

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

**POTENCIAL BIOATIVO DOS EXTRATOS DE *Eugenia luschnathiana*
(PITOMBA-DA-BAHIA): PERFIL FITOQUÍMICO, ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E
AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE**

Palloma Christine Queiroga Gomes da Costa

SAPIENTIA AEDIFICAT

2024

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA SETORIAL DO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

BIBLIOTECÁRIO:

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

C838p Costa, Palloma Christine Queiroga Gomes da.
Potencial bioativo dos extratos de *Eugenia
luschnathiana* (pitomba-da-bahia) : perfil fitoquímico,
atividade antifúngica e avaliação da toxicidade /
Palloma Christine Queiroga Gomes da Costa. - João
Pessoa, 2024.
66 f. : il.

Orientação: Ricardo Dias de Castro.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. Candidíase bucal. 2. Antifúngicos. 3. Óleo
essencial. 4. Extrato vegetal. 5. Compostos
fitoquímicos. I. Castro, Ricardo Dias de. II. Título.

UFPB/BC

CDU 616.31-001(043)

Elaborado por Larissa Silva Oliveira de Mesquita - CRB-15/746

Informações Complementares:

Título em outro idioma: BIOACTIVE POTENTIAL OF *Eugenia luschnathiana*
EXTRACTS: CHEMICAL PROFILING, ANTIFUNGAL ACTIVITY, AND TOXICITY
EVALUATION

Palavras-chave em outro idioma: Candidiasis; Antifungals agents; Oils, Volatile;
Plant extracts; Phytochemicals.

Área de concentração: Odontologia Linha de

Pesquisa: Produtos Naturais

Banca examinadora: Prof. Dr. Ricardo Dias de Castro (Orientador, Universidade
Federal da Paraíba); Prof. Dra. Edeltrudes de Oliveira Lima (Universidade Federal
da Paraíba); Prof. Dra. Jozinete Vieira Pereira (Universidade Estadual da Paraíba);
Prof. Dr. Felipe Queiroga Sarmiento Guerra (Universidade Federal da Paraíba);
Prof. Dra. Edja Maria Melo de Brito Costa (Universidade Estadual da Paraíba).

Data de defesa: 03-09-2024

Informações acadêmicas e profissionais do(a) aluno(a)

- ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3983-9781>

- Link do Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/9859416868627951>

Palloma Christine Queiroga Gomes da Costa

**POTENCIAL BIOATIVO DOS EXTRATOS DE *Eugenia luschnathiana*
(PITOMBA-DA-BAHIA): PERFIL FITOQUÍMICO, ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E
AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE**

**BIOACTIVE POTENTIAL OF *Eugenia luschnathiana* EXTRACTS: CHEMICAL
PROFILING, ANTIFUNGAL ACTIVITY, AND TOXICITY EVALUATION**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia – Área de Concentração Ciências Odontológicas.

Orientador: Prof. Dr Ricardo Dias de Castro.

João Pessoa

2024



ATA DA DEFESA PÚBLICA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
2024

Aos três dias do mês de setembro do ano de 2024, às 09:00 horas, no Laboratório de Psicofarmacologia – IPFARM (Híbrido), reuniram-se os membros da banca examinadora composta pelas professores doutores: Ricardo Dias de Castro (Orientador(a) e Presidente), Edeltrudes de Oliveira Lima (membro interno ao Programa de Pós-graduação em Odontologia – UFPB) e Jozinete Vieira Pereira Marques (membro externo ao Programa de Pós-graduação em Odontologia – UFPB) a fim de argüirem o(a) mestrando(a) Palloma Christine Queiroga Gomes da Costa, com relação ao seu trabalho final de curso de mestrado (dissertação), sob o título “POTENCIAL BIOATIVO DOS EXTRATOS DE *Eugenia luschnathiana* (PITOMBA-DA-BAHIA): PERFIL FITOQUÍMICO, ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE”. Aberta a sessão pelo presidente da mesma, coube o(a) candidato(a), na forma regimental, expor o tema de sua dissertação, dentro do tempo regulamentar. Em seguida, foi questionado pelos membros da banca examinadora, sendo as explicações necessárias fornecidas e as modificações solicitadas registradas. Logo após, os membros da banca examinadora reuniram-se em sessão secreta, tendo chegado ao seguinte julgamento, que, de público, foi anunciado: 1º Examinador (membro externo): Conceito “Aprovado”; 2º Examinador (membro interno): Conceito “Aprovado, 3º Examinador (Orientador e presidente): Conceito “Aprovado”. O que resultou em conceito final igual: “APROVADO”, o que permite o(a) candidato(a) fazer jus ao título de Mestre em Odontologia. Os documentos utilizados para avaliação da candidata durante o processo aqui descrito apresentam-se como prova documental do mesmo e, como tal, serão anexadas a esta ata para arquivamento. Nada mais havendo a tratar, foi lavrada a presente ata, que será assinada pelo presidente, pelos demais membros da banca e pelo(a) candidato (a).

1º Examinador – Membro Externo

2º Examinador – Membro interno

3º Examinador – Presidente

Candidato (a)

Palloma Christine Queiroga Gomes da Costa

**POTENCIAL BIOATIVO DOS EXTRATOS DE *Eugenia luschnathiana*
(PITOMBA-DA-BAHIA): PERFIL FITOQUÍMICO, ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E
AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE**

A comissão examinadora abaixo relacionada julgou a Defesa de Dissertação apresentada em sessão pública no dia 03 de setembro de 2024 e atribuiu o conceito _____.

Prof. Dr. Ricardo Dias de Castro
Orientador - Universidade Federal da Paraíba

Prof. Dra. Edeltrudes de Oliveira Lima
Examinador – Universidade Federal da Paraíba

Prof. Dra. Jozinete Vieira Pereira
Examinador – Universidade Estadual da Paraíba

Prof. Dr. Felipe Queiroga Sarmiento Guerra
Suplente – Universidade Federal da Paraíba

Prof. Dr. Edja Maria Melo de Brito Costa
Suplente – Universidade Estadual da Paraíba

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu avô, Pedro Trajano (*in memoriam*) e à dona Mariza de Carvalho (*in memoriam*) que, embora ausentes fisicamente, permanecem vivos na memória de todos aqueles que os amam.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, **Luciano Lima** e **Samara Queiroga**, minha gratidão eterna. Vocês foram responsáveis por me impulsionar em cada passo dessa jornada. Cada conquista minha é, também, uma extensão de vocês. Obrigada por acreditarem em mim mesmo nos momentos que nem eu acreditei.

À minha família, em especial minha tia **Geleia**, minha prima **Angelina Castro**, minha madrinha **Suetânia Karen** e minha avó **Adalgisa** Lima. Vocês representam o afeto e o apoio que só uma família pode oferecer. Obrigada por estarem sempre ao meu lado, pelo carinho constante e pela segurança de saber que posso contar com vocês em todos os momentos.

Ao meu namorado, **Davi de Mendonça**, meu porto seguro. Você deixa o meu coração mais leve, tudo fica mais fácil. Obrigada pela paciência, pelo companheirismo e pelo apoio incondicional. Sem você, essa caminhada não teria sido a mesma.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Ricardo Dias de Castro**, cujas atitudes humanas e empáticas durante a orientação superaram todas as minhas expectativas. Não existem palavras que possam expressar o quanto eu sou grata por todo o acolhimento e ensinamentos que recebi ao longo desses últimos anos. Com o senhor, aprendi não apenas sobre a pesquisadora que desejo ser, mas o ser humano que quero me tornar. Obrigada por tudo.

Ao grupo de pesquisa **GEFTO**, por tantos ensinamentos. Aqui eu aprendo diariamente que a pesquisa científica pode ser leve e descontraída, sou muito grata por crescer junto a vocês nesse mundo acadêmico.

Em especial, às amigas que a pesquisa me deu, **Ana Karoline**, **Danielle Alves**, **Gleicyelly Araújo**, **Paula Lima**, minhas cúmplices e confidentes. Agradeço as conversas, os tantos desabafos, as fofocas e, sobretudo, os tantos conselhos nesses anos de amizade. Obrigada pela parceria diária, pela paciência e pelos constantes incentivos. Saibam que vocês são de grande importância em minha vida e o carinho que tenho por vocês é imensurável, a amizade de vocês foi um dos maiores presentes que essa jornada me proporcionou.

Aos meus amigos do “LDMJ”, **Almir Rodrigues, Beatriz Barros, Heloísa Nunes, Hugo Campelo, Larissa Mouta, Luana Amorim e Matheus Barbosa**, por todo acolhimento e brincadeiras nos momentos mais fáceis e mais difíceis. Mesmo com altos e baixos, nossa amizade permanece firme, vocês são a família que escolhi. Cada experiência compartilhada me tornou quem sou hoje e, por isso, serei eternamente grata.

A **Lucas Fernandes e Rebeca Beserra** pelos anos de amizade genuína, pelas risadas e pela disposição para enfrentar qualquer desafio. Amizade é uma escolha e fico muito feliz por termos escolhido estar na vida um do outro

À **Júlia Jamile**, minha irmã de alma, nem milhares de quilômetros de distância são capazes de desfazer o amor e carinho que sinto por você. Como é bom saber que estamos evoluindo juntas, mesmo que distantes, cada uma do seu jeito. Sou grata por nossa amizade, por nossa parceria e loucura compartilhada.

Aos meus **colegas de trabalho da UEPB**, por me acolherem de braços abertos quando cheguei completamente perdida em um ambiente novo. Especialmente, obrigada às amigas que a UEPB me deu, **Faumana Câmara, Fernanda Campos e Nayanna Fernandes**. Obrigada pela parceria, pelas conversas e pelos vários espetinhos em Araruna. Com vocês o trabalho parece mais leve e três horas de viagem não parecem demorar tanto assim. Espero levar a amizade de vocês para o resto da minha vida.

A **Apolo**, um dos meus maiores companheiros nessa jornada, por me ajudar a manter a saúde mental mesmo quando eu não sabia que precisava. Seu amor incondicional me lembrou diariamente do valor das pequenas coisas e do poder do afeto.

Aos **professores Edeltrudes de Oliveira, Jozinete Vieira, Felipe Queiroga e Edja Maria**, pela disponibilidade em participar da banca e por todas as valiosas contribuições, que serão de extrema importância para enriquecerem este trabalho.

À **CAPES**, pelo apoio financeiro recebido. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Ao **PPGO-UEPB** e à **Universidade Federal da Paraíba**, pelo apoio institucional recebido.

RESUMO

Introdução: As opções terapêuticas disponíveis para o manejo de pacientes com infecções fúngicas, incluindo as que acometem a cavidade bucal, possuem limitações relacionadas a efeitos adversos e à emergência de patógenos resistentes. Populações mais vulneráveis, como indivíduos hospitalizados ou imunossuprimidos, são as mais afetadas por essas infecções. O avanço no desenvolvimento de novos medicamentos eficazes e com menor toxicidade ao hospedeiro são cruciais para o tratamento de infecções fúngicas. **Objetivo:** Investigar o perfil fitoquímico, a atividade antifúngica do óleo essencial (OE) e extrato etanólico bruto (EEB) obtidos de *Eugenia luschnathiana* e realizar a caracterização toxicológica inicial. **Metodologia:** Determinação do perfil fitoquímico a partir do uso de Cromatografia Gasosa Acoplada ao Espectrofotômetro de Massas (CG-EM) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H ; determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Fungicida Mínima (CFM) sobre cepas referência (*C. albicans* ATCC 76645 e *C. albicans* ATCC 90028) e isoladas clínicas de *Candida* de pacientes sob tratamento oncológico; avaliação dos potenciais mecanismos de ação; avaliação da atividade sobre biofilme fúngico; avaliação do efeito citotóxico sobre queratinócitos humanos da linhagem HaCat pelo método MTT; determinação da letalidade para larvas de *Artemia salina*. **Resultados:** Os compostos predominantes no óleo essencial, identificados por CG-EM, pertencem à classe dos sesquiterpenos, sendo β -Cariofileno o composto majoritário. No extrato etanólico bruto, o espectro de RMN de ^1H identificou compostos alifáticos, osídeos e aromáticos. A triagem fitoquímica evidenciou a presença de taninos e flavonóides. A partir dos ensaios realizados, o OE, nas concentrações testadas, não apresentou atividade antifúngica. O EEB mostrou atividade fungicida, com CIM e CFM variando de 1,95 $\mu\text{g/mL}$ a 3,90 $\mu\text{g/mL}$ para cepas testadas, com possível mecanismo de ação nas estruturas da parede celular fúngica. Em baixa concentração (19.5 $\mu\text{g/mL}$), o EEB inibiu 62.78% do biofilme de *Candida albicans*. O EEB apresentou uma inibição menor que 25% sobre os queratinócitos em concentrações menores que a CIMx20 (39 $\mu\text{g/mL}$) e Concentração Letal Média (CL₅₀) para *A. salina* de 142,4 $\mu\text{g/mL}$. **Conclusões:** O EEB possui atividade antifúngica forte, com ação provável sobre parede celular, efeito sobre biofilme e perfil de toxicidade compatível para realização de outras investigações. Os dados obtidos com o presente estudo podem fomentar o

desenvolvimento de novos medicamentos antifúngicos no tratamento da candidíase com possíveis novos mecanismos de ação, ampliando o atual arsenal de antifúngicos.

Palavras-chave: Candidíase; Antifúngicos; Óleo essencial; Extrato vegetal; Compostos fitoquímicos.

ABSTRACT

Introduction: The therapeutic options available for managing patients with fungal infections, including those affecting the oral cavity, are limited by adverse effects and the emergence of resistant pathogens. Vulnerable populations, such as hospitalized or immunosuppressed individuals, are most affected by these infections. Advances in developing new effective and less toxic medications are crucial for treating fungal infections. **Objective:** To investigate the phytochemical profile, antifungal activity of the essential oil (EO), and crude ethanolic extract (CEE) obtained from *Eugenia luschnathiana* and perform toxicological characterization. **Methodology:** Determination of the phytochemical profile using Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) and ¹H Nuclear Magnetic Resonance (NMR); determination of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Fungicidal Concentration (MFC) against reference strains (*C. albicans* ATCC 76645 e *C. albicans* ATCC 90028) and clinical isolates of *Candida* from patients undergoing oncological treatment; evaluation of potential mechanisms of action; evaluation of activity on fungal biofilm; evaluation of cytotoxic effect on human keratinocytes of the HaCat lineage by the MTT method; determination of lethality for *Artemia salina* larvae. **Results:** The predominant compounds in the essential oil, identified by GC-MS, belong to the sesquiterpenes class, with β -Cariofileno being the major compound. In the crude ethanolic extract, the ¹H NMR spectrum identified aliphatic, osidic, and aromatic compounds. A phytochemical examination showed the presence of tannins and flavonoids. From the assays conducted, the essential oil, at the tested concentrations, did not show antifungal activity. The ethanolic extract showed fungicidal activity, with MIC and MFC ranging from 1.95 μ g/mL to 3.90 μ g/mL for the tested strains, possibly acting on the structures of the fungal cell wall. At a low concentration (19.5 μ g/mL), the ethanolic extract inhibited 62.78% of the biofilm of *Candida albicans*. The ethanolic extract showed an inhibition of less than 25% on keratinocytes at concentrations lower than the MICx20 (39 μ g/mL) and an Lethal Concentration 50 (LC₅₀) for *A. salina* of 142.4 μ g/mL **Conclusion:** The CEE exhibited very strong antifungal activity, with a probable action on the cell wall, effect on biofilm, and a toxicity profile compatible with further investigations. The data obtained from this study may stimulate the

development of new antifungal medications for treating candidiasis with possible new mechanisms of action, expanding the current arsenal of antifungals.

Keywords: Candidiasis; Antifungals agents; Oils, Volatile; Plant extracts; Phytochemicals.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC- American Type Culture Collection

CFM- Concentração Fungicida Mínima

CIM- Concentração Inibitória Mínima

CLSI- Clinical and Laboratory Standards Institute

CSD- Caldo Sabouraud Dextrose

DMSO- Dimetilsulfóxido

EEB- Extrato etanólico bruto

HIV- Vírus da Imunodeficiência Humana

MTT- Reagente brometo de [3(4,5-demetiltiazol-2-il)-2,5- difeniltetrazolium

OE- Óleo essencial

RPMI- Roswell Park Memorial Institute

CG-EM- Cromatografia Gasosa Acoplada ao Espectrofotômetro de Massas

RMN- Ressonância Magnética Nuclear

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Composição fitoquímica do óleo essencial de *E. luschnathiana* por CG-EM..... 26
- Tabela 2.** Resultados obtidos na triagem de grupos funcionais do extrato de *E. luschnathiana*.....27
- Tabela 3.** CIM e CFM do extrato e óleo essencial de *E. luschnathiana* e nistatina sobre cepas referência de *Candida* spp. e isolados clínicos de cavidade bucal de pacientes oncológicos (A). Valores das concentrações expressos em µg/mL 29
- Tabela 4.** Valores da CIM do extrato de *E. luschnathiana* e Caspofungina na ausência e presença de sorbitol 0.8M contra cepas de *C. albicans* ATCC 90028 e *C. albicans* (A5). Valores expressos em µg/mL..... 30
- Tabela 5.** Valores da CIM do extrato de *E. luschnathiana* e Nistatina na ausência e presença de ergosterol exógeno (400 µg/mL) contra cepas de *C. albicans* ATCC 90028 e *C. albicans* (A5). Valores expressos em µg/mL 30

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Atribuição dos espectros de RMN 1D do extrato de *E. luschnathiana*. (A) Expansão do espectro de RMN de ^1H de 2,5 a 0,6 ppm. (B) Expansão do espectro de RMN de ^1H de 5,5 a 2,6 ppm (C) Expansão do espectro de RMN de ^1H de 8,5 a 5,6 ppm (D) Expansão do espectro de RMN do extrato de *E. luschnathiana* 28
- Figura 2.** Efeito inibitório do extrato de *E. luschnathiana* e nistatina sobre biofilme de *C. albicans* ATCC 90028.....31
- Figura 3.** Atividade citotóxica do extrato etanólico de *E. luschnathiana* na linhagem de queratinócitos humanos HaCaT após 72 h de tratamento.....32
- Figura 4.** Curva de regressão linear para determinação da CL_{50} do Extrato de *E. luschnathiana* sobre *Artemia salina*.....33

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	4
2.1 Candidíase oral.....	4
2.2 Resistência fúngica.....	6
2.3 Uso de produtos naturais.....	8
2.4 <i>Eugenia luschnathiana</i>	9
3. OBJETIVOS	12
3.1 Objetivo geral	12
3.2 Objetivo específico.....	12
4. ARTIGO 1.....	13
1. INTRODUÇÃO.....	16
2. MATERIAL E MÉTODOS	18
2.1 Coleta do produto vegetal	18
2.2 Obtenção do óleo essencial e extrato etanólico bruto	19
2.3 Microrganismos e reagentes.....	19
2.4 Caracterização fitoquímica.....	20
2.4.1 Teste para alcaloides	21
2.4.2 Teste para esteroides	21
2.4.3 Teste para taninos	21
2.4.4 Teste para flavonoides.....	21
2.4.5 Teste para saponinas.....	22
2.4.6 Espectroscopia de Ressonância Nuclear Magnética (RNM) de ¹ H do extrato de <i>E. luschnathiana</i>	22
2.5 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM)	22
2.6 Ação do extrato da folha de <i>E. luschnathiana</i> sobre parede e membrana celular fúngicas	23
2.7 Avaliação da atividade antifúngica do extrato sobre biofilme fúngico	24
2.8 Ensaio de citotoxicidade sobre queratinócitos humanos	25
2.9 Ensaio de toxicidade sobre <i>Artemia salina</i>	26
3. RESULTADOS.....	26

3.1 Caracterização fitoquímica do óleo essencial	26
3.2 Caracterização fitoquímica do extrato etanólico bruto.....	27
3.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM)	29
3.4 Ação do extrato da folha de <i>E. luschnathiana</i> sobre parede e membrana celular fúngicas	30
3.5 Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato sobre biofilme fúngico	31
3.6 Ensaio de citotoxicidade sobre queratinócitos humanos	32
3.7 Ensaio de toxicidade sobre <i>Artemia salina</i>	33
4. DISCUSSÃO	34
5. CONCLUSÃO	37
REFERÊNCIAS.....	38
6. CONCLUSÃO.....	44
REFERÊNCIAS	45
ANEXO.....	49

1. INTRODUÇÃO

Organismos do reino Fungi são responsáveis pela infecção e morte de aproximadamente 1,5 milhões de pessoas anualmente. O aumento desse número nas últimas décadas se deve à crescente quantidade da população idosa e de pacientes imunocomprometidos, como pacientes com câncer, transplantados e HIV⁺. Entre os principais agentes etiológicos de infecções fúngicas em pacientes com o sistema imunológico comprometido, estão os fungos do gênero *Candida*, como *C. albicans*, espécie predominante (Lee *et al.*, 2020). Outras espécies emergentes, como *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. guilliermondii* são frequentemente associadas. A mortalidade associada a espécies *Candida* varia de 46 a 75%, sendo caracterizada pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos como uma séria ameaça à saúde humana (Chowdhary *et al.*, 2023; Rai *et al.*, 2022).

C. albicans é responsável por colonizar a microbiota humana de forma simbiote e está presente no trato gastrointestinal e reprodutivo de grande parte dos indivíduos saudáveis. Esse microrganismo, usualmente comensal, tem seu crescimento favorecido devido a fatores locais (próteses dentárias e má higiene oral) e sistêmicos (anemia, diabetes descompensada, terapias sistêmicas prolongadas, uso de antibióticos de largo espectro e imunodeficiências) que levam a uma disbiose (Contaldo *et al.*, 2023; Vila *et al.*, 2020). Nesse contexto, a candidíase oral, uma infecção fúngica oportunista, manifesta-se de forma superficial e normalmente leve na mucosa.

Clinicamente, a candidíase oral pode se apresentar em diversos sítios orais na forma aguda, bem como associada à síndromes de candidíase mucocutâneas crônicas. Essas manifestações podem levar ao desconforto, formação de placas pseudomembranosas, ardência bucal e alteração de paladar, características estas que têm impacto direto na qualidade de vida e nutrição da população afetada, bem como na recuperação de pacientes hospitalizados (Monsen *et al.*, 2023; Vila *et al.*, 2020). A correta nutrição é um fator vital para recuperação de pacientes imunocomprometidos, em especial das pessoas com câncer, que são constantemente submetidas a radioterapias e quimioterapias. Além disso, devido ao risco de disseminação para mucosa adjacente (trato respiratório superior, esôfago, sangue e sistema nervoso), que pode resultar em uma infecção sistêmica

fatal, esses pacientes se encontram em uma posição de alta vulnerabilidade. O manejo da candidíase oral, infecção com taxa crescente de morbidade, é, então, imprescindível para manutenção da qualidade de vida da população, especialmente de pacientes imunodeficientes (Rai *et al.*, 2022; Ramírez-Carmona *et al.*, 2023).

O tratamento com antifúngicos convencionais, no entanto, tem se tornado ineficiente no combate de doenças infecciosas devido ao uso indiscriminado e prolongado do restrito arsenal disponível, sendo suas principais classes os polienos, azóis e equinocandinas. As terapias medicamentosas adotadas para candidíase oral envolvem primariamente opções tópicas (nistatina e miconazol) e sistêmicas (fluconazol e itraconazol), a depender da gravidade da infecção (Pristov *et al.*, 2019; Rai *et al.*, 2022). O sucesso do tratamento está relacionado, além da terapêutica medicamentosa, à remoção da causa local ou sistêmica. Caso não seja possível, a candidíase oral pode apresentar recidiva e levar a um ciclo de cronificação e de resistência medicamentosa, resultando em um quadro de maior agressividade e com disseminação sistêmica (Contaldo *et al.*, 2023).

Ressalta-se, então, a necessidade da descoberta de novos antifúngicos com maior eficácia e diferentes mecanismos de ação para realizar o correto manejo do paciente (Alves *et al.*, 2021). Nesse sentido, o uso de produtos naturais tem sido considerado como promissor para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos, especialmente para o tratamento da candidíase oral. (de Souza-Melo *et al.*, 2021; Ferreira *et al.*, 2015).

O gênero *Eugenia*, um dos principais representantes da família Myrtaceae, é descrito na literatura por possuir plantas com atividade farmacológica antioxidante, antibacteriana, antidiarreica, antifúngica, anti-inflamatória e antipirética, sendo o potencial antifúngico bem documentado. Entre as plantas dessa família está a *Eugenia luschnathiana* (O. Berg) Klotzsch ex BD. Jacks, conhecida popularmente como “pitomba-da-bahia” e presente em diversos estados do nordeste brasileiro (Sardi *et al.*, 2017; Henriques *et al.*, 2021). Estudo prévio indica que um extrato/óleo essencial de *E. luschnathiana* apresenta atividade sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Araújo, 2018). Dados não publicados, obtidos previamente pelo nosso grupo de pesquisa, demonstraram que o extrato de *E. luschnathiana* apresentou baixos valores de concentrações inibitórias mínimas para cepas de *Candida albicans*. Esses resultados sustentam a hipótese

de que o óleo essencial e o extrato etanólico bruto obtidos de *E. luschnathiana* apresentaram atividade antifúngica sobre cepas padrão e isolados clínicos de *Candida* obtidas de cavidade bucal de indivíduos sob tratamento oncológico.

Ainda que a atividade antimicrobiana de diversas espécies do gênero *Eugenia* sejam descritos na literatura, estudos sobre atividades biológicas de *E. luschnathiana* são escassos. Dessa forma, o presente artigo tem como proposta determinar as características fitoquímicas do óleo essencial e do extrato etanólico bruto das folhas de *E. luschnathiana*, investigar sua atividade antifúngica, incluindo possível mecanismo de ação e efeito sobre biofilme, frente a cepas de referência de *Candida* spp. e isolados clínicos de pacientes sob tratamento oncológico, bem como determinar parâmetros de toxicidade.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CANDIDÍASE ORAL

Fungos do gênero *Candida* colonizam de forma simbiote a microbiota oral de 30-55% de adultos saudáveis. Alguns fatores locais e sistêmicos, como uso de próteses dentárias, uso de corticoides, imunodeficiência e diabetes podem levar a uma situação de desequilíbrio da microbiota e a um conseqüente crescimento exacerbado dessas espécies. Esse cenário indica uma transição de microrganismo comensal a patogênico (MILLSOP e FAZEL, 2016). Nesse sentido, a candidíase oral se configura como uma infecção fúngica muito comum na população. (VILA *et al.*, 2020). A levedura dimórfica *Candida albicans* representa o principal agente etiológico associado a candidíase oral, sendo caracterizado como o mais patogênico. A epidemiologia dessa infecção, no entanto, apresentou recentes modificações em decorrência da crescente resistência desses microrganismos aos medicamentos antifúngicos. Assim, fungos de outras espécies, como *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. dubliniensis* e *C. guilliermondii* podem estar associadas à candidíase oral, indicando uma complicação no tratamento do paciente (Marquez *et al.*, 2020; Quindós *et al.*, 2019).

A progressão fisiopatológica da candidíase oral depende tanto de fatores de virulência da *Candida* spp., quanto de fatores atrelados ao hospedeiro, envolvendo principalmente as condições clínicas do paciente. Uma vez aderida à superfície, a *C. albicans* pode mudar sua morfologia para forma de hifa, que facilita sua penetração no epitélio. Essa mudança ocorre, principalmente, devido à variação da microbiota, que leva ao estímulo dos mecanismos de virulência (Vila *et al.*, 2020). Outros fatores de virulência que conferem a capacidade de colonizar e invadir hospedeiros são: expressão de adesinas e invasinas, capacidade de danificar células hospedeiras, tigmotropismo, secreção de enzimas hidrolíticas e formação de biofilmes. Uma vez formado biofilme (comunidades microbianas estruturadas, envoltas em uma matriz extracelular e aderidas a uma superfície), ocorre um aumento na expressão dos fatores de virulência da *Candida* e, conseqüentemente, sua susceptibilidade aos tratamentos padrões diminui (de Barros *et al.*, 2020).

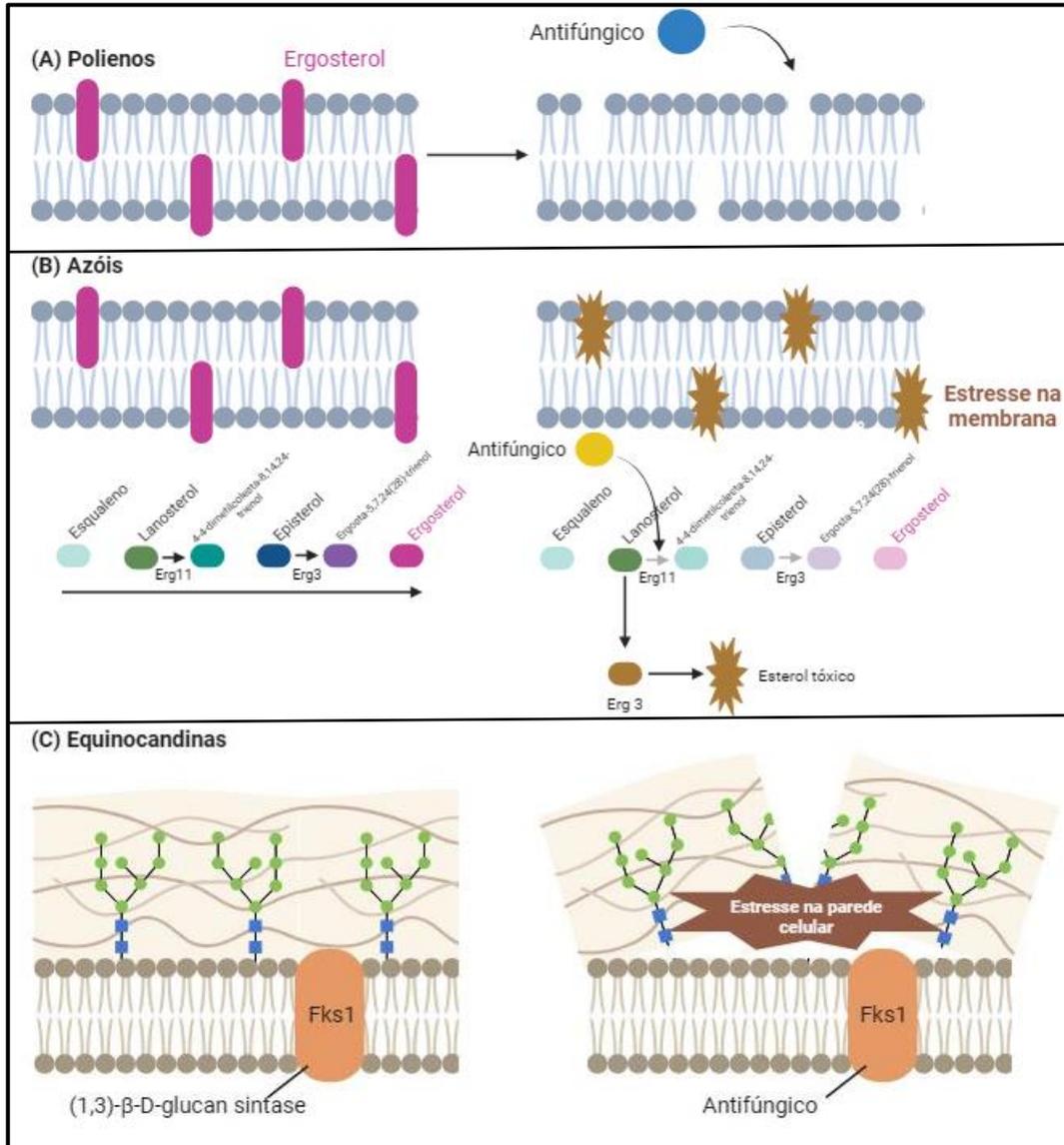
Essa infecção pode ser classificada clinicamente em aguda e crônica. A forma aguda pode ser dividida em eritematosa e pseudomembranosa. A candidíase

crônica inclui doenças associadas a *Candida*, tais como estomatite protética, queilite angular, glossite romboide mediana, candidíase hiperplásica crônica e candidíase multifocal (QUINDÓS *et al.*, 2019). A candidíase pseudomembranosa aguda se apresenta comumente na cavidade oral como placas multifocais branco-amareladas. Estas conseguem ser removidas gentilmente por raspagem, expondo a base erosiva e avermelhada. Enquanto isso, a candidíase eritematosa se apresenta de forma dolorosa, com manchas vermelhas na cavidade oral. Ambas podem levar a dificuldade de deglutição e nutrição (Vila *et al.*, 2020).

Preconiza-se como terapia medicamentosa para o tratamento da candidíase oral, em casos de infecções brandas, opções tópicas, como a nistatina e o miconazol. Em situações mais invasivas, como no caso da candidíase orofaríngea, recomenda-se o uso de opções sistêmicas, como o fluconazol ou itraconazol (Borges *et al.*, 2021).

Os antifúngicos são categorizados em polienos, azóis e equinocandinas e atuam de formas distintas sobre as cepas fúngicas. As membranas plasmáticas fúngicas possuem similaridades com as células dos mamíferos, porém, ao invés de colesterol, possuem ergosterol (esterol não polar) como seu principal componente. A via de biossíntese do ergosterol é diversa e complexa, envolvendo diversas enzimas. Assim, vários medicamentos foram desenvolvidos baseados nessa estrutura, como os polienos, que possuem a nistatina e anfotericina B. Essa classe demonstra atividade fungicida ao extrair o ergosterol das bicamadas lipídicas a partir da formação de agregados extramembranosos. Por sua vez, os azóis exercem atividade fungistática ao inibir a lanosterol 14- α -demetilase (codificada por ERG11), resultando no bloqueio da síntese de ergosterol e no acúmulo de intermediários de esterois tóxicos. Por outro lado, as equinocandinas atuam sobre a parede celular fúngica, a partir da ligação não competitiva à subunidade Fks1 da enzima (1,3)- β -D-glucano sintase, responsável pela formação das ligações glicosídicas no (1,3)- β -D-glucano. Assim ocorre uma redução da integridade da parede celular, levando a um desequilíbrio osmótico e, conseqüentemente, à morte celular. Essa classe possui um mecanismo de ação mais específico, tendo em vista que a enzima afetada não está presente em células animais (Szymanski *et al.*, 2022; Carmo *et al.*, 2023).

Figura 1. Mecanismo de ação das atuais classes antifúngicas



Fonte: Adaptado de Lee *et al.*, 2021

2.2 RESISTÊNCIA FÚNGICA

O tratamento eficaz de doenças infecciosas está ameaçado pelo aumento da resistência antimicrobiana. Entre os fatores envolvidos nessa crescente resistência está o uso excessivo e inadequado de antimicrobianos e a falta de desenvolvimento de novos medicamentos (Atanasov *et al.*, 2021). Essa resistência pode ser dividida em clínica (incapacidade de erradicar a infecção em um paciente) e micológica (capacidade do fungo crescer, *in vitro*, na presença do medicamento). Esse é um fator preocupante a respeito de patógenos fúngicos, pois os agentes antifúngicos estão restritos a três principais classes: polienos, azóis e equinocandinas. Em decorrência da proximidade evolutiva entre seres humanos e

fungos, ambos são eucarióticos, há um limitado número de alvos moleculares a serem explorados no desenvolvimento de novos medicamentos. A resistência fúngica a pelo menos uma dessas classes, então, limita significativamente as opções terapêuticas disponíveis e pode gerar doenças intratáveis (Ben-Ami *et al.*, 2021; Pristov *et al.*, 2019).

Espécies de *Candida* são a causa mais comum de doença micótica invasiva em indivíduos que passaram por procedimentos clínicos invasivos, que necessitam de tratamento em unidades de terapia intensiva ou são imunocomprometidos. Esses fungos podem resultar em doenças sistêmicas fatais a partir da disseminação para corrente sanguínea e colonização de órgãos internos. Espécies como *C. glabrata* e *C. auris* ganharam destaque nos últimos anos devido à associação de resistência a pelo menos uma classe de antifúngicos, sendo uma grande preocupação para médicos e pesquisadores. O desenvolvimento de novos medicamentos é lento e desafios associados à permeabilidade dos compostos através da parede fúngica e ao limitado interesse da indústria farmacêutica inviabilizam a celeridade nesse processo (Lee *et al.*, 2020).

A resistência intrínseca é preditiva e é uma característica inerente ao fungo, independe da exposição prévia a medicamentos. Para detecção desse tipo de resistência, necessita-se do sequenciamento genômico para diferenciar as espécies presentes. Por outro lado, a resistência adquirida é desenvolvida a partir da exposição ao antifúngico. Esse processo é facilitado quando há formação de biofilmes, exposição a concentrações subletais do fármaco e quando o paciente está imunossuprimido. A alteração na susceptibilidade pode ocorrer por mutações pontuais ou rearranjos genômicos (Ben-Ami *et al.*, 2021).

Os principais mecanismos associados à resistência fúngica incluem transportadores de membrana, mutações na via do ergosterol e mutações em enzimas de síntese da parede celular. A exemplo de mutações sofridas no gene *ERG3*, que resultam em membranas celulares sem ergosterol, inviabilizando a ação de antifúngicos que atuam nessa estrutura. *C. auris* representa um patógeno preocupante, pois isolados clínicos de infecções com esse microrganismo apresentam resistência clínica pronunciada e às vezes intratável a todas as classes conhecidas de antifúngicos. Além disso, foi relatada a transmissão de isolados de *C. auris* pan-resistentes e resistentes a equinocandinas nos Estados Unidos,

sugerindo uma alta transmissibilidade, que pode levar à disseminação de clones resistentes a medicamentos em ambientes hospitalares (Chowdhary *et al.*, 2023).

A capacidade de formação de biofilme é um importante fator de virulência das espécies de *Candida* e conferem capacidade de tolerância e/ou resistência à diferentes antifúngicos, bem como ao sistema imunológico inato. Essa estrutura complexa é um dos fatores determinantes da susceptibilidade antifúngica da *C. albicans*. Isso se deve à atividade metabólica aumentada, presença de matriz extracelular e alterações na expressão gênica, incluindo de genes que codificam transportadores de resistência aos azóis (de Barros *et al.*, 2020).

2.3 USO DE PRODUTOS NATURAIS

Os produtos naturais desempenham um papel crucial na descoberta de novos medicamentos. Isso porque eles são conhecidos por sua diversidade e complexidade estrutural, que podem ser associadas a algumas funções biológicas e, conseqüentemente, à presença de atividade antimicrobiana, anti-inflamatória, anticarcinogênica, entre muitas outras. Os produtos naturais também têm demonstrado grande potencial para servir como modelos no design e síntese de componentes químicos com propriedades farmacológicas melhoradas. Embora alguns agentes estejam em fase de ensaios clínicos, novos agentes antifúngicos relacionados à produtos naturais não são desenvolvidos desde 2006, todos são derivados da química dos azóis. Isso se deve, principalmente à falta de financiamento (Newman e Cragg, 2020; Atanasov *et al.*, 2021).

A natureza sempre foi uma fonte de possíveis substâncias para o desenvolvimento de medicamentos. A etnobotânica está fortemente atrelada a isso, tendo em vista que aproximadamente 65% da população mundial utiliza de produtos naturais para tratar diversos distúrbios. Conseqüentemente, houve um aumento no interesse da pesquisa com produtos naturais e metodologias que investiguem composição, propriedades físico-químicas, farmacocinéticas e farmacodinâmicas foram aprimoradas. Entre os recursos utilizados para essa análise estão: Cromatografia Gasosa Acoplada ao Espectômetro de Massas, Cromatografia Líquida, Ressonância Magnética Nuclear (Chopra *et al.*, 2021).

A investigação de agentes antimicrobianos provenientes de plantas é uma estratégia viável para descoberta de produtos naturais com atividade sobre patógenos dentários. Diversos extratos, óleos essenciais e outros compostos

naturais possuem sua relevância descrita na literatura acerca do controle do biofilme e manutenção da saúde oral (Chinsembu, 2016).

Alguns compostos vegetais podem gerar danos e reduzir a fluidez da membrana e proteínas fúngicas/bacterianas ao interagir com essas estruturas. Também podem inibir a síntese de ácidos nucleicos e interferir no metabolismo energético desses microrganismos. Além disso, estudos demonstraram as propriedades fungicida/bactericida e antibiofilme de alguns produtos naturais. O mapeamento e *screening* farmacológico de plantas como potencial fonte para o desenvolvimento de medicamentos com atividade antimicrobiana pode ser considerado uma excelente abordagem no combate da formação do biofilme de *Candida* e no estabelecimento de infecções (Guimarães *et al.*, 2021).

Assim, na odontologia, essas substâncias possuem diversas aplicações devido a essa ação sobre o biofilme e patógenos orais, que levam a diminuição da adesão de fungos e bactérias à superfície. Algumas dessas plantas são *Abies canadensis* (L.) Mill., *Albizia julibrissin* Durazz, *Drosera peltata* Willd, *Ginkgo biloba* L., *Juniperus virginiana* L. e *Eugenia caryophyllata* Thunb. O gênero *Eugenia* é constantemente descrito na literatura por sua atividade antimicrobiana (Chinsembu, 2016).

Apesar das diversas vantagens e do desenvolvimento de vários exemplos da descoberta de medicamentos a partir de produtos naturais, existem algumas limitações no uso dessas substâncias para pesquisa farmacêutica. Acessar material biológico suficiente para caracterizar esse produto, assim como a obtenção dos direitos de propriedade intelectual estão entre essas limitações. Ainda assim, o uso dessas substâncias na formulação de novos medicamentos é extremamente vantajoso (Atanasov *et al.*, 2021).

2.4 *Eugenia luschnathiana*

A família Myrtaceae, uma das maiores do reino vegetal, contém aproximadamente 121 gêneros e 3500–5800 espécies, que variam de arbustos a árvores frutíferas. Essas plantas são típicas de países com climas tropicais e subtropicais e cerca de 50% das espécies são endêmicas da Mata Atlântica. O Brasil tem aproximadamente 1000 espécies nativas de árvores frutíferas pertencentes a família Myrtaceae, estas têm grande valor econômico, não apenas para o setor agrícola, mas também para o farmacêutico. Produtos derivados dessas

espécies já apresentaram diversas propriedades biológicas, como atividade antimicrobiana, inseticida, antioxidante, antiparasitária, anestésica e sedativa (Anjos da Silva *et al.*, 2023).

Para o desenvolvimento de produtos naturais, como óleos essenciais, o gênero *Eugenia* é o quarto gênero mais importante da família Myrtaceae. Os óleos essenciais dessas espécies abrangem cerca de 300 compostos previamente identificados, com predominância de sesquiterpenos cíclicos. Algumas espécies também são associadas a compostos alifáticos e aromáticos. Flavonoides, triterpenoides e taninos também foram identificados em espécies de *Eugenia*. Os espécimes mais estudados são *E. uniflora* e *E. brasiliensis* Lam., que são amplamente utilizadas na medicina popular, pois possuem diversas propriedades terapêuticas. São usadas, principalmente, no tratamento de doenças infecciosas, distúrbios gastrointestinais e no tratamento de feridas (de Souza *et al.*, 2018).

A espécie *E. luschnathiana* Klotzsch ex B.D. Jacks, popularmente conhecida como “pitomba-da-bahia” é uma árvore de 5 a 10 m de altura, predominante na Mata atlântica. Essa espécie apresenta maior densidade no estado da Bahia, mas também está presente em outros estados do nordeste brasileiro, como Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba e Pernambuco (Monteiro *et al.*, 2016).

Com relação aos aspectos botânicos, a folha da *E. luschnathiana* se apresenta em formato elíptico com base atenuada, ápice acuminado e textura coriácea com margens revolutas. As flores possuem bractéolas persistentes e vistosas, hipanto liso e piloso, cálices visíveis em botões florais abertos, quatro sépalas e quatro pétalas. Os frutos têm formato globoso, superfície lisa e bractéolas persistentes e vistosas. As sementes são únicas, com embrião cotilédone fundido (Brasil, 2024).

Embora seu uso popular não seja amplamente difundido, foi relatado em uma comunidade rural na Bahia, Brasil, que o chá das folhas da *E. luschnathiana* era utilizado como antitérmico. Em contraste, outras espécies do mesmo gênero apresentam maior relevância no consumo medicinal, o que pode ser atribuído à escassez de estudos que investiguem sua composição química e potenciais efeitos farmacológicos (Henriques *et al.*, 2021)

Assim como outras espécies do gênero *Eugenia*, produtos obtidos da *E. luschnathiana* apresentam uma predominância de sesquiterpenos, como o β -Cariofileno, além de ésteres, álcoois e outros terpenos. Esses compostos são

responsáveis por diversas atividades farmacológicas atribuídas à planta, como a antimicrobiana e anti-inflamatória. Ácidos quínico, málico, gálico, elágico, miricetim-O-ramnosídeo e arjúnico muitas vezes estão presentes nessa espécie, sendo considerados possíveis marcadores químicos do gênero *Eugenia*. A atividade antibacteriana, antioxidante e caracterização toxicológica são pouco descritas na literatura, mas apresentam resultados promissores para a realização de novas pesquisas (Henriques *et al.*, 2021).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o perfil fitoquímico, a atividade antifúngica do óleo essencial (OE) e extrato etanólico bruto (EEB) *obtidos* de *Eugenia luschnathiana* e realizar a caracterização toxicológica preliminar.

3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

- Realizar caracterização fitoquímica do EEB e do OE da folha de *E. luschnathiana*;
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) do EEB e OE da folha de *E. luschnathiana* sobre cepas do gênero *Candida*;
- Avaliar os efeitos do EEB e OE da folha de *E. luschnathiana* sobre a parede celular e membrana plasmática fúngicas;
- Avaliar a atividade antifúngica do EEB e OE da folha de *E. luschnathiana* sobre biofilme fúngico;
- Avaliar o efeito citotóxico do EEB e OE da folha de *E. luschnathiana* sobre queratinócitos humanos;
- Avaliar os efeitos a toxicidade do EEB e OE da folha de *E. luschnathiana* sobre *A. salina*

4. ARTIGO 1

O manuscrito a seguir foi submetido e aprovado para publicação no periódico “Brazilian Journal of Biology”.

Bioactive potential of *Eugenia luschnathiana* essential oil and extract: antifungal activity against *Candida* species isolated from oncological patients

Palloma Christine Queiroga Gomes da Costa^a; Paula Lima Nogueira^b; Yuri Manguiera do Nascimento^c; Marianna Vieira Sobral^d; Geovana Ferreira Guedes Silvestre^e; Ricardo Dias de Castro^{f*}.

^a Postgraduate Program in Dentistry, Department of Clinic and Social Dentistry, Center of Health Sciences, Federal University of Paraiba (UFPB), João Pessoa, PB, Brazil, Campus I Lot. Cidade Universitária, PB, 58051-900. ORCID: 0000-0002-3983-9781

^b Postgraduate Program in Dentistry, Department of Clinic and Social Dentistry, Center of Health Sciences, Federal University of Paraiba (UFPB), João Pessoa, PB, Brazil, Campus I Lot. Cidade Universitária, PB, 58051-900. ORCID: 0000-0001-7425-3201

^c Postgraduate Program in Bioactive Natural and Synthetic Products, Department of Pharmaceutical Sciences, Center of Exact and Natural Sciences, Federal University of Paraiba (UFPB), João Pessoa, PB, Brazil, Campus I Lot. Cidade Universitária, PB, 58051-900. ORCID: 0000-0002-9732-6191

^d Postgraduate Program in Bioactive Natural and Synthetic Products, Department of Pharmaceutical Sciences, Center of Exact and Natural Sciences, Federal University of Paraiba (UFPB), João Pessoa, PB, Brazil, Campus I Lot. Cidade Universitária, PB, 58051-900. ORCID: 0000-0002-7740-034X

^e Postgraduate Program in Bioactive Natural and Synthetic Products, Department of Pharmaceutical Sciences, Center of Exact and Natural Sciences, Federal University

of Paraíba (UFPB), João Pessoa, PB, Brazil, Campus I Lot. Cidade Universitária, PB, 58051-900. ORCID: 0000-0002-5783-0449

^fDepartment of Clinic and Social Dentistry, Center of Health Sciences, Federal University of Paraíba (UFPB), João Pessoa, PB, Brazil, Campus I Lot. Cidade Universitária, PB, 58051-900. ORCID: 0000-0001-7986-7376

There are four figures in this paper and five tables.

Keywords: Candidiasis; Antifungal agents; Oils, Volatile; Plant extracts; Phytochemicals.

Palavras-chave: Candidíase. Antifúngicos. Óleo essencial. Extrato vegetal. Compostos fitoquímicos.

Short running title: Bioactive potential of *E. luschnathiana* extracts

ABSTRACT

Immunosuppressed individuals, including those undergoing cancer treatment, are more vulnerable to fungal infections, such as oral candidiasis, impacting their quality of life. Given the limitations of current therapies, the discovery of new antifungal agents, including those of natural origin, is crucial for the proper managing these infections. We investigated the phytochemical profile and antifungal activity of both the essential oil and crude ethanolic extract (CEE) obtained from *Eugenia luschnathiana* against reference strains and clinical isolates of *Candida* from oncology patients. Toxicological characterization was also conducted. Gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) and ¹H Nuclear Magnetic Resonance (NMR) were used for phytochemical analysis. Antifungal evaluation was conducted to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Fungicidal Concentration (MFC); evaluation of potential mechanisms of action; activity on a fungal biofilm; evaluation of the cytotoxic effect on human keratinocytes of the HaCat lineage by the MTT method; determination of lethality for *Artemia salina* larvae. GC-MS identified a predominance of sesquiterpenes in the essential oil, notably β-Cariofileno. The ¹H NMR spectrum identified aliphatic, osidic, and aromatic compounds in the crude ethanolic extract. The essential oil showed no antifungal activity. However, the CEE exhibited fungicidal activity, with MIC and MFC ranging from 1.95 µg/mL to 3.90 µg/mL. The antifungal effect was affected by sorbitol, indicating a possible mechanism targeting fungal cell wall structures. At low

concentration (19.5 µg/mL), the CEE inhibited 62,78% of *C. albicans* biofilm. The CEE demonstrated a promising toxicity profile, with an LC₅₀ of 142.4 µg/mL against *Artemia salina*. In conclusion, the CEE from *Eugenia luschnathiana* exhibited potent antifungal activity, likely through cell wall disruption, biofilm inhibition, and a favorable toxicity profile for further exploration.

Keywords: Candidiasis; Antifungals agents; Oils, Volatile; Plant extracts; Phytochemicals.

Potencial bioativo do óleo essencial e extrato de *Eugenia luschnathiana*: atividade antifúngica contra espécies de *Candida* isoladas de pacientes oncológicos

RESUMO

Indivíduos imunossuprimidos, a exemplo dos que fazem tratamento para o câncer, são mais suscetíveis a infecções fúngicas, como a candidíase oral, que podem afetar diretamente sua qualidade de vida e, conseqüentemente, seu processo de recuperação. Diante das limitações relacionadas às atuais opções terapêuticas, a descoberta de novos agentes antifúngicos, incluindo os de origem natural, é fundamental para o correto manejo dessas infecções. Este estudo investigou o perfil fitoquímico, a atividade antifúngica do óleo essencial e extrato etanólico bruto (EEB) obtidos de *Eugenia luschnathiana* sobre cepas referência e isoladas clínicas de *Candida* de pacientes sob tratamento oncológico e realizou a caracterização toxicológica. Para análise fitoquímica foram usados Cromatografia Gasosa Acoplada ao Espectrofotômetro de Massas (CG-EM) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ¹H. A avaliação antifúngica foi conduzida para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Fungicida Mínima (CFM); avaliação dos potenciais mecanismos de ação; avaliação da atividade sobre biofilme fúngico; determinação da letalidade para larvas de *Artemia salina*. A CG-EM identificou predominância de sesquiterpenos no óleo essencial, sendo β - Cariofileno o composto majoritário. O espectro de RMN de ¹H identificou compostos alifáticos, osídos e aromáticos no extrato etanólico bruto. O OE não apresentou atividade antifúngica. O EEB mostrou atividade fungicida, com CIM e CFM variando de 1,95 µg/mL a 3,90 µg/mL para cepas testadas, estes valores

permaneceram inalterados na presença de ergosterol exógeno, com possível mecanismos de ação sobre estruturas que envolvem parede celular fúngica. Em baixa concentração (19.5 µg/mL), o EEB inibiu 62.78% do biofilme de *Candida albicans*. O EEB demonstrou um perfil de toxicidade promissor, com menos de 25% de inibição de queratinócitos em concentrações abaixo de MICx20 (39 µg/mL) e uma Concentração Letal Média (CL₅₀) de 142,4 µg/mL contra *Artemia salina*. Observa-se, então, que o EEB possui atividade antifúngica muito forte, com ação provável sobre parede celular, efeito sobre biofilme e perfil de toxicidade compatível para realização de outras investigações.

Palavras-chave: Candidíase. Antifúngicos. Óleo essencial. Extrato vegetal. Compostos fitoquímicos.

1. INTRODUÇÃO

Organismos do reino Fungi são responsáveis pela infecção e morte de aproximadamente 1,5 milhões de pessoas anualmente. O aumento desse número nas últimas décadas se deve à crescente quantidade da população idosa e de pacientes imunocomprometidos, como pacientes com câncer, transplantados e HIV+. Entre os principais agentes etiológicos de infecções fúngicas em pacientes com o sistema imunológico comprometido, estão os fungos do gênero *Candida*, como a *C. albicans*, espécie predominante (Lee *et al.*, 2020). Outras espécies, como *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. guilliermondii* são frequentemente associadas. A mortalidade associada à espécies *Candida* varia de 46 a 75%, sendo caracterizada pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos como uma séria ameaça à saúde humana (Chowdhary *et al.*, 2023; Rai *et al.*, 2022).

A espécie *C. albicans* é responsável por colonizar a microbiota humana de forma simbiote e está presente no trato gastrointestinal e reprodutivo de grande parte dos indivíduos saudáveis. Esse microrganismo, usualmente comensal, tem seu crescimento favorecido devido a fatores locais (próteses dentárias e má higiene oral) e sistêmicos (anemia, diabetes descompensada, terapias sistêmicas prolongadas e imunodeficiências) que levam ao desequilíbrio da microbiota (Contaldo *et al.*, 2023; Vila *et al.*, 2020). Nesse contexto, a candidíase oral, uma infecção fúngica oportunista, manifesta-se de forma superficial e normalmente leve

na mucosa. No entanto, devido aos fatores de virulência da *C. albicans* e à crescente associação de infecções a outras espécies do gênero *Candida*, essa infecção pode se tornar resistente aos tratamentos existentes e apresentar altas taxas de recidiva (Quindós *et al.*, 2019).

A candidíase oral pode levar ao desconforto, formação de placas pseudomembranosas, ardência bucal e alteração de paladar, características estas que têm impacto direto na qualidade de vida e nutrição da população afetada, bem como na recuperação de pacientes hospitalizados (Monsen *et al.*, 2023; Vila *et al.*, 2020). A correta nutrição é um fator vital para recuperação de pacientes imunocomprometidos, em especial aqueles portadores de câncer, que são constantemente submetidos a radioterapias e quimioterapias. Ademais, devido ao risco de disseminação para mucosa adjacente (trato respiratório superior, esôfago, sangue e sistema nervoso), que pode resultar em uma infecção sistêmica fatal, esses pacientes se encontram em uma posição de alta vulnerabilidade. O manejo da candidíase oral é, então, imprescindível para manutenção da qualidade de vida da população, especialmente de pacientes imunodeficientes (Rai *et al.*, 2022; Ramírez-Carmona *et al.*, 2023).

O tratamento com antifúngicos convencionais, no entanto, tem se tornado ineficiente no combate de doenças infecciosas devido ao uso indiscriminado e prolongado do restrito arsenal disponível (em especial, polienos, azóis e equinocandinas). As terapias medicamentosas adotadas para candidíase oral envolvem primariamente opções tópicas (nistatina e miconazol) e sistêmicas (fluconazol e itraconazol), a depender da gravidade da infecção (Pristov *et al.*, 2019; Rai *et al.*, 2022). O sucesso do tratamento está relacionado, além da terapêutica medicamentosa, à remoção da causa local ou sistêmica. Caso não seja possível, a candidíase oral pode apresentar recidiva e levar a um ciclo de cronificação e de resistência medicamentosa, resultando em um quadro de maior agressividade e com disseminação sistêmica (Contaldo *et al.*, 2023).

Ressalta-se, então, a necessidade da descoberta de novos antifúngicos com maior eficácia e diferentes mecanismos de ação para realizar o correto manejo do paciente (Alves *et al.*, 2021). Nesse sentido, o uso de produtos naturais tem sido considerado como promissor para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos, especialmente para o tratamento da candidíase oral. Essa alternativa se mostra viável considerando a tendência a menores efeitos adversos quando

comparados a fármacos alopáticos (de Souza-Melo *et al.*, 2021; Ferreira *et al.*, 2015).

A família Myrtaceae, encontrada em sua maioria em regiões tropicais e subtropicais, tem seu uso como alimento funcional e atividade biológica bem documentados, sendo amplamente estudada na pesquisa de produtos naturais (Araújo, 2018; Henriques *et al.*, 2021). O gênero *Eugenia*, um dos principais representantes da família Myrtaceae, é descrito na literatura por possuir plantas com atividade farmacológica antioxidante, antibacteriana, antidiarreica, antifúngica, anti-inflamatória e antipirética, sendo o potencial antifúngico bem documentado. Entre as plantas dessa família está a *Eugenia luschnathiana* (O. Berg) Klotzsch ex BD. Jacks, conhecida popularmente como “pitomba-da-bahia” e presente em diversos estados do nordeste brasileiro (Sardi *et al.*, 2017; Henriques *et al.*, 2021). Estudo prévio indica que um extrato/óleo essencial de *E. luschnathiana* apresenta atividade sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Araújo, 2018). Esse resultado sustenta a hipótese de que o óleo essencial e o extrato etanólico bruto obtidos de *E. luschnathiana* apresentaram atividade antifúngica sobre cepas padrão e isolados clínicos de *Candida* obtidas de cavidade bucal de indivíduos sob tratamento oncológico.

Ainda que a atividade antimicrobiana de diversas espécies do gênero *Eugenia* sejam descritos na literatura, estudos sobre atividades biológicas de *E. luschnathiana* são escassos. Dessa forma, o presente artigo tem como proposta determinar as características fitoquímicas do OE e do EB das folhas de *E. luschnathiana*, investigar sua atividade antifúngica, incluindo possível mecanismo de ação e efeito sobre biofilme, frente a cepas de referência e isolados clínicos de *Candida* spp. de pacientes sob tratamento oncológico, bem como determinar parâmetros de toxicidade.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 COLETA DO PRODUTO VEGETAL

Previamente à realização da coleta do produto vegetal a pesquisa foi cadastrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen), sob nº A4B2595.

As folhas de *E. luschnathiana* foram coletados no município de Tibau do Sul, RN, Brasil (S 6° 13'39', O35°02'51'). O Herbário do Centro de Ciências Exatas e da Natureza da Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa possui o espécime testemunho de *Eugenia luschnathiana* (O. Berg) Klotzsch ex B.D. Jacks, sob o número: JPB 63845.

2.2 OBTENÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL E EXTRATO ETANÓLICO BRUTO

Para a extração do óleo essencial, foi realizado o método de destilação por arraste a vapor com o mini destilador Linax, como descrito por Rostagno *et al.*, (2013), com modificações. As folhas frescas foram inseridas dentro do extrator com água no seu interior, que foi aquecida para produção de vapor. Na saída do destilador, encontram-se um condensador e um funil de separação. Nesse ponto, após ser resfriado pela água, o vapor é condensado e armazenado no funil de separação, onde a divisão entre água e óleo ocorre devido às diferenças de densidade. A amostra apresentou rendimento médio de 0,1 mL para cada 100g de massa vegetal.

Para obtenção do extrato etanólico bruto, adotou-se o método preconizado por de Souza-Melo *et al.* (2021), com modificações. As folhas frescas de *E. luschnathiana* foram inseridas no percolador com álcool etílico hidratado 96° durante 72h para obtenção da solução extrativa. Esse processo foi repetido 3 vezes, para a extração efetiva de todos os componentes. Essa solução foi concentrada em um rotaevaporador sob pressão reduzida a uma temperatura média de 45°C para obtenção do extrato etanólico bruto (EEB). O EEB apresentou rendimento médio de 4,4 g por 100 g de massa vegetal.

2.3 MICRORGANISMOS E REAGENTES

Foram utilizadas cepas de *C. albicans* ATCC 76645 e *C. albicans* ATCC 90028 pertencentes a coleção da American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, EUA). As cepas clínicas, pertencentes à coleção de microrganismos do Laboratório de Farmacologia Experimental e Cultivo Celular da Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brasil, foram previamente isoladas, em estudos anteriores, da cavidade bucal de pacientes sob tratamento oncológico: *C. albicans* (A1), *C. albicans* (A5), *C. glabrata* (A14), *C. krusei* (A18), *C. glabrata* (A19),

C. tropicalis (A20). A coleta foi previamente aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde sob número 706.409.

O meio de cultura RPMI-1640, Nistatina, DMSO (dimetil sulfóxido) e ergosterol 400µg/mL, utilizados durante os ensaios, foram oriundos da Sigma-Aldrich® Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). O sorbitol 0,8M (D-sorbitol anidro) foi obtido do INLAB® (São Paulo, Brasil) e foi usado Ágar Sabouraud Dextrose da KASVI® (Kasv Imp e Dist e Prod) da Laboratórios LTDA (Curitiba, Brasil).

2.4 CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA

2.4.1 Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas

Para caracterizar e identificar os componentes do OE foi realizada a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM). Para tal, foi utilizado um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas, com coluna capilar e fase estacionária de 5% de fenil e 95% de dimetilpolissiloxano, com 30m de comprimento, 0,25mm de diâmetro interno e 0,25µm de espessura do filme. Inicialmente a temperatura foi programada de 60 a 240°C (3°C/min). O tempo de corrida foi programado para 60 min e a temperatura do forno injetor foi de 250°C. Para o gás de arraste (fase móvel) foi utilizado o Hélio a uma taxa de fluxo de 1,0 mL/min, com a proporção de divisão de 1:20 e volume de injeção de 1µL. A ionização dos componentes foi realizada por impacto de elétron a 70eV, utilizando um detector de 1,25-kV. O modo de operação do espectrômetro foi o SCAN, varrendo uma faixa de massas de 40 a 500 u.m.a (unidade de massa atômica). A fonte de temperatura dos íons foi de 250°C. A amostra do óleo foi injetada a uma concentração de 2 ppm, sendo usado o hexano como solvente.

As análises do cromatograma e espectros de massa foram realizadas comparando seus espectros de massa com os existentes no banco de dados do equipamento. Os parâmetros de integração utilizados foram largura, 3 e inclinação, 2000 (Trindade *et al.*, 2015). Sob as mesmas condições, uma série de hidrocarbonetos (C₁₀ a C₄₀) (Sigma-aldrich®) foi injetado para realização dos cálculos dos índices de retenção dos compostos. Conforme avaliado pelas bibliotecas (Nist 08 e Wiley 9) utilizadas na identificação dos compstos, cada índice foi determinado com base em uma similaridade superior a 89%. Os índices de retenção foram determinados utilizando o cromatograma obtido com base na equação de Van Den Dool e Kratz (Van Den Dool *et al.*, 1963).

2.4.2 Screening Fitoquímico

Para EEB, os ensaios foram realizados de acordo com a metodologia proposta por Matos (1997), com modificações. Os extratos foram submetidos a testes de: alcaloides, esteroides, taninos, flavonoides e saponinas.

Teste para alcaloides

O EEB de *E. luschnathiana* foi evaporado até *secura*, alcalinizando-se com 0,8 mL de NaOH 1%. Foram acrescentados 6 mL de água destilada e 6 mL de CHCl₃ para filtrar e separar o extrato da camada clorofórmica. A essa camada, foi adicionado 6 mL de HCl 1%. Após decantação, 1 mL da camada superior de HCl foi utilizada para realização dos testes com os reagentes Bouchardat, Mayer, Dragendorff e Ácido Sílico tungstico. A presença de alcaloides foi identificada a partir da formação de precipitado.

Teste para esteroides

Para identificação de esteroides, 2,5 mL de CHCl₃ foram acrescentados ao extrato e dissolvidos para posterior distribuição em tubos de ensaio (0,12; 0,25 e 0,5 mL). Em cada tubo foram adicionados 2 mL de CHCl₃ e 1 mL de anidrido acético e, após agitação, adicionou-se 2 mL de H₂SO₄. Os resultados foram lidos de acordo com o preparo contendo colesterol, esteroide padrão.

Teste para taninos

Para este ensaio, 10 mL de água destilada foram acrescentados ao extrato para posterior filtragem. A solução obtida foi distribuída em 6 tubos de ensaio, três com gelatina 0,5% e três com FeCl₃ 2%. A presença de taninos foi observada a partir da mudança de cor das soluções.

Teste para flavonoides

15 mL de água destilada foram adicionadas ao extrato de *E. luschnathiana* e, após agitação, colocada em repouso. Em seguida, acrescentou-se 15 mL de clorofórmio, a solução foi deixada em repouso até a separação das camadas para posterior descarte da camada clorofórmica. Esse procedimento foi repetido até que não houvesse mais clorofila. A solução obtida foi submetida à rotaevaporação para, então, adicionar 3 mL de metanol. Esse preparo foi adicionado a 2 tubos de ensaio,

o primeiro contendo 0,5 mL de HCl a 10% e 1 fita de magnésio, o segundo contendo acetona 0,05 mg de ácido oxálico e 0,05 mg de ácido bórico, com posterior adição de 10 mL de éter etílico. A presença de flavonoides foi determinada pela coloração rosa no primeiro tubo, bem como de fluorescência sob luz U.V. no segundo tubo.

Teste para saponinas

A presença de saponinas foi determinada a partir da agitação do extrato com 10 mL de H₂O. Após repouso de 10 min, a formação de espuma indica presença de saponina.

2.4.3 Espectroscopia de Ressonância Nuclear Magnética (RNM) de ¹H do extrato de *E. luschnathiana*

Uma alíquota de 20 mg do extrato de *E. luschnathiana* foi solubilizado em 600 µL de metanol deuterado, a suspensão foi submetida a um banho ultrassônico por 30 min e filtrada. A solução resultante (550 µL) foi posta em um tubo de 5 mm de diâmetro para análise na Ressonância Nuclear Magnética (RNM). Os ensaios foram realizados no equipamento Bruker Ascend operando a 400 MHz por ¹H-NMR e em 100 MHz por ¹³C-NMR (Bruker, Billerica, MA, USA). Os seguintes parâmetros foram utilizados para obter a sequência de espectros: zg30; temperatura: 26 °C; número de scans: 16; dummer scan: 4; ganho do receptor: 64; tempo de aquisição: 4.0894 s. Os espectros foram processados utilizando o software Bruker TopSpin 4.1.1 (Rhone *et al.*, 2024)

2.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA (CFM)

Baseando-se no protocolo preconizado pelo Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2008), a CIM, menor concentração capaz de inibir visualmente o crescimento fúngico, foi determinada pela técnica de microdiluição em RPMI-1640. As cepas usadas foram suspensas em solução de 0.9% NaCl, com faixa de absorvância de 0.08 a 0.13, equivalente à transmitância de 0.5 da escala McFarland, em um comprimento de onda de 530nm. Em seguida, foram realizadas sucessivas diluições para obtenção do inóculo com concentração final entre 5x10² a 2,5x10³ UFC/mL. Para as diluições em série, foram utilizadas placas estéreis de 96 poços, de fundo chato, contendo RPMI-1640. Estas foram

incubadas por 24h a 35°C e os resultados foram lidos a partir da observação de agregados de células no fundo dos poços. O óleo essencial foi testado em concentrações que variaram de 1000 µg/mL a 7,81 µg/mL e o EEB foi testado em concentrações que variaram de 62,5 µg/mL a 0,48 µg/mL. DMSO (dimethyl sulfoxide) (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brazil) e o Tween 80 (Sigma-Aldrich) foram usados para preparo das soluções. Nistatina (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brazil) foi usada como controle positivo. Foram realizados controles para assegurar esterilidade do meio de cultura e ausência de efeito antifúngico do DMSO (5%) e Tween 80 (2%).

A CFM, definida como menor concentração da substância capaz de inibir o crescimento visível em meio sólido, foi determinada a partir do subcultivo em placas de Petri contendo Ágar Sabouraud Dextrose de alíquotas de 20µL correspondentes à CIM e às duas concentrações imediatamente mais concentradas (CIMx2 e CIMx4). As placas foram incubadas por 24h a 35°C e a leitura dos resultados foi a partir da observação de crescimento fúngico no meio de cultura. A razão CFM/CIM foi calculada para determinar se a substância possui atividade fungicida (CFM/CIM<4) ou fungistática (CFM/CIM>4) (POPIOŁEK *et al.*, 2016). Todos os experimentos foram realizados em triplicata e em três experimentos independentes.

2.6 AÇÃO DO EXTRATO DA FOLHA DE *E. luschnathiana* SOBRE PAREDE E MEMBRANA CELULAR FÚNGICAS

2.6.1 EFEITO DO EXTRATO SOBRE PAREDE CELULAR FÚNGICA

Este ensaio tem objetivo avaliar o possível mecanismo de ação do produto teste sobre estruturas que afetam a função da parede celular fúngica. O sorbitol é um protetor osmótico e o aumento dos valores de CIM em meios com adição do mesmo implicará na determinação da parede celular como um dos possíveis alvos celulares do composto testado (Lima *et al.*, 2012). Para este teste foi realizada a técnica de microdiluição. Inicialmente, foram adicionados 100µL de RPMI-1640 em cada poço, seguido da adição de 100µL da substância teste nos primeiros poços. Foi realizada uma microdiluição seriada a uma razão de 2 para serem obtidas concentrações de 62,5 µg/mL a 0,48 µg/mL (Freires *et al.*, 2014). Foram utilizadas as cepas *C. albicans* ATCC 90028 e *C. albicans* (A5) na concentração de 5×10^2 a

2,5x10³ UFC/mL. Foram acrescentadas às placas 100µL destes inóculos, preparados com RPMI-1640 suplementado com sorbitol (0.8 M) e, posteriormente, acrescentados aos poços. As microplacas foram incubadas por 24h a 35°C e a leitura foi realizada a partir da observação de agregados de células no fundo dos poços. Para controle positivo foi utilizado a caspofungina na concentração inicial de 4µg/mL, devido a sua atividade sobre a parede celular fúngica (Perlin, 2011). Os controles de crescimento e de esterilidade foram realizados simultaneamente ao ensaio e este foi realizado em triplicata e em três repetições.

2.6.2 EFEITO DO EXTRATO SOBRE MEMBRANA CELULAR FÚNGICA

Para determinar se o extrato irá interagir com o ergosterol, foi realizada a determinação da CIM contra as cepas *C. albicans* ATCC 90028 e *C. albicans* (A5) na ausência e na presença de ergosterol exógeno, um dos principais esteróis presentes na membrana plasmática, a uma concentração de 400 µg/mL. Para tal, foi utilizada a técnica de microdiluição, já descrita anteriormente, com concentrações do extrato variando de 62,5 µg/mL a 0,48 µg/mL (Freires *et al.*, 2014). Para controle positivo foi utilizado a nistatina na concentração inicial de 48 µg/mL, devido a sua atividade sobre a membrana celular fúngica (Peixoto *et al.*, 2017). O aumento dos valores de CIM em meios com adição de ergosterol implicará na determinação da membrana celular como um dos possíveis alvos celulares do extrato (Lima *et al.*, 2012). Os controles de crescimento e de esterilidade foram realizados simultaneamente ao ensaio e este foi realizado em triplicata e em três repetições.

2.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO EXTRATO SOBRE BIOFILME FÚNGICO

Para formação do biofilme, utilizou-se Caldo Sabouraud Dextrose acrescido de glicose 1%. Foi realizada a transferência de amostras de 1 mL do inóculo de *C. albicans* ATCC 90028, com aproximadamente 10⁶ UFC/mL, para placas de microdiluição de 24 poços, que foram incubadas por 48 h a 35°C. Após incubação, os poços foram submetidos a lavagens com solução salina tamponada com fosfato (PBS) para remoção de células fracamente aderidas. Posteriormente, foram acrescentados meio de cultura esterilizado, seguido da adição do EEB de *E. luschnathiana* nas concentrações pré-determinadas determinadas: CIM (1,95

µg/mL); CIMx2 (3,90 µg/mL); CIMx4 (7,8 µg/mL); CIMx10 (19,5 µg/mL) e da nistatina (controle positivo) nas concentrações de CIM (1,5 µg/mL); CIMx2 (3 µg/mL); CIMx4 (6 µg/mL); CIMx10 (15 µg/mL). As placas foram incubadas novamente por 48 horas a 35°C. Para quantificação do biofilme, os poços foram submetidos a duas lavagens com PBS, seguidas de secagem ao ar durante 45 min. O biofilme foi corado com 0,4 % de solução de cristal violeta e, após lavagem, adicionou-se 1 mL de álcool etílico 99%. A leitura foi realizada utilizando um leitor de microplacas com comprimento de onda de 595 nm (Djordjevic, Wiedmann e Mclandsborough 2002).

2.8 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE SOBRE QUERATINÓCITOS HUMANOS

O ensaio de redução do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) foi empregado para avaliar a citotoxicidade do extrato etanólico de *E. luschnathiana* contra a linhagem celular de queratinócitos humanos HaCaT. Este método envolve a avaliação da viabilidade e proliferação celular através da atividade redutora de enzimas mitocondriais e citoplasmáticas. O MTT é um corante amarelo solúvel em água convertido em cristais de formazan azul-púrpura insolúveis no citosol celular viável pela atividade de desidrogenases, principalmente a desidrogenase do succinato. Em seguida, a quantidade de formazan produzida é diretamente proporcional ao número de células viáveis (Mosmann, 1983; Kumar *et al.*, 2018).

A linhagem celular HaCaT foi obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ - Brasil) e cultivada em meio DMEM (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB; GIBCO, Grand Island, NY, EUA) e 1% de penicilina-estreptomicina (Sigma Aldrich), mantida a 37 °C com 5% de CO₂. As células foram semeadas em placas de 96 poços (3 x 10⁵ células/mL). Após 24 horas, as células foram tratadas com o extrato em diferentes concentrações (0,487; 0,975; 1,95; 3,9; 7,8; 19,5; 39 e 78 µg/mL) por 72 horas. Após o tratamento, 110 µL de sobrenadante foram removidos, e 10 µL de solução de MTT (5 mg/mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foram adicionados por mais 4 horas. Após isso, 100 µL de uma solução de ácido clorídrico de dodecil sulfato de sódio a 10% (SDS-HCl) foram adicionados para dissolver os cristais de formazan produzidos. A absorbância foi medida usando um espectrofotômetro (leitor de microplacas BioTek

Instruments, Sinergy HT, Winooski, VT, EUA) em um comprimento de onda de 570 nm.

Três experimentos independentes foram conduzidos em quadruplicado. Os resultados são expressos como a média da porcentagem de viabilidade celular \pm EP (erro padrão da média) e foram comparados por análise de variância unidirecional (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

2.9 ENSAIO DE TOXICIDADE SOBRE *Artemia salina*

Com o intuito de estabelecer um perfil prévio de toxicidade, adotou-se o protocolo estabelecido por Meyer *et al.* (1982), com modificações (Oliveira *et al.*, 2021). Para tal, os cistos de *Artemia salina* foram incubados a 28°C durante 48h em um sistema aerado para que atingissem o estágio de maturação de metanúplios. Após o período de incubação, o extrato foi preparado nas concentrações 1.95, 3.9, 7.8, 19.5, 39, 97.5 e 195 $\mu\text{g/mL}$ e acrescido em falcons contendo 10 larvas de *A. salina*. Como solventes, foram utilizados a água do mar artificial (NaCl 3,5%) e o DMSO a uma proporção de 95:5. Após 24 h de exposição, as larvas mortas foram contabilizadas e o valor da concentração letal mediana (Cl_{50}) estabelecido a partir do modelo estatístico regressão dose-resposta que é adequado para dados binários ou de contagem, como os resultados de sobrevivência ou mortalidade em diferentes doses. O lauril sulfato de sódio foi utilizado como controle positivo e o ensaio foi realizado em triplicata.

3. RESULTADOS

3.1 CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL

Os componentes majoritários presentes no OE de *E. luschnathiana* foram tabulados de acordo com o nome, tempo de retenção (TR), área (%), índice de kovats experimental e índice de kovats da literatura, de acordo com a biblioteca NIST (Tabela 1). Foram identificados 20 componentes, com predominância de compostos sesquiterpenos: β -Cariofileno (26,34%), β -Spathulenol (11,88%), Bicyclogermacrene (11,44%) e (+) Óxido de Cariofileno (9,39%).

Tabela 1. Composição fitoquímica do óleo essencial de *E. luschnathiana* por CG-EM

Componente	TR (min)	Area (%)	KI (exp.)	KI (lit)
β -Cariofileno	14,48	26,34	1445	1416
β -Spathulenol	16,60	11,88	1606	1572
Bicyclogermacrene	15,51	11,44	1523	1505
(+) Caryophyllene oxide	16,70	9,39	1614	1581
Germacrene D	15,30	6,35	1507	1519
α -Humulene (CAS)	14,94	6,23	1480	1488
β -Bourbonene	13,95	4,75	1405	1412
Spathulenol	17,33	3,66	1661	1622
α -Copaene	13,79	3,06	1393	1376
δ -Cadinene	15,79	2,88	1544	1524
Salvial-4(14)-en-1-one	16,81	2	1622	1599
Thymol	12,42	1,99	1290	1292
γ -Muurolene	15,19	1,88	1499	1481
Humulene epoxide II	17,02	1,44	1638	1620
1,10-di-epi-Cubenol	17,19	1,44	1650	1619
Caryophyllene <9-epi-(E)->	15,05	1,30	1449	1455
Aromadendrene	14,74	1,06	1465	1484
α -Cadinol	17,51	1,01	1675	1673
β -CubEEBne	14,58	0,96	1452	1388
β -Selinene	15,39	0,94	1514	1489

TR = Tempo de retenção; KI (exp.) = Índice de kovats experimental; KI (lit.) = Índice de kovats da literatura

Fonte: Dados coletados pelos autores.

3.2 CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO

Os ensaios qualitativos para detecção de metabólitos secundários possibilitaram a identificação de taninos e flavonoides no extrato, ambos moderadamente positivos. Os resultados para alcaloides, esteroides e saponinas foram negativos (Tabela 2).

Tabela 2. Resultados obtidos na triagem de grupos funcionais do extrato de *E. luschnathiana*

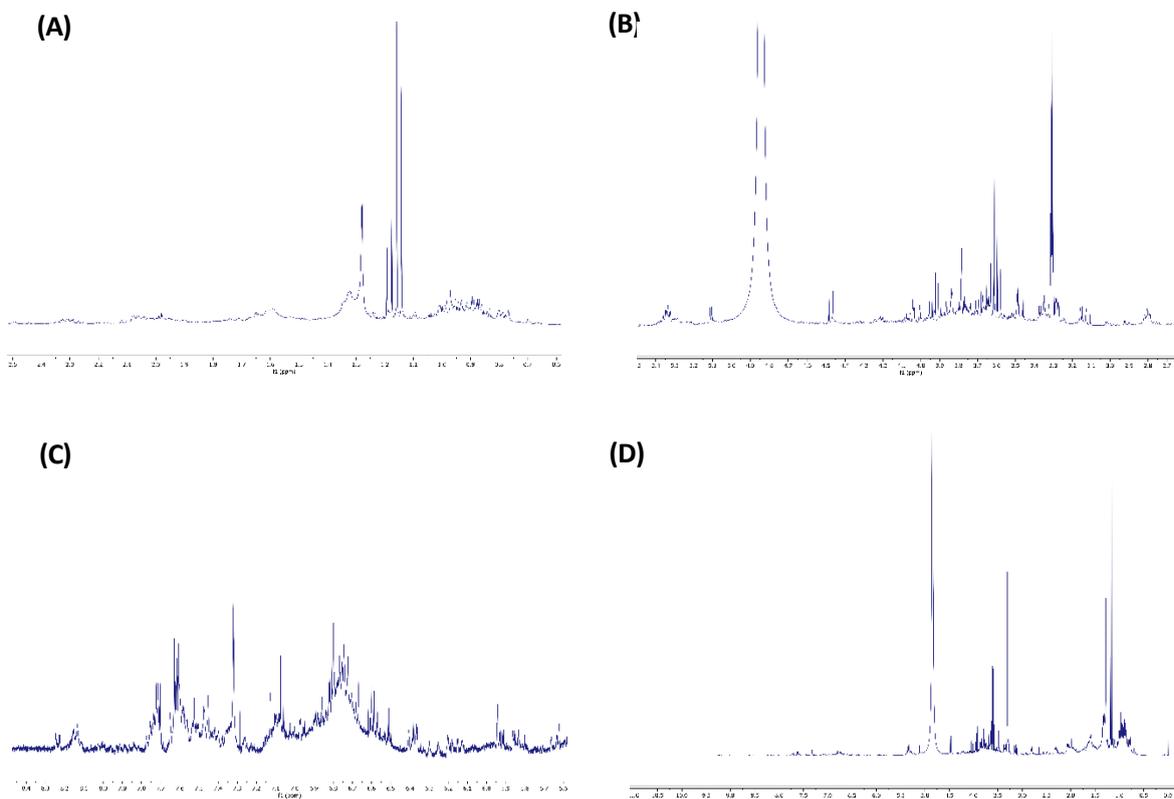
Testes realizados	Extrato de <i>E. luschnathiana</i>
-------------------	------------------------------------

Alcaloides	-
Esteroides	-
Taninos	++
Flavonoides	++
Saponinas	-

Fortemente positivo (+++); Moderadamente positivo (++); Positivo (+); Negativo (-)

No espectro de RMN de ^1H foi possível observar sinais nas regiões de δH 2,5-0,6 ppm compatíveis com a presença de compostos com cadeia carbônica alifática. Na região de δH 5,3-3,0 ppm, os sinais presentes são compatíveis com hidrogênios pertencentes a unidades osídicas, enquanto os sinais na região de δH 8,8-6,0 ppm indicam a presença de compostos aromáticos ou com hidrogênios olefínicos. Dessa forma, uma impressão digital do EEB de *E. luschnathiana* foi obtida por RMN de ^1H , ampliando a caracterização química de sua composição, além de auxiliar em sua autenticidade.

Figura 1. Atribuição dos espectros de RMN 1D do extrato de *E. luschnathiana*. (A) Expansão do espectro de RMN de ^1H de 2,5 a 0,6 ppm. (B) Expansão do espectro de RMN de ^1H de 5,5 a 2,6 ppm (C) Expansão do espectro



de RMN de ^1H de 8,5 a 5,6 ppm (D) Expansão do espectro de RMN do extrato de *E. luschnathiana*

3.3 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA (CFM)

Os valores de CIM e CFM do EEB, do OE e do controle positivo, nistatina, estão expressos na tabela 2. Os valores de CIM e CFM do EEB variaram de 1,5 $\mu\text{g/mL}$ a 3,90 $\mu\text{g/mL}$, enquanto o OE apresentou uma CIM $>1000 \mu\text{g/mL}$ para todas as cepas testadas. A concentração da nistatina não apresentou variação, sendo igual a 1,5 $\mu\text{g/mL}$ para todas as cepas ensaiadas. A razão CFM/CIM indica uma ação fungicida para ambas as substâncias testadas.

Tabela 3. CIM e CFM do extrato e óleo essencial de *E. luschnathiana* e nistatina sobre cepas referência de *Candida* spp. e isolados clínicos de cavidade bucal de pacientes oncológicos (A). Valores das concentrações expressos em $\mu\text{g/mL}$.

Cepa	Extrato de <i>E. luschnathiana</i>			OE de <i>E. luschnathiana</i>			Nistatina		
	CIM	CFM	CFM/ CIM	CIM	CFM	CFM/ CIM	CIM	CFM	CFM/CIM
<i>C. albicans</i> ATCC 76645	1,95	1,95	1	>1000	>1000	>1	1,5	1,5	1
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	1,95	1,95	1	>1000	>1000	>1	1,5	1,5	1
<i>C. albicans</i> (A1)	3,90	3,90	1	>1000	>1000	>1	1,5	1,5	1
<i>C. albicans</i> (A5)	1,95	1,95	1	>1000	>1000	>1	1,5	1,5	1
<i>C. glabrata</i> (A14)	1,95	1,95	1	>1000	>1000	>1	1,5	1,5	1
<i>C. krusei</i> (A18)	1,95	1,95	1	>1000	>1000	>1	1,5	1,5	1
<i>C. glabrata</i> (A19)	1,95	1,95	1	>1000	>1000	>1	1,5	1,5	1
<i>C. tropicalis</i> (A20)	3,90	3,90	1	>1000	>1000	>1	1,5	1,5	1

Nota: CFM/CIM > 4 = atividade fungistática; CFM/CIM < 4 = atividade fungicida (Popiolek *et al*, 2016)

Fonte: Dados coletados pelos autores.

3.4 AÇÃO DO EXTRATO DA FOLHA DE *E. luschnathiana* SOBRE PAREDE E MEMBRANA CELULAR FÚNGICAS

A CIM do extrato aumentou na presença do sorbitol de 1,95 µg/mL para 3,90 para ambas as cepas testadas, assim como o controle positivo, caspofungina, um agente conhecido por sua atividade sobre a parede celular fúngica. Na presença de ergosterol exógeno, no entanto, a CIM permaneceu inalterada para o extrato, diferente da nistatina, substância usada como controle positivo (de 1,5 µg/mL para 6 µg/mL).

Tabela 4. Valores da CIM do extrato de *E. luschnathiana* e Caspofungina na ausência e presença de sorbitol 0.8M contra cepas de *C. albicans* ATCC 90028 e *C. albicans* (A5). Valores expressos em µg/mL.

Concentração (µg/mL)	<i>E. luschnathiana</i>				Concentração (µg/mL)	Caspofungina			
	<i>C. albicans</i> ATCC 90028		<i>C. albicans</i> A5			<i>C. albicans</i> ATCC 90028		<i>C. albicans</i> A5	
	Sem sorbitol	Com sorbitol	Sem sorbitol	Com sorbitol		Sem sorbitol	Com sorbitol	Sem sorbitol	Com sorbitol
62,5	-	-	-	-	4	-	-	-	-
31.25	-	-	-	-	2	-	+	-	-
15.62	-	-	-	-	1	-	+	-	+
7.81	-	-	-	-	0.5	-	+	-	+
3,90	-	-	-	-	0.25	-	+	-	+
1,95	-	+	-	+	0.125	-	+	-	+
0,97	+	+	+	+	0.062	+	+	-	+
0,48	+	+	+	+	0.031	+	+	+	+

Nota: +, presença de crescimento fúngico; -, ausência de crescimento fúngico

Fonte: Dados coletados pelos autores

Tabela 5. Valores da CIM do extrato de *E. luschnathiana* e Nistatina na ausência e presença de ergosterol exógeno (400 µg/mL) contra cepas de *C. albicans* ATCC 90028 e *C. albicans* (A5). Valores expressos em µg/mL.

Concentração (µg/mL)	<i>E. luschnathiana</i>		Concentração (µg/mL)	Nistatina	
	<i>C. albicans</i> ATCC 90028	<i>C. albicans</i> (A5)		<i>C. albicans</i> ATCC 90028	<i>C. albicans</i> (A5)

	(µg/mL)								
	Sem ergost erol	Com ergost erol	Sem ergost erol	Com ergost erol		Sem ergost erol	Com ergost erol	Sem ergost erol	Com ergost erol
62,5	-	-	-	-	48	-	-	-	-
31.25	-	-	-	-	24	-	+	-	+
15.62	-	-	-	-	12	-	+	-	+
7.81	-	-	-	-	6	-	+	-	+
3,90	-	-	-	-	3	-	+	-	+
1,95	-	-	-	-	1.5	+	+	+	+
0,97	+	+	+	+	0.75	+	+	+	+
0,48	+	+	+	+	0.37	+	+	+	+

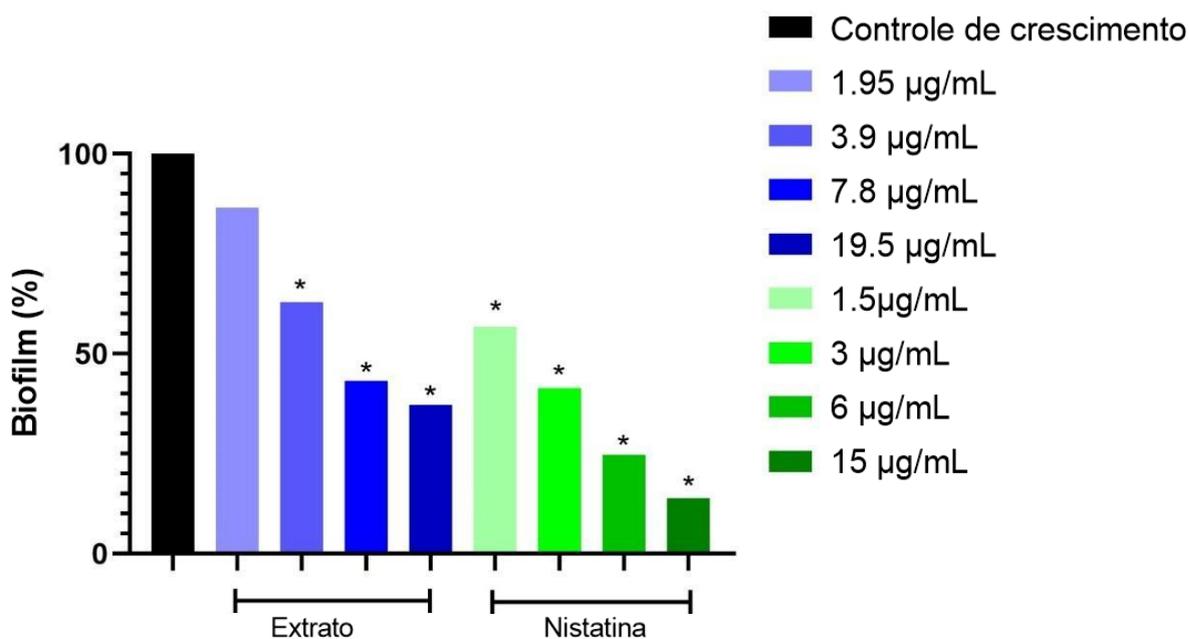
Nota: +, presença de crescimento fúngico; -, ausência de crescimento fúngico

Fonte: Dados coletados pelos autores

3.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO SOBRE BIOFILME FÚNGICO

A figura 1 ilustra a atividade antibiofilme do extrato em biofilme pré-formado. Observou-se uma redução de 13% do biofilme fúngico na concentração equivalente à CIM, com reduções significativas ($P < 0.05$) a partir de 3.9 µg/mL. O extrato também apresentou redução de biofilme em 56,67% na CIMx4 e em 62,78% na CIMx10. A nistatina, controle positivo, apresentou redução significativa do biofilme fúngico a partir da CIM (43,32%).

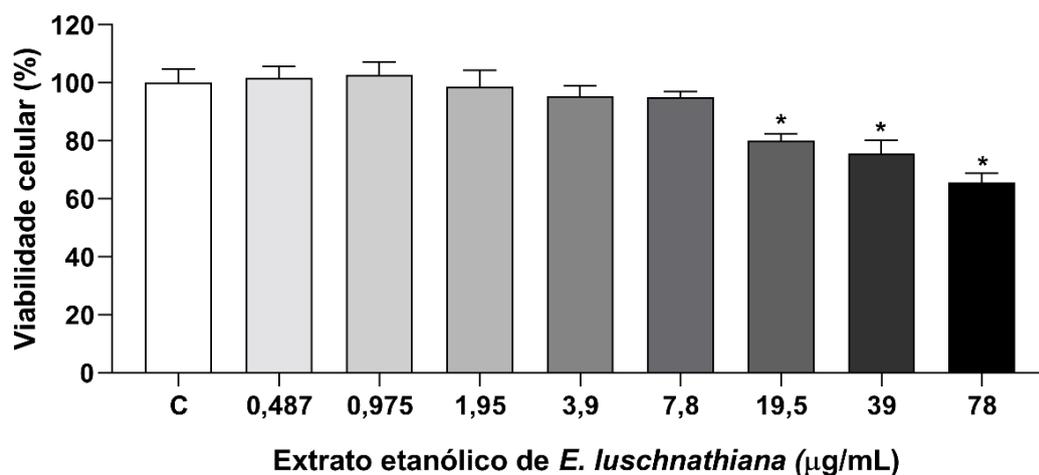
Figura 2. Efeito inibitório do extrato de *E. luschnathiana* e nistatina sobre biofilme de *C. albicans* ATCC 90028. Resultados apresentados como média ± DP de três experimentos independentes realizados em triplicata. (ANOVA um fator seguido pelo pós-teste de Tukey, $p < 0,05$).



3.6 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE SOBRE QUERATINÓCITOS HUMANOS

O potencial citotóxico do extrato etanólico de *E. luschnathiana* foi avaliado na linhagem celular de queratinócitos humanos HaCaT após 72 horas de tratamento. Observou-se que o extrato impactou a viabilidade celular apenas nas três concentrações mais altas testadas (MICx10, MICx20 e MICx40), resultando em reduções de 19,93%, 24,36% e 34,26% nesse parâmetro, respectivamente (Figura 1). Além disso, a concentração inibitória de 50% (IC₅₀) não pode ser calculada devido ao fraco efeito citotóxico do extrato nas concentrações testadas. Portanto, pode-se considerar que o IC₅₀ é maior que 78 µg/mL.

Figura 3. Atividade citotóxica do extrato etanólico de *E. luschnathiana* na linhagem de queratinócitos humanos HaCaT após 72 h de tratamento.

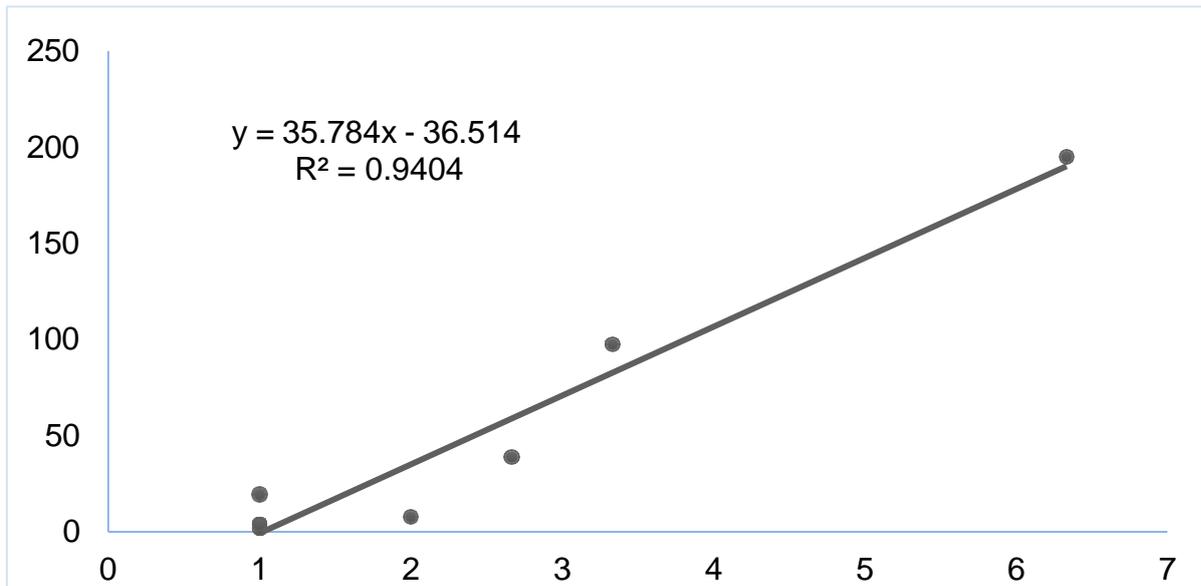


Nota: Dados obtidos de três experimentos independentes realizados em quadruplicata e apresentados como porcentagem média de viabilidade celular \pm EPM, sendo comparados por análise de variância (ANOVA) *one-way*, seguido pelo teste de Tukey. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle.

3.7 ENSAIO DE TOXICIDADE SOBRE *Artemia salina*

A partir da equação obtida pela técnica de regressão linear, obteve-se uma CL_{50} de 142,4 µg/mL para o extrato de *E. luschnathiana*. O controle positivo (Lauril Sulfato de Sódio) apresentou mortalidade de 100%, não houve mortes no controle negativo, indicando que o solvente utilizado não apresentou atividade tóxica sobre *A. salina*.

Figura 4. Curva de regressão linear para determinação da CL₅₀ do Extrato de *E. luschnathiana* sobre *Artemia salina*.



Fonte: Dados coletados pelos autores

4. DISCUSSÃO

Produtos de origem vegetal são constantemente associados a atividades antimicrobianas em decorrência de sua complexa composição química que pode incluir alcaloides, taninos, terpenoides, flavonoides, entre outros componentes orgânicos. Essa ação se deve, essencialmente, aos fitocomplexos, que podem levar ao sinergismo dos componentes e à potencialização de seus efeitos individuais (Rahman *et al.*, 2021). Assim, a análise dos constituintes químicos desses produtos possibilita o delineamento de suas principais características. Com esse intuito, foi realizada caracterização do óleo essencial por CG-EM, bem como uma triagem fitoquímica e análise por Ressonância Magnética Nuclear de ¹H do extrato etanólico bruto de *E. luschnathiana*. Em consonância com outras espécies de *Eugenia* spp. e estudo realizado por Monteiro *et al.* (2016) para determinar o perfil fitoquímico do óleo essencial de *E. luschnathiana*, a análise por CG-EM demonstrou a prevalência de compostos sesquiterpenos. No entanto, Monteiro *et al.* (2016) identificou como principais compostos o 2- β-Hexenal, α-Thujen e α-Pinene, enquanto a presente análise apresentou β-Caryophyllene, β-Spathulenol e Bicyclogermacrene como componentes predominantes. Essa divergência pode

ser devido a fatores ambientais, climáticos e o período de realização da coleta, estes influenciam diretamente na composição e nas propriedades dos óleos essenciais (da Costa *et al.*, 2020).

Os principais metabólitos secundários encontrados no extrato foram taninos e flavonoides. Os taninos possuem sua atividade anti-inflamatória, antiviral, antibacteriana e antifúngica bem descrita na literatura, assim como os flavonoides. Compostos alifáticos e aromáticos, presentes no extrato de *E. luschnathiana*, são grupos funcionais comumente associados a constituintes com atividade fungicida (Seleem *et al.*, 2017; T Morey *et al.*, 2016; Wei *et al.*, 2017).

Na literatura, o potencial antimicrobiano de espécies do gênero *Eugenia* é bem demonstrado. Araújo (2018) investigou a atividade do OE de *E. luschnathiana* sobre bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermis*) e Gram negativas (*Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*) e identificou uma fraca atividade. Neste estudo não observamos susceptibilidade de cepas de *Candida* frente ao OE de *E. luschnathiana*. Estudo prévio demonstrou que o β -Caryophyllene, componente majoritário presente no OE, apresenta fraca bioatividade sobre cepas de *S. aureus*, *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Enterococcus faecalis*, *Aspergillus niger*, *A. fumigates*, *A. parasiticum* e *Fusarium solani* (Selestino Neta *et al.*, 2017).

De acordo com classificação proposta na literatura, o EEB apresentou atividade de caráter fungicida muito forte sobre as cepas referência e isolados clínicos (1,95 $\mu\text{g/mL}$ e 3,90 $\mu\text{g/mL}$) (Ferreira *et al.*, 2021). Estudos prévios demonstraram que extratos de *E. leitonii* e *E. brasiliensis* apresentaram atividade antifúngica sobre cepas de *C. albicans* ATCC 90028 (Sardi *et al.*, 2017). Diversas espécies de *Candida* podem ser encontradas na cavidade oral de pacientes oncológicos avançados, onde há uma prevalência de 36%-86% de infecções mistas. O aumento da presença de espécies além da *C. albicans* promove um quadro clínico mais complexo e com consequências diretas no plano de tratamento (Monsen *et al.*, 2023). O uso de cepas isoladas de pacientes com câncer é relevante para estudos *in vitro*, dada a predominância da candidíase oral nessa população. A atividade fungicida do EEB sobre essas cepas é, então, promissora para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

Terpenos e flavonoides podem ter seu mecanismo de ação associado à parede celular fúngica de cepas do gênero *Candida* (Martínez *et al.* 2014; Nguyen

et al., 2021). A CIM do EEB de *E. luschnathiana*, na presença de sorbitol aumentou de 1,95 µg/mL para 3,90 µg/mL, enquanto na presença do ergosterol exógeno esses valores se mantiveram inalterados. Sugere-se, portanto, um possível efeito sobre a parede celular e não sobre membrana plasmática. Produtos que exerçam seus efeitos sobre estruturas da parede celular, ausente em células humanas, possuem uma vantagem adicional uma vez que há uma estimativa de menor efeito adverso (Liu, Yuan e Wang, 2020).

Candida spp. possui a habilidade de formar biofilmes altamente tolerantes a ação de medicamentos no organismo humano, inviabilizando os tratamentos disponíveis. Esses biofilmes consistem em uma comunidade dinâmica e estruturada de diversos tipos celulares, sendo um importante fator de virulência (de Barros *et al.*, 2020). A atividade anti-biofilme do EEB de *E. luschnathiana* em baixas concentrações (3,90 µg/mL; 7,81 µg/mL; 19,5 µg/mL) demonstra seu potencial como possível alternativa no tratamento da candidíase oral.

A toxicidade de produtos naturais pode se originar de diversos fatores, incluindo seus constituintes químicos. Avaliar esse potencial é uma etapa essencial no avanço de futuras fases clínicas. Diversos testes podem ser usados para determinar o perfil toxicológico preliminar de extratos naturais. Dentre os métodos utilizados estão o uso de queratinócitos humanos, que desempenham papel fundamental no epitélio oral, e ensaios biológicos alternativos, tais como os realizados com a *A. salina* (Alves *et al.*, 2020; Hamidi *et al.*, 2014).

No ensaio para avaliar a citotoxicidade em queratinócitos humanos não-tumorais, o EEB de *E. luschnathiana*, quando comparado ao grupo controle (100% de viabilidade celular) permitiu viabilidade celular de 75% em concentrações menores que a CIMx20 (39 µg/mL). Na maior concentração testada, CIMx40 (78 µg/mL) o EEB se mostrou levemente tóxico, ou seja, o extrato apresentou toxicidade em valores muito acima daqueles usados para atividade antimicrobiana. Outros estudos investigaram a citotoxicidade sobre queratinócitos HaCat de extratos do gênero *Eugenia*, como *E. dysenterica* DC., este manteve 80% da viabilidade celular em concentrações de até 160 µg/mL (Moreira *et al.*, 2017). Os achados indicam perfil toxicológico promissor.

Testes de toxicidade em *A. salina* com o extrato de *E. luschnathiana* apresentaram resultados promissores, com valores de CL₅₀ acima de 2590 µg/mL, indicando um perfil de toxicidade compatível com estudos que incluam animais

mais complexos, como os roedores (Araújo, 2018). Neste estudo, identificamos que CL₅₀ do EEB de *E. luschnathiana* é de 142,4 µg/mL. Essa concentração equivale a aproximadamente 70 vezes a concentração capaz de inibir o crescimento de *Candida* spp. O uso de modelos alternativos possibilita a realização de triagens quanto à toxicidade com forte evidência científica, proporcionando significativa redução de custos e de animais sacrificados (Freires *et al.*, 2017).

O EEB *E. luschnathiana* representa uma opção promissora para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas no tratamento de infecções causadas por *Candida* spp. Nossos resultados sugerem que novas investigações sejam conduzidas para elucidação do mecanismo de ação, ampliação da caracterização toxicológica, incluindo modelos experimentais com roedores, bem como ensaios clínicos para avaliação da segurança e efetividade do produtos para tratamento de infecções fúngicas superficiais, incluindo candidíase bucal, causadas por *Candida* spp..

5. CONCLUSÃO

O EEB de *E. luschnathiana* apresenta, especialmente, flavonoides e terpenos e possui atividade fungicida muito forte sobre espécies de *Candida*, com possível mecanismo de ação via parede celular fúngica, o EEB apresenta efeito anti-biofilme em baixas concentrações e perfil de toxicidade favorável à sobrevivência de *A. salina*. O OE de *E. luschnathiana* é composto principalmente por sesquiterpenos, sendo β-Cariofileno o composto majoritário. Esse produto não apresentou efeito sobre *Candida* spp.

REFERÊNCIAS

ALVES, D.N., FERREIRA, A.R., DUARTE, A.B.S., MELO, A.K.V., SOUSA, D.P. and CASTRO, R.D., 2021. Breakpoints for the Classification of Anti-Candida Compounds in Antifungal Screening. *BioMed Research International*, vol. 2021, pp. 6653311. <http://doi.org/10.1155/2021/6653311> PMID:33880374.

ALVES, D., MONTEIRO, A.F.M., ANDRADE, P.N., LAZARINI, J.G., ABÍLIO, G.M.F., GUERRA, F.Q.S., SCOTTI, M.T., SCOTTI, L., ROSALEN, P.L. and DE CASTRO, R.D., 2020. Docking prediction, antifungal activity, anti-biofilm effects on *Candida* spp., and toxicity against human cells of cinnamaldehyde. *Molecules*, vol. 25, no. 24, pp. 5969. <http://doi.org/10.3390/molecules25245969> PMID:33339401.

ARAÚJO, R.D., 2018. Investigação química de *Eugenia luschnathiana*: determinação da composição volátil, isolamento e identificação de triterpenos oleananos e ursanos. Natal: Federal Rural University of Pernambuco, 214 p. PhD Thesis in Chemistry.

BARROS, P.P., ROSSONI, R.D., DE SOUZA, C.M., SCORZONI, L., FENLEY, J.D.C. and JUNQUEIRA, J.C., 2020. *Candida* biofilms: an update on developmental mechanisms and therapeutic challenges. *Mycopathologia*, vol. 185, no. 3, pp. 415-424. <http://doi.org/10.1007/s11046-020-00445-w> PMID:32277380.

CHOWDHARY, A., JAIN, K. and CHAUHAN, N., 2023. *Candida auris* genetics and emergence. *Annual Review of Microbiology*, vol. 77, no. 1, pp. 583-602. <http://doi.org/10.1146/annurevmicro-032521-015858> PMID:37406342.

CONTALDO, M., DI STASIO, D., ROMANO, A., FIORI, F., DELLA VELLA, F., RUPE, C., LAJOLO, C., PETRUZZI, M., SERPICO, R. and LUCCHESI, A., 2023. Oral candidiasis and novel therapeutic strategies: antifungals, phytotherapy, probiotics, and photodynamic therapy. *Current Drug Delivery*, vol. 20, no. 5, pp. 441-456. <http://doi.org/10.2174/1567201819666220418104042> PMID:35440307.

COSTA, J.S., BARROSO, A.S., MOURÃO, R.H.V., DA SILVA, J.K.R., MAIA, J.G.S. and FIGUEIREDO, P.L.B., 2020. Seasonal and antioxidant evaluation of essential oil from *Eugenia uniflora* L., curzerenerich, thermally produced in situ. *Biomolecules*, vol. 10, no. 2, pp. 328. <http://doi.org/10.3390/biom10020328> PMID:32092893.

DJORDJEVIC, D., WIEDMANN, M. and MCLANDBOROUGH, L.A., 2002. Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 68, no. 6, pp. 2950-2958. <http://doi.org/10.1128/AEM.68.6.2950-2958.2002> PMID:12039754.

FERREIRA, E.S., ROSALEN, P.L., BENSO, B., DE CÁSSIA ORLANDI SARDI, J., DENNY, C., ALVES DE SOUSA, S., QUEIROGA SARMENTO GUERRA, F., DE OLIVEIRA LIMA, E., ALMEIDA FREIRES, I. and DIAS DE CASTRO, R., 2021. The use of essential oils and their isolated compounds for the treatment of oral candidiasis: a literature review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2021, pp. 1059274. <http://doi.org/10.1155/2021/1059274>. PMID:33505486.

FERREIRA, G.L.S., PÉREZ, A.L.A.L., ROCHA, Í.M., PINHEIRO, M.A., DE CASTRO, R.D., CARLO, H.L., LIMA, E.O. and CASTELLANO, L.R., 2015. DEOs scientific evidence for the use of natural products in the treatment of oral candidiasis exist? A systematic review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2015, pp. 1-8. <http://doi.org/10.1155/2015/147804>.

FREIRES, I.A., MURATA, R.M., FURLETTI, V.F., SARTORATTO, A., ALENCAR, S.M., FIGUEIRA, G.M., RODRIGUES, J.A.O., DUARTE, M.C. and ROSALEN, P.L., 2014. *Coriandrum sativum* L.(coriander) essential oil: antifungal activity and mode of action on *Candida* spp., and molecular targets affected in human whole-genome expression. *PLoS One*, vol. 9, no. 6, pp. e99086. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0099086> PMID:24901768.

FREIRES, I.A., SARDI, J., DE CASTRO, R.D. and ROSALEN, P.L., 2017. Alternative animal and non-animal models for drug discovery and development: bonus or burden? *Pharmaceutical Research*, vol. 34, no. 4, pp. 681-686. <http://doi.org/10.1007/s11095-016-2069-z> PMID:27858217.

HAMIDI, M.R., JOVANOVA, B. and PANOVSKA, T.K., 2014. Toxicological evaluation of the plant products using Brine Shrimp (*Artemia salina* L.) model. *Macedonian Pharmaceutical Bulletin*, vol. 60, no. 1. <http://doi.org/10.33320/maced.pharm.bull.2014.60.01.002>.

HENRIQUES, M.Q.S., XAVIER BARBOSA, D.H., DA NÓBREGA ALVES, D.,

VIEIRA MELO, A.K. and DIAS DE CASTRO, R., 2021. Chemical composition, antioxidant, antimicrobial activity, toxicity, genetic analysis and popular use of *Eugenia luschnathiana* (O. Berg) Klotzsch ex BD Jacks: a literature review. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, vol. 20, no. 3. <http://doi.org/10.37360/blacpma.21.20.3.17>.

KUMAR, P., NAGARAJAN, A. and UCHIL, P.D., 2018. Analysis of cell viability by the MTT assay. *Cold Spring Harbor Protocols*, vol. 2018, no. 6, pp. pdb-prot095505. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot095505>

LEE, Y., PUUMALA, E., ROBBINS, N. and COWEN, L.E., 2020. Antifungal drug resistance: molecular mechanisms in *Candida albicans* Brazilian Journal of Biology, 2024, vol. 84, e286419 11/12 Bioactive potential of *E. luschnathiana* extracts and beyond. *Chemical Reviews*, vol. 121, no. 6, pp. 3390-3411. <http://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c00199>. PMID:32441527.

LIMA, I.O., NÓBREGA, F.M., OLIVEIRA, W.A., LIMA, E.O., MENEZES, E.A., CUNHA, F.A. and DINIZ, M.F.F.M., 2012. Anti-*Candida albicans* effectiveness of citral and investigation of mode of action. *Pharmaceutical Biology*, vol. 50, no. 12, pp. 1536-1541. <http://doi.org/10.3109/13880209.2012.694893> PMID:23116193.

LIU, W., YUAN, L. and WANG, S., 2020. Recent progress in the discovery of antifungal agents targeting the cell wall. *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 63, no. 21, pp. 12429-12459. <http://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c00748> PMID:32692166.

MARTÍNEZ, A., ROJAS, N., GARCÍA, L., GONZÁLEZ, F., DOMÍNGUEZ, M. and CATALÁN, A., 2014. In vitro activity of terpenes against *Candida albicans* and ultrastructural alterations. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*, vol. 118, no. 5, pp. 553-559. <http://doi.org/10.1016/j.oooo.2014.07.009> PMID:25442491.

MATOS, F.J.A., 1997. *Introdução à fitoquímica experimental*. Fortaleza: edições UFC.

MEYER, B.N., FERRIGNI, N.R., PUTNAM, J.E., JACOBSEN, L.B., NICHOLS, D.E.J. and MCLAUGHLIN, J.L., 1982. Brine shrimp: a convenient general bioassay

for active plant constituents. *Planta Medica*, vol. 45, no. 05, pp. 31-34. <http://doi.org/10.1055/s-2007-971236>.

MONSEN, R.E., KRISTOFFERSEN, A.K., GAY, C.L., HERLOFSON, B.B., FJELD, K.G., HOVE, L.H., NORDGARDEN, H., TOLLISEN, A., LERDAL, A. and ENERSEN, M., 2023. Identification and susceptibility testing of oral candidiasis in advanced cancer patients. *BMC Oral Health*, vol. 23, no. 1, pp. 223. <http://doi.org/10.1186/s12903-023-02950-y> PMID:37072843.

MONTEIRO, S.S., SIANI, A.C., NAKAMURA, M.J., SOUZA, M.C. and RAMOS, M.F.S., 2016. Leaf essential oil from *Eugenia luschnathiana* and *Myrciaria tenella* (Myrtaceae) from two different accesses in Southeastern Brazil. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, vol. 19, no. 7, pp. 1675-1683. <http://doi.org/10.1080/0972060X.2016.1141074>.

MOREIRA, L.C., DE ÁVILA, R.I., VELOSO, D.F.M.C., PEDROSA, T.N., LIMA, E.S., DO COUTO, R.O., LIMA, E.M., BATISTA, A.C., DE PAULA, J.R. and VALADARES, M.C., 2017. In vitro safety and efficacy evaluations of a complex botanical mixture of *Eugenia dysenterica* DC.(Myrtaceae): prospects for developing a new dermocosmetic product. *Toxicology In Vitro*, vol. 45, no. Pt 3, pp. 397-408. <http://doi.org/10.1016/j.tiv.2017.04.002> PMID:28389280.

MOREY, A.T., SOUZA, F.C., SANTOS, J.P., PEREIRA, C.A., CARDOSO, J.D., ALMEIDA, R.S., COSTA, M.A., MELLO, J.C., NAKAMURA, C.V., PINGE-FILHO, P., YAMAUCHI, L.M. and YAMADA-OGATTA, S.F., 2016. Antifungal activity of condensed tannins from *Stryphnodendron adstringens*: effect on *Candida tropicalis* growth and adhesion properties. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, vol. 17, no. 4, pp. 365-375. <http://doi.org/10.2174/1389201017666151223123712> PMID:26696018.

MOSMANN, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, vol. 65, no. 1–2, pp. 55-63. [http://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](http://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4) PMID:6606682.

NGUYEN, W., GRIGORI, L., JUST, E., SANTOS, C. and SELEEM, D., 2021. The in vivo anti-*Candida albicans* activity of flavonoids. *Journal of Oral Biosciences*, vol.

63, no. 2, pp. 120-128. <http://doi.org/10.1016/j.job.2021.03.004> PMID:33839266.

OLIVEIRA, M.S., SILVA, V.M.P., FREITAS, L.C., SILVA, S.G., CRUZ, J.N. and ANDRADE, E.H.A., 2021. Extraction yield, chemical composition, preliminary toxicity of bignonia nocturna (bignoniaceae) essential oil, and in silico evaluation of the interaction. *Chemistry & Biodiversity*, vol. 18, no. 4, pp. e2000982. <http://doi.org/10.1002/cbdv.202000982> PMID:33587821.

PEIXOTO, L.R., ROSALEN, P.L., FERREIRA, G.L.S., FREIRES, I.A., DE CARVALHO, F.G., CASTELLANO, L.R. and DE CASTRO, R.D., 2017. Antifungal activity, mode of action and anti-biofilm effects of *Laurus nobilis* Linnaeus essential oil against *Candida* spp. *Archives of Oral Biology*, vol. 73, pp. 179-185. <http://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2016.10.013> PMID:27771586.

PERLIN, D.S., 2011. Current perspectives on echinocandin class drugs. *Future Microbiology*, vol. 6, no. 4, pp. 441-457. <http://doi.org/10.2217/fmb.11.19> PMID:21526945.

POPIOŁEK, Ł. and BIERNASIUK, A., 2016. Design, synthesis, and in vitro antimicrobial activity of hydrazide–hydrazones of 2-substituted acetic acid. *Chemical Biology & Drug Design*, vol. 88, no. 6, pp. 873-883. <http://doi.org/10.1111/cbdd.12820> PMID:27422854.

PRISTOV, K.E. and GHANNOUM, M.A., 2019. Resistance of *Candida* to azoles and echinocandins worldwide. *Clinical Microbiology and Infection*, vol. 25, no. 7, pp. 792-798. <http://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.03.028> PMID:30965100.

QUINDÓS, G., GIL-ALONSO, S., MARCOS-ARIAS, C., SEVILLANO, E., MATEO, E., JAUREGIZAR, N. and ERASO, E., 2019. Therapeutic tools for oral candidiasis: current and new antifungal drugs. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal*, vol. 24, no. 2, pp. e172-e180. <http://doi.org/10.4317/medoral.22978> PMID:30818309.

RAHMAN, M.M., RAHAMAN, M.S., ISLAM, M.R., HOSSAIN, M.E., MANNAN MITHI, F., AHMED, M., SALDÍAS, M., AKKOL, E.K. and SOBARZO-SÁNCHEZ, E., 2021. Multifunctional therapeutic potential of phytocomplexes and natural extracts for antimicrobial properties. *Antibiotics*, vol. 10, no. 9, pp. 1076.

<http://doi.org/10.3390/antibiotics10091076> PMID:34572660.

RAI, A., MISRA, S.R., PANDA, S., SOKOLOWSKI, G., MISHRA, L., DAS, R. and LAPINSKA, B., 2022. Nystatin effectiveness in Oral candidiasis treatment: a Systematic Review & Meta-Analysis of clinical trials. *Life*, vol. 12, no. 11, pp. 1677. <http://doi.org/10.3390/life12111677> PMID:36362833.

RAMÍREZ-CARMONA, W., FERNANDES, G.L.P., DÍAZ-FABREGAT, B., OLIVEIRA, E.C., DO PRADO, R.L., PESSAN, J.P. and MONTEIRO, D.R., 2023. Effectiveness of fluconazole as antifungal prophylaxis in cancer patients undergoing chemotherapy, radiotherapy, or immunotherapy: systematic review and meta-analysis. *APMIS*, vol. 131, no. 11, pp. 668-684. <http://doi.org/10.1111/apm.13324> PMID:37199283.

ROSTAGNO, M.A. and PRADO, J.M., 2013. Natural product extraction: principles and applications. Cambridge: Royal Society of Chemistry. <http://doi.org/10.1039/9781849737579>.

SARDI, J.C.O., FREIRES, I.A., LAZARINI, J.G., INFANTE, J., DE ALENCAR, S.M. and ROSALEN, P.L., 2017. Unexplored endemic fruit species from Brazil: antibiofilm properties, insights into mode of action, and systemic toxicity of four *Eugenia* spp. *Microbial Pathogenesis*, vol. 105, pp. 280-287. <http://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.02.044> PMID:28259673.

SELEEM, D., PARDI, V. and MURATA, R.M., 2017. Review of flavonoids: a diverse group of natural compounds with anti-*Candida albicans* activity in vitro. *Archives of Oral Biology*, vol. 76, pp. 76-83. <http://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2016.08.030> PMID:27659902.

SELESTINO NETA, M.C., VITTORAZZI, C., GUIMARÃES, A.C., MARTINS, J.D.L., FRONZA, M., ENDRINGER, D.C. and SCHERER, R., 2017. Effects of β -caryophyllene and *Murraya paniculata* essential oil in the murine hepatoma cells and in the bacteria and fungi 24-h time–kill curve studies. *Pharmaceutical Biology*, vol. 55, no. 1, pp. 190-197. <http://doi.org/10.1080/13880209.2016.1254251> PMID:27927082.

SILVA-RODRIGUES, R.C., NÓBREGA-ALVES, D., NÉRIS-ANDRADE, P.,

OLIVEIRA-BARRETO, J., BENATTI-JUSTINO, A., SALMENESPINDOLA, F., DE-CASTRO, R.D., FECHINE-TAVARES, J., SOBRAL-DA-SILVA, M., SARMENTO-GUERRA, F.Q. and CANÇADOCATELLANO, L.R., 2024. Antifungal activity of *Annona crassiflora* Mart. dichloromethane fraction against strains of *C. albicans*. *Brazilian Journal of Biology = Revista Brasileira de Biologia*, vol. 84, pp. e278069. <http://doi.org/10.1590/1519-6984.278069> PMID:38865564.

SOUZA-MELO, W.O., FIGUEIREDO-JÚNIOR, E.C., FREIRE, J.C.P., COSTA, B.P., LIRA, A.B., FREIRES, I.A., CAVALCANTI, Y.W., LOPES, W.S., TAVARES, J.F. and PESSÔA, H., 2021. Phytochemistry, antifungal and antioxidant activity, and cytotoxicity of *Byrsonima gardneriana* (A. Juss) extract. *Archives of Oral Biology*, vol. 123, pp. 104994. <http://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2020.104994> PMID:33472099.

TRINDADE, L.A., OLIVEIRA, J.A., CASTRO, R.D. and LIMA, E.O., 2015. Inhibition of adherence of *C. albicans* to dental implants and cover screws by *Cymbopogon nardus* essential oil and citronellal. *Clinical Oral Investigations*, vol. 19, no. 9, pp. 2223-2231. <http://doi.org/10.1007/s00784-015-1450-3> PMID:25804885.

VAN DEN DOOL, H. and KRATZ, P.D., 1963. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *Journal of Chromatography. A*. [http://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)80947-X](http://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)80947-X).

VILA, T., SULTAN, A.S., MONTELONGO-JAUREGUI, D. and JABRARIZK, M.A., 2020. Oral candidiasis: a disease of opportunity. *Journal of Fungi*, vol. 6, no. 1, pp. 15. <http://doi.org/10.3390/jof6010015> PMID:31963180.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE – CLSI, 2002. Protocol M27-A2. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. 2nd ed. Pennsylvania: NCCLS, 51 p.

WEI, S., LI, L., SHU, Y., ZHAO, K. and JI, Z., 2017. Synthesis, antifungal and antitumor activity of two new types of imidazolin-2-ones. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, vol. 25, no. 24, pp. 6501-6510. <http://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.10.033> PMID:29100733.

6. CONCLUSÃO

O extrato etanólico bruto de *E. luschnathiana* demonstrou potencial significativo sobre espécies de *Candida*, com ação fungicida com possível ação sobre a parede celular fúngica. Além disso, o EEB apresentou atividade anti-biofilme em baixas concentrações e um perfil de toxicidade favorável à sobrevivência de *A. salina*, indicando segurança preliminar para o uso em futuros estudos clínicos. Em contrapartida, o óleo essencial (OE) da planta, composto majoritariamente por sesquiterpenos, como o (E)-Cariofileno, não apresentou efeitos significativos sobre as cepas utilizadas.

A partir desses resultados, este estudo contribui para o conhecimento acerca das propriedades biológicas dos produtos obtidos a partir das folhas de *E. luschnathiana*. Bem como, fundamentam futuros estudos voltados ao desenvolvimento de novos agentes para o tratamento da candidíase oral.

REFERÊNCIAS

- ALVES, D. N. *et al.* Docking prediction, antifungal activity, anti-biofilm effects on *Candida* spp., and toxicity against human cells of cinnamaldehyde. *Molecules*, v. 25, n. 24, p. 5969, 2020.
- ALVES, D. N. *et al.* Breakpoints for the classification of anti-*Candida* compounds in antifungal screening. *BioMed Research International*, 2021.
- ATANASOV, A. G. *et al.* Natural products in drug discovery: advances and opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 20, n. 3, p. 200–216, 2021.
- BEN-AMI, R.; KONTOYIANNIS, D. P. Resistance to antifungal drugs. *Infectious Disease Clinics*, v. 35, n. 2, p. 279–311, 2021.
- BORGES, C. A. *et al.* Diagnóstico e formas de tratamento da candidíase oral: uma revisão de literatura. *Research, Society and Development*, v. 10, n. 15, p. e359101523123, 2021.
- CHINSEMBU, K. C. Plants and other natural products used in the management of oral infections and improvement of oral health. *Acta Tropica*, v. 154, p. 6–18, 2016.
- CHOPRA, B.; DHINGRA, A. K. Natural products: A lead for drug discovery and development. *Phytotherapy Research*, v. 35, n. 9, p. 4660–4702, 2021.
- CHOWDHARY, A.; JAIN, K.; CHAUHAN, N. *Candida auris* genetics and emergence. *Annual Review of Microbiology*, v. 77, p. 583–602, 2023.
- CONTALDO, M. *et al.* Oral candidiasis and novel therapeutic strategies: antifungals, phytotherapy, probiotics, and photodynamic therapy. *Current Drug Delivery*, v. 20, n. 5, p. 441–456, 2023.
- FERREIRA, G. L. S. *et al.* Does scientific evidence for the use of natural products in the treatment of oral candidiasis exist? A systematic review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015.
- GUIMARÃES, R. *et al.* Antibiofilm potential of medicinal plants against *Candida* spp. oral biofilms: a review. *Antibiotics*, v. 10, n. 9, p. 1142, 2021.
- HENRIQUES, M. Q. S. *et al.* Chemical composition, antioxidant, antimicrobial activity, toxicity, genetic analysis and popular use of *Eugenia luschnathiana* (O. Berg) Klotzsch ex BD Jacks: a literature review. *Boletín Latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, v. 20, n. 3, 2021.
- LEE, Y. *et al.* Antifungal drug resistance: molecular mechanisms in *Candida albicans* and beyond. *Chemical Reviews*, 2020.

MARQUEZ, L.; QUAVE, C. L. Prevalence and therapeutic challenges of fungal drug resistance: role for plants in drug discovery. *Antibiotics*, v. 9, n. 4, p. 150, 2020.

MARTÍNEZ, A. *et al.* In vitro activity of terpenes against *Candida albicans* and ultrastructural alterations. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*, v. 118, n. 5, p. 553–559, 2014.

PRISTOV, K. E.; GHANNOUM, M. A. Resistance of *Candida* to azoles and echinocandins worldwide. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 25, n. 7, p. 792–798, 2019.

QUINDÓS, G. *et al.* Therapeutic tools for oral candidiasis: current and new antifungal drugs. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal*, v. 24, n. 2, p. e172, 2019.

RAI, A. *et al.* Nystatin effectiveness in oral candidiasis treatment: a systematic review & meta-analysis of clinical trials. *Life*, v. 12, n. 11, p. 1677, 2022.

RAMÍREZ-CARMONA, W. *et al.* Effectiveness of fluconazole as antifungal prophylaxis in cancer patients undergoing chemotherapy, radiotherapy, or immunotherapy: systematic review and meta-analysis. *APMIS*, v. 131, n. 11, p. 668–684, 2023.

ROSTAGNO, M. A.; PRADO, J. M. Natural product extraction: principles and applications. *Royal Society of Chemistry*, 2013.

SILVA, L. A. *et al.* Chemical composition and biological activities of essential oils from *Myrtaceae* species growing in Amazon: an updated review. *Journal of Essential Oil Research*, v. 35, n. 2, p. 103–116, 2023.

SOUZA, A. M. *et al.* Traditional uses, phytochemistry, and antimicrobial activities of *Eugenia* species – a review. *Planta Medica*, v. 84, n. 17, p. 1232–1248, 2018.

SOUZA-MELO, W. O. *et al.* Phytochemistry, antifungal and antioxidant activity, and cytotoxicity of *Byrsonima gardneriana* (A. Juss) extract. *Archives of Oral Biology*, v. 123, p. 104994, 2021.

TRINDADE, L. A. *et al.* Inhibition of adherence of *C. albicans* to dental implants and cover screws by *Cymbopogon nardus* essential oil and citronellal. *Clinical Oral Investigations*, v. 19, n. 9, p. 2223–2231, 2015.

VILA, T. *et al.* Oral candidiasis: a disease of opportunity. *Journal of Fungi*, v.



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso
Cadastro nº A4B2595

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: A4B2595
Usuário: Palloma Christine Queiroga Gomes da Costa
CPF/CNPJ: 053.192.951-54
Objeto do Acesso: Patrimônio Genético
Finalidade do Acesso: Pesquisa

Espécie

Eugenia luschnathiana

Título da Atividade: Atividade antifúngica do extrato de Eugenia luschnathiana e sua toxicologia sobre queratinócitos humanos e embriões de peixe-zebra

Equipe

Palloma Christine Queiroga Gomes da Costa	Universidade Federal da Paraíba
Paula Lima Nogueira	Universidade Federal da Paraíba
Yuri Mangueira Nascimento	Universidade Federal da Paraíba
Marianna Vieira Sobral	Universidade Federal da Paraíba
Ricardo Dias de Castro	Universidade Federal da Paraíba

Data do Cadastro: 29/04/2024 20:53:28

Situação do Cadastro: Concluído

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em 20:53 de 29/04/2024.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
ASSOCIADO - SISGEN