic Medicinal Plant of Industrial Importance. **Molecules**, [s. l.], v. 20, ed. 5, 12 maio 2015. doi: 10.3390/moléculas20058521.

TOLOSA, L; DONATO, T; GOMEZ-LECHON, M.J. General cytotoxicity assessment by means of the MTT assay. **Methods in molecular biology**. 2015. DOI: 10.1007/978-1-4939-2074-7\_26.

UGBOKO, H.U.; NWINYI, O.C.; ORANUSI, S.U.; FATOKI, T.H.; OMONHINMIN, C.A. Antimicrobial Importance of Medicinal Plants in Nigeria. **Physis: Revista de Saúde Coletiva**, [s. l.], v. 2020, 22 set. 2020.

UZODIMMA, Durugbo Ernest. Medico-Ethnobotanical inventory of Ogi, Okigwe Imo State, South Eastern Nigeria - I. **Global Advanced Research Journal of Medicinal Plants**, [s. l.], v. 2, n. 030-044, ed. 2, nov 2013.

VERMA, R.J; RAVAL, P.J. **Bull. Environ. Contam. Toxicol**, v. 47, n. 3, p. 428-432, 1991.

VERMA, R.S; PADALIA, R.C; CHAUHAN, A; SINGH V.R. Chemical composition of leaves, inflorescence, whole aerial-parts and root essential oils of patchouli (*Pogostemon cablin* (Blanco) Benth.). **J. Essent. Oil Res**, v. 31, n. 4, p. 319-325, 2019. doi: 10.1080/10412905.2019.1566100

WANG, D.H; YIN, Z.Q; ZHANG, Q.W; YE, W.C; ZHANG, X.Q; ZHANG, J. Constituintes químicos não voláteis de *Pogostemon cablin*. **China J Chin Matéria Médica**, v.35, n.20, p. 2704-2707, 2010.

WANG, G.S; Deng J.H; Ma, Y.H; Shi, M; Li B. Mechanisms, clinically curative effects, and antifungal activities of cinnamon oil and *pogostemon* oil complex against three species of *Candida*. **J Tradit Chin Med**, v. 32, n. 1, p. 19-24, 2012.

XIE, J.H; CHAI, T.T; XU, R; LIU, D; YANG, Y.X; DENG, Z.C; JIN, H; HE, H. Induction of defense-related enzymes in patchouli inoculated with virulent *Ralstonia solanacearum*. **Electron J Biotechnol**. v. 27, p. 63–69, 2017.

ZACCHINO, S. Estratégias para a descoberta de novos agentes antifúngicos. In: Plantas medicinais sob a ótica da moderna química medicinal. Chapecó: Argos, 2001.

ZHANG, Hong-Jie; RUMSCHLAG-BOOMS, E; GUAN, Yi-Fu; WANG, Dong-Ying; LIU, Kang-Lun; LI, Wan-Fei; NGUYEN, V.H; CUONG, N.M; SOEJARTO, Djaja D; FONG, H.H.S; RONG, L. Potent Inhibitor of Drug-Resistant HIV-1 Strains Identified from the Medicinal Plant *Justicia gendarussa*. **J Nat Prod**, [s. l.], v. 80, n. 1798-1807, ed. 6, jun 2017.

ZHANG, L.L; HU, X.Y; WU, H; CHEN, Y; CHEN, J.Y; WANG, Q.T; N P WANG, N.P; WEI, W. Paeoniflorin suppresses inflammatory mediator production and regulates G protein-coupled signaling in fibroblast-like synoviocytes of collagen induced arthritic rats. **Inflamm Res**, [s. l.], v. 57, n. 388-95, ed. 8, aug 2008.

ZHANG, Q; LI, J; MIDDLETON, A; BHATTACHARYA, S; CONOLLY, B. Bridging the Data Gap From in vitro Toxicity Testing to Chemical Safety Assessment Through Computational Modeling. **Front Public Health**, [s. l.], v. 6, ed. 261, 11 set. 2018.

ZHENG, Q; GUAN, G; CAO, C; LI, Qi; HG. The PHO pathway regulates white-opaque switching and sexual mating in the human fungal pathogen *Candida albicans*. **Curr Genet**, [s. l.], v. 66, n. 1155-1162, ed. 6, DEC 2020.doi: 10.1007/s00294-020-01100-z.

ZHOU, Y. X.; GONG, X. H.; ZHANG, H; PENG, C. A review on the pharmacokinetics of paeoniflorin and its anti-inflammatory and immunomodulatory effects. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [s. l.], v. 130, n. 110505, oct 2020.

ZHOU, Q.M; CHEN, M.H; LI, X.H; PENG, C; LIN, DS. LI, XN; HE Y; XIONG, L. Absolute Configurations and Bioactivities of Guaiane-Type Sesquiterpenoids Isolated from *Pogostemon cablin*. **J Nat Prod**, v. 81, n. 9, p. 1919-1927, 2018.doi: 10.1021/acs.jnatprod.7b00690. Epub 2018 Sep 6. PMID: 30188125.

ZHU, B.C; HENDERSON, G; YU, Y; LAINE, R.A. Toxicity and repellency of patchouli oil and patchouli alcohol against Formosan subterranean termites *Coptotermes formosanus* Shiraki

(Isoptera: Rhinotermitidae). **J. Agr. Food Chem**, v. 51, n. 16, p. 4585-4588, 2003.  
doi: 10.1021/jf0301495.

ZUZARTE, M; SALGUEIRO, L. Essential oils chemistry. In: De Sousa D.P., editor. *Bioactive Essential Oils and Cancer*. Springer International Publishing; Cham, Switzerland: p. 19–61, 2015.

*ANEXOS*

## Acceptance Certificate

*Date:* 21-Dec-2022  
*Manuscript Number* JMPR/11.07.22/7257  
*Manuscript Title:* *Bioprospecting of the antifungal activity of Patchouli essential oil (Pogostemon cablin Benth) against strains of the genus Candida*  
*Corresponding Author:* Oliveira Filho Abrahao Alves

*Corresponding Author  
Email* [abrahao.farm@gmail.com](mailto:abrahao.farm@gmail.com)

*Author(s):* DONATO DA CUNHA SARAGHINA MARIA ALVES CESAR  
AUGUSTO MENDES RIBEIRO LEILA SANTOS MACEDO  
MARCELLA ALMEIDA SOARES DA SILVA ALANNA LYVIA  
NUNES FRANCISCO CUNHA SILVA LEITE DE LIMA BRUNA  
VIEIRA SILVA DANIELE DE FIGUEIREDO LIMA EDELTRUDES  
DE OLIVEIRA OLIVEIRA FILHO ABRAHAO ALVES

*Date Accepted:* 30-Sep-2022



---

### NOTICE

---

In the event of general queries relating to this document please email your enquiry to the below address

[helpdesk@academicjournals.org](mailto:helpdesk@academicjournals.org)