



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO – UFRPE
UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI – URCA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA – UEPB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ETNOBIOLOGIA E CONSERVAÇÃO DA
NATUREZA - PPGETNO

ESTUDO QUÍMICO E ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE DUAS ESPÉCIES DE *Psidium* L., EM FUNÇÃO DA SAZONALIDADE E EM DIFERENTES FASES FENOLÓGICAS.

DELMACIA GONÇALVES DE MACÊDO

RECIFE – PE

- 2018 –

DELMACIA GONÇALVES DE MACÊDO

ESTUDO QUÍMICO E ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE DUAS ESPÉCIES DE *Psidium* L., EM FUNÇÃO DA SAZONALIDADE E EM DIFERENTES FASES FENOLÓGICAS.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Etnobiologia e Conservação da Natureza em Associação entre a Universidade Federal Rural de Pernambuco, Universidade Estadual da Paraíba e Universidade Regional do Cariri como requisito parcial para obtenção do título de doutor em Etnobiologia e Conservação da Natureza.

Orientador:

Prof. Dr. Irwin Rose de Alencar Menezes/URCA

Coorientadora:

Profa. Dra. Marta Maria de Almeida Souza/URCA

RECIFE – PE

- 2018 –

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Centra, Recife-PE, Brasil

M141e Macêdo, Delmacia Gonçalves de
Estudo químico e atividade antifúngica dos óleos essenciais de
duas espécies de *Psidium* L., em função da sazonalidade e em
diferentes fases fenológicas / Delmacia Gonçalves de Macêdo. – 2018.
116 f. : il.

Orientador: Irwin Rose de Alencar Menezes.
Coorientadora: Marta Maria de Almeida Souza.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco,
Programa de Pós-Graduação em Etnobiologia e Conservação da
Natureza, Recife, BR-PE, 2018.
Inclui referências e anexo(s).

1. Fenologia 2. Óleos vegetais 3. Araçás
4. Essências e óleos essenciais 5. Leveduras I. Menezes, Irwin Rose de
Alencar, orient. II. Souza, Marta Maria de Almeida, coorient.
III. Título

CDD 574

DELMACIA GONÇALVES DE MAÇÊDO

ESTUDO QUÍMICO E ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE DUAS ESPÉCIES DE *Psidium* L., EM FUNÇÃO DA SAZONALIDADE E EM DIFERENTES FASES FENOLÓGICAS.

DEFESA APRESENTADA EM: 27 de setembro de 2018.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Irwin Rose de Alencar Menezes

Universidade Regional do Cariri – URCA (Orientador/Presidente)

Prof. Dra. Maria Arlene Pessoa da Silva

Universidade Regional do Cariri – URCA (Membro Interno)

Prof. Dr. Luiz Marivando Barros

Universidade Regional do Cariri – URCA (Membro Interno)

Prof. Dr. Saulo Relison Tintino

Universidade Regional do Cariri – URCA (Membro Externo)

Prof. Dr. Jaime Ribeiro Filho

Centro Universitário Leão Sampaio - UNILEÃO (Membro Externo)

Prof. Dr. Francisco Assis Bezerra da Cunha

Universidade Regional do Cariri – URCA (Membro interno- Suplente)

Prof.Dr. Rogério de Aquino Saraiva

Universidade Federal Rural de Pernambuco (Membro Externo – Suplente)

RECIFE – PE-

2018

A Deus por cuidar de mim e me capacitar chegar até aqui e aos meus amados pais,
Lucimar Gonçalves de Macêdo e José Dézio Macêdo por serem minha base e
exemplo. Amo vocês!

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por sempre guiar e iluminar meu caminho, por me dar muito mais do que eu preciso, e por me abençoar muito mais do que eu mereço!

À minha mãe, Lucimar Macêdo, minha amiga, exemplo de mulher e mãe guerreira, responsável por tudo que tenho e sou. Ao meu pai, José Dézio Macêdo por está sempre por perto me apoiando. Tenho certeza do orgulho que demonstram por mim em mais uma etapa que conquistei. Obrigada pelo amor incondicional!

A Wesley Freitas meu querido esposo, pelo amor, e por sempre se mostrar prestativo, pelas palavras de incentivo quando me falta força, pelo carinho e compreensão, pelos conselhos e cumplicidade, por ser meu refúgio e por me mostrar que a vida pode ser bem melhor e ainda mais bonita.

As minhas irmãs, Amanda Macêdo e Bruna Macêdo, a minha tia e irmã Veroneide Gonçalves e ao meu cunhado Alvaro Henrique por sempre estarem presentes em minha vida e por contribuírem ao longo dessa caminhada através do apoio e por sempre estarem torcendo por mim. E a minha cunhada Luciola Freitas pelas valiosa ajuda e contribuição neste trabalho.

Ao meu orientador Dr. Irwin Rose Alencar Menezes, pela orientação, disponibilidade e colaboração de grande ajuda para este trabalho.

A minha coorientadora Prof. Dra. Marta Maria de Almeida Souza, pela oportunidade de realizar este trabalho, por confiar e acreditar em mim, por saber elogiar e criticar do jeito e na hora certa. Por toda a sua dedicação, disponibilidade, incentivo e amizade. Serei eternamente grata e agradeço imensamente por tudo.

Aos professores Dra. Maria Arlene Pessoa da Silva, Dr. Luiz Marivando Barros, Dr. Saulo Relison Tintino e Dr. Jaime Ribeiro Filho por aceitarem participar da banca examinadora, obrigada pelas valiosas sugestões, críticas construtivas e por contribuírem para o aperfeiçoamento e melhoria deste trabalho.

Ao Corpo Docente que compõe o Programa de Pós-Graduação em Etnobiologia e Conservação da Natureza pela contribuição na minha formação profissional e pessoal, por me oportunizar absorver uma parcela de suas grandes experiências e conhecimentos.

À equipe do Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais – LPPN e Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular – LMBM, em especial a estas pessoas de coração grandioso que encontrei no caminho, Flaviana Morais Braga, Thassya Lucas, Janaine Camilo, Rafael Cruz e Judson Machado, Camila e Fábio Galvão por todo apoio e por estarem disponíveis sempre que precisei.

Ao mateiro “Seu Cícero”, pela preciosa base de contribuição a este trabalho e por dividir comigo seu conhecimento a respeito das plantas.

As amigas do Laboratório de Ecologia Vegetal - LEV, ao qual convivi em todos esses anos de minha formação, em especial as minhas queridas: Daiany Ribeiro, Bianca Vilar, Maria de Oliveira, Samile Lima e Julimery Gonçalves (também pela ajuda em campo), pela amizade e pelos conselhos, pelas boas conversas, por sempre estarem dispostas a me ajudar e por compartilhar comigo seus conhecimentos e bons momentos na vida acadêmica e fora dela.

Aos colegas de Doutorado, em especial aos meus amigos Diógenes Queiroz e Regina Célia pelo compartilhar desta trajetória, pelos bons momentos de convivência e aprendizado, por termos juntos vencido tantas disciplinas e mais uma etapa de nossas vidas.

À Universidade Regional do Cariri – URCA pelo espaço cedido durante minha permanência na instituição, aos órgãos de fomento a pesquisa CNPq, CAPES e FINEP. À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico - FUNCAP, por ter colaborado financeiramente com desenvolvimento da pesquisa.

Por fim, quero agradecer a todos que fizeram e fazem parte da minha vida e que de alguma forma contribuíram para este estudo e principalmente para a minha formação tanto profissional como pessoal e mesmo que indiretamente prestaram sua colaboração e me deram força e perseverança para seguir em frente e realizar este sonho e que com palavras e atitudes me ajudam a crescer, me ensinam a viver melhor e me mostra que devo sempre compartilhar.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTO	vi
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS	xii
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xvi
1. INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1 Família Myrtaceae Juss.	20
2.1.1 Gênero <i>Psidium</i> L.	21
2.1.2 <i>Psidium myrtoides</i> O. Berg.	22
2.1.3 <i>Psidium salutare</i> (Kunth) O. Berg.	23
2.2 Importância da etnobiologia no direcionamento de pesquisas etnofarmacológicas.....	25
2.3 Variabilidade química de óleos essenciais relacionados aos fatores ambientais.....	26
2.4 Mecanismo de resistência de espécies de <i>Candida</i> a drogas antifúngicas	28
3. REFERÊNCIAS	31
CAPITULO 1	
Apresentação	39
Variações químicas de duas espécies de <i>Psidium</i> (Myrtaceae) em diferentes períodos fenológicos, em área de Cerrado no Nordeste do Brasil.	40
Resumo	40
1. Introdução.....	42
2. Material e Métodos.....	43
2.1 Área de estudo	43
2.2. Fenologia	44
2.3. Dados climáticos.....	44
2.4 Material vegetal.....	45
2.5. Obtenção e análise dos óleos essenciais	45
3. Resultados e Discussão.....	46
3.1 Dados meteorológicos.....	46
3.2 Rendimento do óleo em diferentes fases fenológicas.....	47
3.3 Composição química em diferentes fases fenológicas	49

4. Conclusão	60
Referências	60

CAPITULO 2

Apresentação	66
Effect of seasonality on chemical profile and antifungal activity of essential oil isolated from leaves <i>Psidium salutare</i> (Kunth) O. Berg.....	67
Abstract.....	68
1. Introduction	70
2. Materials and Methods	71
2.1 Collection area of botanical material	71
2.2 Plant material	71
2.3 Obtaining and analyzing the essential oil	72
2.4 Antifungal activity evaluation	72
2.4.1 Culture media and inocula	72
2.4.2 Determination of the Inhibitory Concentration of 50% of the microorganisms (IC ₅₀) and obtaining the cellular viability curve	73
2.4.3 Determination of the minimal fungicidal concentration (MFC).....	73
2.5 Evaluation of the <i>Psidium salutare</i> essential oil modulating effect on the antifungal activity of fluconazole	74
2.6 Effect of the <i>Psidium salutare</i> leaf oil on <i>Candida albicans</i> morphogenesis	74
2.7 Statistical analysis.....	75
3. Results	75
4. Discussion.....	80
5. Conclusion.....	83
6. Acknowledgments	83
7.References.....	84

CAPITULO 3

Apresentação	91
Avaliação da sazonalidade sobre a composição química e atividade antifúngica do óleo essencial de <i>Psidium myrtoides</i> O. Berg contra patógenos oportunistas.....	92
Resumo	92
1. Introdução.....	93

2. Material e Métodos	94
2.1 Coleta do material vegetal	94
2.2 Obtenção do óleo essencial e condições de análise de GC-MS.....	95
2.3. Ensaio antifúngicos	95
2.3.1 Microrganismos, meios de cultura e inóculos	95
2.3.2 Drogas e reagentes	96
2.3.3 Determinação da IC ₅₀ e curva de viabilidade celular do óleo essencial de <i>Psidium myrtooides</i>	96
2.3.4 Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM)	96
2.4 Efeito do óleo de <i>P. myrtooides</i> na atividade antifúngica em conjunto com o fluconazol modulação.....	97
2.5 Efeito do óleo sobre a morfologia de <i>Candida albicans</i>	97
2.6 Análises estatísticas dos testes microbiológicos.....	98
3. Resultados e Discussão.....	
3.1 Análise da composição química	98
3.2 Atividade antifúngica de <i>Psidium myrtooides</i>	101
3.3 Avaliação da alteração micromorfológica de <i>Candida albicans</i>	105
4. Conclusão	106
Referências	106
DISCUSSÃO GERAL	112
CONSIDERAÇÕES FINAIS	113
ANEXOS	
ANEXO A - Documento de Autorização para atividades com finalidade científica.....	115
ANEXO B - Artigo publicado a partir dos dados gerados da tese	116

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Psidium myrtoides</i> O. Berg (Araça de veado): (A) Aspecto da planta; (B) Caule; (C) Folhas; (D) Botão floral; (E) Flor; (F) Fruto.....	23
Figura 2. <i>Psidium salutare</i> (Kunth) O. Berg (Araça preto): (A) Aspecto da planta; (B) Folhas; (C) Caule com fissuras profundas; (D) Botão floral; (E) Flor.....	24
Figura 3: Principais fatores que podem influenciar o acúmulo de metabólitos em plantas.....	28

CAPITULO 1

Figura 1. Localização geográfica da área de estudo no município de Crato, Ceará, Brasil.....	44
Figura 2. Climograma dos anos de 2016 (A) e 2017 (B).....	47

CAPITULO 2

Figure 1. Cell viability curve and IC ₅₀ of the <i>Psidium salutare</i> essential oil (A, C and E) and the oil in combined with fluconazole (B, D and F) against different <i>Candida</i> spp. strains, at different collection periods.....	79
Figure 2. Effect of the <i>Psidium salutare</i> essential oil on <i>Candida albicans</i> yeast micromorphological aspects.....	80

CAPITULO 3

Figura 1. Curva de viabilidade celular e IC ₅₀ do óleo essencial de <i>Psidium myrtoides</i> (A, C e E) e óleo em associação com fluconazol a (B, D e F) frente a diferentes estirpes de <i>Candida</i> spp., em diferentes períodos de coleta.....	103
Figura 2. Controle utilizado no teste micromorfológico e efeito do óleo de <i>Psidium myrtoides</i> sobre o dimorfismo de <i>Candida albicans</i>	106

LISTA DE TABELAS

CAPITULO 1

Tabela 1. Rendimento dos óleos essenciais de *Psidium salutare* e *Psidium myrtoides* coletada em diferentes períodos.....48

Tabela 2. Porcentagem dos constituintes químicos dos óleos voláteis de folhas de *Psidium myrtoides* por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (CG/EM) nos anos de 2016 e 2017.....53

Tabela 3. Porcentagem dos compostos químicos dos óleos essenciais das folhas de *Psidium salutare* por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (CG/EM) nos anos de 2016 e 2017.....56

CAPITULO 2

Table 1. The average annual of meteorological conditions for each collection (2016)72

Table 2. Determination of the percentage composition of the chemical composition of the *Psidium salutare* leaf essential oil by Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry (CG/MS) in different collection periods.....75

Table 3. The inhibitory effect of association the essential oil of *Psidium salutare* with fluconazole on *Candida* ($\mu\text{g/mL}$)77

Table 4. The CFM ($\mu\text{g/mL}$) of the essential oil of *Psidium salutare* on different strains of *Candida* in modulatory effect.....78

CAPITULO 3

Tabela 1. Meses de amostragem, rendimento e média das condições meteorológicas..... 98

Tabela 2. Composição química dos óleos voláteis obtidos das folhas de <i>Psidium myrtoides</i> por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (CG/EM) nas duas estações do ano.....	99
Tabela 3. Concentração Fungicida Mínima do óleo essencial de <i>Psidium myrtoides</i> sobre estirpes de <i>Candida</i> ($\mu\text{g/mL}$) e IC_{50} (mg/mL)	101
Tabela 4. Modulação do óleo essencial de <i>Psidium myrtoides</i> sobre estirpes de <i>Candida</i> ($\mu\text{g/mL}$) e IC_{50} (mg/mL)	104

Macedo, Delmacia Gonçalves. (Dra.). Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). Setembro de 2018. Estudo químico e atividade antifúngica dos óleos essenciais de duas espécies de *Psidium* L., em função da sazonalidade e em diferentes fases fenológicas. Irwin Rose de Alencar Menezes (Orientador); Marta Maria de Almeida Souza (Coorientadora).

RESUMO

A família Myrtaceae está entre uma das mais representativas dos ecossistemas brasileiros. A presença de estruturas secretoras de óleos essenciais nos órgãos vegetativos e reprodutivos destas espécies é uma característica marcante da família. O conhecimento dos fatores que determinam a variabilidade química de cada espécie vegetal é muito importante para investigações químicas e farmacológicas. Esse estudo tem como objetivo avaliar a variabilidade química dos óleos essenciais de *Psidium myrtoides* e *Psidium salutare*, em diferentes fases fenológicas e períodos sazonais, além de verificar esta variação na atividade antifúngica. As fenofases vegetativa (queda foliar e brotamento) e reprodutiva (floração e frutificação) foram observadas como presente ou ausente durante dois anos. Para analisar a variabilidade dos constituintes químicos da espécie foram realizadas coletas trimestrais durante os anos de 2016 e 2017, compreendendo as fases vegetativas e reprodutivas e as estações chuvosa e seca. Os óleos essenciais das folhas foram obtidos pelo processo de hidrodestilação em aparelho tipo Clevenger e quantificados por Cromatografia Gasosa acoplado à Espectrometria de Massa (CG/EM). Os testes antifúngicos foram realizadas contra linhagens fúngicas de *Candida albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei* pelo método de microdiluição em caldo para determinação da concentração fungicida mínima (CFM) a partir do subcultivo. Os óleos essenciais (CFM/16) foram associados ao fluconazol para verificação de efeito potencializador. O efeito sobre o dimorfismo de *Candida albicans* foi avaliado por microscopia óptica em câmaras de microcultivo. Os óleos essenciais durante os dois anos de estudo, apresentaram rendimentos variando de 0,15 a 0,75% para *P. salutare* e de 0,35 a 1,17% para *P. myrtoides*, com maiores valores no período reprodutivo associada a estação chuvosa. Foram identificados 33 constituintes em *P. myrtoides* e 40 para *P. salutare*, cujos componentes majoritários foram 1-8 cineol e γ -terpineno, respectivamente. Observou-se variabilidade na composição e concentração dos compostos, influenciada pela sazonalidade e/ou pela fenofase. Os óleos essenciais não apresentaram atividade antifúngica significativa, em ambas as espécies, mais potencializaram o efeito do antifúngico comercial (fluconazol) em todos os períodos de coleta. Os óleos essenciais afetaram a transição morfológica de *C. albicans* em concentrações

crescentes. Os resultados demonstraram que plantas amostradas em diferentes períodos fenológicos ou sazonais apresentam composições diferentes e, conseqüentemente, tiveram variações nos constituintes bioativos, que em parte, podem está relacionada a atividade biológica. Embora sejam produtos naturais de plantas diferentes, o efeito biológico revelado indica que as espécies do gênero *Psidium* podem ser um agente em potencial no combate a virulência de fungos de *Candida* spp., destinados a possíveis usos terapêuticos.

Palavras-chaves: Óleos Voláteis; Fenologia; Periodos Sazonais; Leveduras; Atividade Biológica.

Macedo, Delmacia Gonçalves. (Dra.). Federal Rural University of Pernambuco (UFRPE). September 2018. Chemical study and antifungal activity of essential oils of two species of *Psidium* L., as a function of seasonality and in different phenological phases. Irwin Rose de Alencar Menezes; Marta Maria de Almeida Souza.

ABSTRACT

The Myrtaceae family is among one of the most representative of Brazilian ecosystems. The presence of secretory structures of essential oils in the vegetative and reproductive organs of these species is a hallmark of the family. Knowledge of the factors that determine the chemical variability of each plant species is very important for chemical and pharmacological investigations. This study aims to evaluate the chemical variability of the essential oils of *Psidium myrtoides* and *Psidium salutare*, in different phenological phases and seasonal periods, besides verifying this variation in antifungal activity. The vegetative (foliar and budding) and reproductive (flowering and fruiting) phenotypes were observed as present or absent for two years. To analyze the variability of the chemical constituents of the species, quarterly collections were made during the years 2016 and 2017, including the vegetative and reproductive phases and the rainy and dry seasons. Leaf essential oils were obtained by hydrodistillation in a Clevenger type apparatus and quantified by Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry (GC / MS). The antifungal tests were carried out against fungal strains of *Candida albicans*, *C. tropicalis* and *C. krusei* by broth microdilution method to determine the minimum fungicidal concentration (CFM) from the subculture. Essential oils (CFM / 16) were associated with fluconazole for potentiating effect. The effect on *Candida albicans* dimorphism was evaluated by optical microscopy in microculture chambers. The essential oils during the two years of study presented yields varying from 0.15 to 0.75% for *P. salutare* and from 0.35 to 1.17% for *P. myrtoides*, with higher values in the reproductive period associated with the season rainy. A total of 33 constituents were identified in *P. myrtoides* and 40 in *P. salutare*, whose major components were 1-8 cineol and γ -terpinene, respectively. Variability in composition and concentration of the compounds was observed, influenced by seasonality and/or phenophases. The essential oils did not present significant antifungal activity in both species, but they potentiated the effect of the antifungal agent (fluconazole) in all the collection periods. The essential oils affected the morphological transition of *C. albicans* in increasing concentrations. The results showed that plants sampled in different phenological or seasonal periods have different compositions and, consequently, had variations in the bioactive constituents, which in part, may be related to biological activity. Although they are natural

products of different plants, the biological effect revealed indicates that species of the genus *Psidium* may be a potential agent in combating the virulence of fungi of *Candida* spp., Destined to possible therapeutic uses.

Key words: Volatile Oils; Phenology; Seasonal Periods; Yeasts; Biological Activity

1 INTRODUÇÃO

Inúmeras espécies de plantas medicinais são amplamente usadas pela população. Algumas possuem estudos químicos e/ou farmacológicos que oferecem suporte para a sua utilização, enquanto outras são empregadas com base apenas em conhecimento empírico ou tradicional (SIMÕES et al., 2014). Este conhecimento tem grande relevância na descoberta de novas plantas medicinais, fornecedoras de substâncias químicas bioativas oriundas principalmente do metabolismo celular secundário do vegetal (DIEGUES; ARRUDA, 2001). A busca sistemática por substâncias com potencial medicinal tem sido realizada por diversas abordagens, dentre elas a ecologia química, que auxilia a descoberta de novos medicamentos com base em previsões da distribuição de substâncias oriundas do metabolismo secundário das plantas (ALBUQUERQUE et al., 2012).

Os metabólitos secundários, parecem ter um papel fundamental na proteção de plantas e apresentam duas importantes características: grande variedade estrutural e atividade biológica (VEIGA-JUNIOR et al., 2005). Então, compreender os eventos sazonais que alteram a qualidade dos compostos voláteis da planta é essencial para estudos farmacológicos. Geralmente, a síntese dos constituintes secundário, como os óleos essenciais, são frequentemente afetados em função da sazonalidade climática como: alterações na temperatura e pluviosidade podem estimular ou inibir a produção de metabólitos (HUSSAINA et al., 2008, GOUVEA et al., 2012), o ritmo circadiano que influencia a produção de fotoassimilados e conseqüentemente a síntese de metabólitos (SOUZA et al., 2010), o estresse hídrico que estimula o fechamento estomático, acúmulo de solutos e síntese de determinados constituintes (LIU et al., 2011), a fase fenológica (CASTRO-MORENO et al., 2013), entre outros. Estes fatores podem ocasionar uma variabilidade no conteúdo total bem como nas proporções relativas dos compostos químicos da espécie, podendo atuar correlacionados entre si ou isoladamente (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Nas espécies da família Myrtaceae, a composição majoritária dos óleos essenciais é dada por sesquiterpenos e monoterpenos (TYAGI et al., 2014; SOLIMAN et al., 2016). Os terpenos fazem parte da classe mais diversa de compostos orgânicos voláteis nas plantas (DUDAREVA et al., 2013) e desempenham várias funções na interação entre a planta e o ambiente. Os óleos essenciais das espécies desta família são estudados por suas atividades biológicas, a exemplo o gênero *Psidium* que apresentam bom desempenho quanto as suas atividades larvicidas (DIAS et al., 2015); antimicrobianas e anti-inflamatórias (GUTIÉRREZ et al., 2008; RAJAN et al., 2015), e possuem uma série de atividades comprovadas através de ensaios *in vitro* e *in vivo*, e efeito antifúngico (SUWANMANEE et al., 2014; WEN et al., 2011).

Pesquisas têm sido realizadas no sentido de promover a combinação de fármacos comerciais para os quais já tenha sido verificado o fenômeno da resistência, com produtos naturais na forma de extrato, frações, óleos essenciais ou constituintes isolados, numa tentativa de diminuir a resistência a fungos patogênicos (CALIXTO JÚNIOR et al., 2015; MORAIS-BRAGA et al., 2016; DUARTE et al., 2016). A Organização Mundial da Saúde (OMS, 2014) chama a atenção para a importância de epidemias de infecções fúngicas, especialmente, as causadas por espécies do gênero *Candida*, consideradas as mais comuns. Os fungos oportunistas mais importantes continuam sendo *Aspergillus fumigatus* e *Candida albicans*, no entanto, diferentes espécies, como *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. dubliniensis* e *Trichosporon spp.*, começam a manifestar-se cada vez mais (MENEZES et al., 2013).

O contexto atual exige buscas por substâncias bioativas que apresentem potencial antifúngico, portanto, pesquisas voltadas para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos, extratos e óleos essenciais podem servir como subsídios para estudos aprofundados e pesquisas que contemplem e objetivem a formulação de novos medicamentos (SARDI et al., 2013).

Dentre as espécies do gênero *Psidium*, o *Psidium myrtoides* O. Berg. e *Psidium salutare* (Kunth) possuem um significativo valor etnomedicinal para as comunidades locais da Chapada do Araripe-Ceará, sendo utilizadas para o tratamento de dor de barriga, diarreia e inflamações em geral (SILVA et al., 2012; MACÊDO et al., 2016). Neste sentido, considerando a importância medicinal do gênero *Psidium* e a ausência de trabalhos com as espécies em estudo, este trabalho teve por objetivo investigar a composição química do óleo essencial de *P. myrtoides* e *P. salutare* avaliando as mudanças na constituição química da espécie durante períodos sazonais distintos em diferentes fases fenológicas, assim como, verificar a atividade antifúngica intrínseca e associada a antifúngico.

Os resultados deste estudo foram descritos na de artigos científico dispostos em capítulo. O primeiro capítulo demonstra o efeito da sazonalidade e das diferentes fases fenológicas sobre a composição química. Já o segundo e terceiro capítulos abordam a influência da composição química do *Psidium myrtoides* O. Berg. e *Psidium salutare* sobre a atividade antifúngica e sua micromorfologia.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Família Myrtaceae Juss.

A família Myrtaceae Juss. está inserida na ordem *Myrtales* (CRONQUIST, 1981), sendo uma das mais ricas em espécies nos Neotrópicos, representadas por cerca de 5500 espécies, distribuídas em 144 gêneros e 17 tribos (WILSON, 2011; WCSP, 2017). No Brasil está representada por 26 gêneros e aproximadamente 1.000 espécies (SOBRAL et al., 2015). Suas espécies apresentam-se na forma de árvores ou arbustos, com o córtex do tronco esfoliante (presença de ritidoma); folhas geralmente opostas, simples, com margem inteira, coriáceas ou subcoriáceas, com pontos translúcidos que denotam a presença de grande número de cavidades secretoras de óleos essenciais (JOLY, 2002; SOUZA; LORENZI, 2005).

Pode-se observar que as espécies desta família são ecologicamente importantes em muitos ambientes neotropicais devido às bagas carnudas que serve de fonte alimentar para pássaros e mamíferos, flores brancas generalistas que fornecem pólen e recursos a uma variedade de espécies de abelhas (NIC LUGHADHA; PROENÇA, 1996; GRESSLER et al., 2006). Devido a sua importância ecológica, um crescente interesse tem surgido por pesquisadores usando Myrtaceae como um grupo modelo para estudos evolutivos, ecológicos e de conservação em biomas neotropicais (LUCAS; BÜNGER, 2015; STAGGEMEIER et al., 2015).

Muitos frutos desta família tem um histórico na medicina tradicional, sendo utilizadas em práticas etnobotânicas nas regiões tropicais e subtropicais (MARIN et al., 2008; VIEIRA et al., 2006; FRAZON et al., 2009; RIBEIRO et al., 2014) especialmente aquelas pertencentes aos gêneros *Psidium* e *Eugenia*. No Brasil, a diversidade de Myrtaceae relacionadas à utilização medicinal é vasta, havendo registros em estudos etnobotânicos, químicos e farmacológicos, ainda assim, verifica-se que nem todas as espécies desta família foram devidamente estudada, especialmente por ser um grupo de ampla distribuição e por apresentar usos diferenciados (LANDRUM; FUNCH, 2008; TULER et al., 2015; LANDRUM; PROENÇA, 2015). Além disso, espécies de Myrtaceae são também reconhecidas pela produção de compostos voláteis como os óleos essenciais (TENÓRIO et al., 2011; SANTOS et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2016).

Na região Nordeste, estudos etnobotânicos realizados na Chapada do Araripe, evidenciam espécies pertencentes à família Myrtaceae com propriedades terapêuticas, para diversos usos como anti-inflamatória, cicatrizante, antibacteriana entre outras. Dentre as mais relatadas está: *Eugenia uniflora* Lineau (Pitanga), *Eugenia jambolana* Lam (Jamelão), *Psidium*

guajava L (Goiaba branca), *Eucalyptus citriodora* F. Muell (Eucalipto), *Psidium myrsinites* DC. (Araçá vermelho), *Myrcia multiflora* (Cambuí), as quais já apresentam estudos químicos e farmacológicos (LOZANO et al., 2014; ARAUJO et al., 2015; SANTOS et al., 2018; COUTINHO et al., 2013; SOBRAL- SOUZA et al., 2017; LEITE et al., 2016).

2.1.1 Gênero *Psidium* L.

O gênero *Psidium* L. pertencente à família Myrtaceae contém aproximadamente 130 gêneros e mais de 100 espécies distribuídas ediferentes regiões geográficas do México, Caribe, Argentina e Uruguai (MCVAUGH, 1968; GOVAERTS et al., 2008). Cerca de metade das espécies sul-americanas de *Psidium* são encontradas no Brasil, está localizada na Bahia como *P. bahianum*, *P. ganevii*, *P. rotundidiscum*, *P. schenckianum* que endêmicas nesse estado (FRAZON et al., 2009). Outros biomas como a Mata Atlântica, o Cerrado e a Caatinga também podem ser considerados um centro de diversidade para *Psidium*.

Nos *Psidium*, o cálice é uma das principais estruturas usadas no reconhecimento das espécies, com folhas simples e opostas, com típica venação broquidódroma, e flores solitárias, axilares ou em pequenos racemos, as pétalas são livres e alternadas, de cor branca ou creme e com placentação intrusiva e frutos com muitas sementes (SOARES-SILVA; PROENÇA, 2008; FRAZON et al., 2009). Espécies deste gênero são comprovadamente importante, pois em grande parte, exibem naturalmente estruturas de armazenamento para óleos essenciais chamados pontos translúcidos (JOLY, 2002). Compostos como α -pineno, α -selineno, γ -selineno, 1,8-cineol, β -pineno, β -cariofileno, β -bisaboleno e p-cimeno (FREITAS et al., 2002; RAMOS et al., 2006; MEDEIROS et al., 2015) são frequentemente encontrados nos óleos essenciais de espécies deste gênero. Parece haver uma variação considerável dentro das espécies quanto à composição de metabolitos secundários dos óleos essenciais e se estes são taxonomicamente importantes ainda não está claro.

Nos últimos anos, estudos taxonômicos com *Psidium* foram numerosos, e várias espécies novas foram descritas, como pode-se observar nos estudos de Soares-Silva e Proença (2008), Landrum e Proença (2015) e Tuler et al. (2015). Diversas sspécies de *Psidium* são importantes do ponto de vista etnobotânico, pois além de serem utilizados na alimentação seja *in natura* ou derivados industrializados, também são utilizados na medicina local como agente terapêutico, através do aproveitamento de partes como caule, raiz, folhas para tratamento de diversas enfermidades, tais como infecções respiratórias, intestinais e urinárias, cólera, diabetes, hipertensão, dores, doenças venéreas, doenças de pele, gastrites, úlceras, micoses, aftas, diarreia, entre tantas outras, sendo preparada na forma de decocção, infusão e tintura

(GUTIÉRREZ; MITCHELL; SOLIS, 2008; SHRUTHI et al. 2013), sendo útil também na produção de madeira para construção e lenha para aproveitamento doméstico, artesanatos e pelo fornecimento de sombra (VIEIRA et al., 2006; DAMIANI, 2009).

Possui diversas atividades comprovadas e entre estes podemos citar: atividades antibacteriana (RAJAN et al., 2015), antifúngica (SUWANMANEE; KITISIN; LUPLERTLOP, 2014), antioxidante (FLORES et al., 2015), e antidiarreica (OJEWOLE; AWE; CHIWORORO, 2008), além de outros potenciais terapêuticos.

2.1.2 *Psidium myrtoides* O. Berg

Psidium myrtoides O. Berg, pode também ser conhecido como *Guajava myrtoides* (O. Berg) Kurtze ou *Guajava mysinoides* (O. Berg), possui hábito arbóreo sendo endêmica do Brasil, ocorre no Norte (Tocantins), Nordeste (Bahia, Ceará, Maranhão), Centro-Oeste (Distrito Federal, Goiás), Sudeste (Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo) e Sul (Paraná, Rio Grande do Sul) do país, nos domínios da Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica (ARAGÃO; CONCEIÇÃO, 2008; SOBRAL et al., 2015).

Conhecida popularmente no Ceará como 'Araça de veado' ou 'Araça', *P. myrtoides* é frequentemente encontrada em algumas áreas na Chapada do Araripe, ao sul do estado. Espécie decídua, destaca-se por possuir folhas coriáceas, as quais exalam odor agradável ao serem amassados, flores de cor branca e glândulas laminares visíveis (FRANZON et al., 2009; SOBRAL et al., 2015).

Na medicina tradicional, as populações locais relatam indicações medicinais para diarreia e disenteria, além de inflamações em geral (MACÊDO et al., 2016, SARAIVA et al., 2015) (Figura 1.). A espécie apresenta poucos registros que comprovem suas propriedades terapêuticas, o que engrandece o interesse em elucidar sua composição química e as propriedades biológicas desta espécie.

Estudos realizados recentemente por Dias et al., (2018) relatam sobre os principais constituintes químicos presente no óleo foliar desta espécie, onde trans- β -cariofileno (30,9%), α -humuleno (15,9%), α -copaeno (7,8%), óxido de cariofileno (7,3%) e α -bisabolol (5,3%) foram majoritários na amostra. A atividade antibacteriana também foi investigada contra patógenos orais, onde o óleo essencial exibiu atividade antibacteriana contra *Streptococcus mitis*, *S. sanguinis*, *S. sobrinus* e *S. Salivarius* e atividade muito promissora contra *S. mutans*.

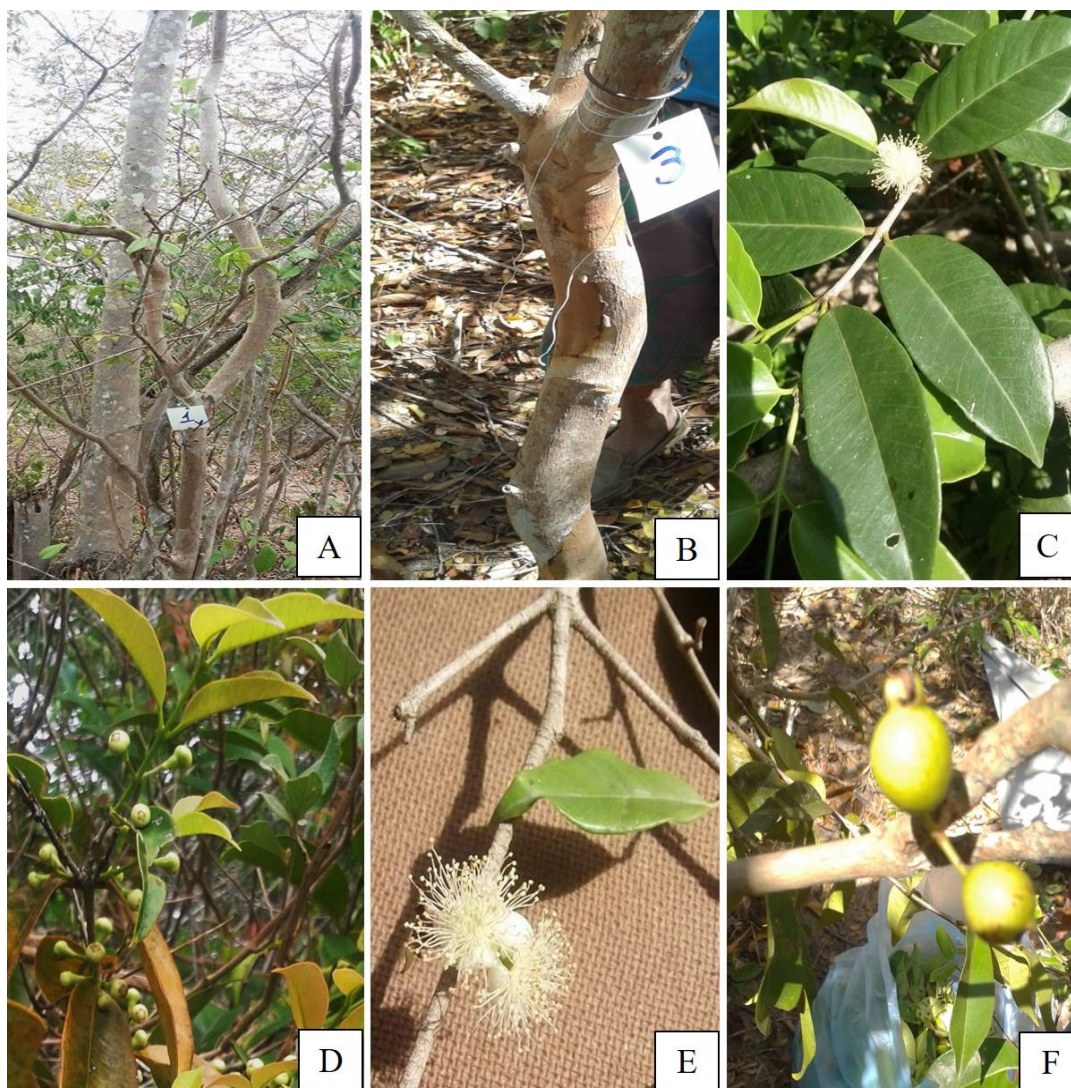


Figura 1. *Psidium myrtaoides* O. Berg (Araça de veado): (A) Aspecto da planta; (B) Caule; (C) Folhas; (D) Botão floral; (E) Flor; (F) Fruto. Fonte: Próprio autor.

2.1.3 *Psidium salutare* (Kunth) O. Berg

Psidium salutare (Kunth) O. Berg. pode também ser conhecido como *Guajava salutaris* (Kunth) Kuntze ou *Myrtus salutaris* Kunth, é um subarbusto frutífero, encontrada em áreas de cerrado, campo rupestre e áreas sujeitas a queima de 1000 a 1600 m. Ocorre no México, Uruguai e no Brasil, no cerrado aberto do Ceará, Bahia, Mato Grosso, Minas Gerais, Goiás, Pará, Tocantins, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul.

P. salutare apresenta botões florais relativamente pequenos, um cálice aberto, geralmente com lóbulos bem definidos, placenta peltada e capacidade de brotar após incêndios. Distingue-se da maioria de outras Myrtaceae pela casca áspera e rachadura profunda no tronco (SOBRAL et al., 2015; LANDRUM, 2017) (Figura 2.). Com cinco variedades reconhecidas (LANDRUM,

2003). Conhecida popularmente pelas comunidades do entorno da Chapada do Araripe por 'Araça preto' encontrada em áreas de cerrado (SILVA et al., 2012). Na medicina tradicional, as populações locais consomem o fruto e utilizam as folhas para tratar dor de barriga e diarreia (PEREIRA, 2010; MACÊDO et al., 2016).

Quanto a composição química de *Psidium salutare*, Pino et al., (2013) detectaram a presença de óxido de cariofileno, α -pineno, α -cubebeno, ar-turmerone, β -gurjuneno, β -selineno e viridifloreno nas folhas da planta. Entretanto, além da constatação de tais metabólitos, outros compostos foram identificados no fruto desta espécie, como por exemplo: limoneno, mirceno, terpineno e α -pineno, além de vários terpenóides, aldeídos e ésteres gordurosos.

No que diz respeito à atividade biológica desta espécie, foram relatados resultados promissores quanto a sua atividade antioxidante, antimicrobiana e citotoxicidade *in vitro* dos extratos hexânico, clorofórmico, e etanólico de *P. salutare* (SIMONETTI et al., 2016). Sendo uma espécie com poucos relatos bibliográficos, novos estudos necessitam ser realizados otimizando-se o método de extração dos constituintes fitoquímicos das plantas para avaliação de outras atividades biológicas.

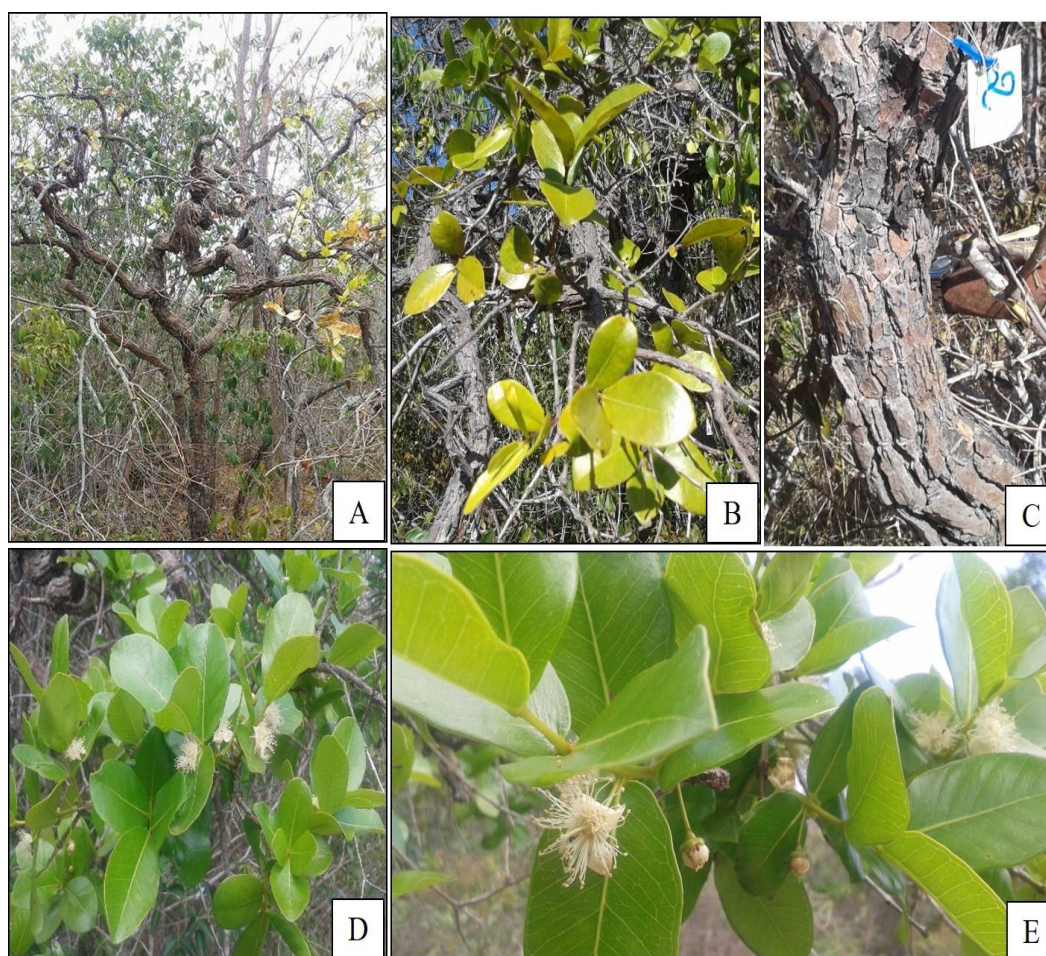


Figura 2. *Psidium salutare* (Kunth) O. Berg (Araça preto): (A) Aspecto da planta; (B) Folhas; (C) Caule com fissuras profundas; (D) Botão floral; (E) Flor. Fonte: Próprio autor

2.2 Importância da etnobiologia no direcionamento de pesquisas etnofarmacológicas

A etnobiologia tem se concentrado predominantemente no papel utilitário das plantas e animais (TOLEDO; ALARCÓN-CHÁIRES, 2012). A realização de pesquisas com produtos naturais, notadamente com plantas, organismos marinhos e microrganismos, obteve enorme avanço, propiciando a descoberta de diversas substâncias químicas utilizadas atualmente na terapêutica (CRAGG; NEWMAN, 2013). Muitas vezes, a busca por plantas com potencial farmacológico tem sido realizada utilizando-se de diferentes tipos de abordagens, a maioria pautada em algum tipo de observação (ALBUQUERQUE; HANAZAKI, 2006), entre as quais abordagens randômica, etológica, biotecnológica, quimiotaxonômica e a etnobiológica são as mais conhecidas. A primeira envolve a escolha ao acaso, a segunda baseia-se na observação do comportamento animal, a terceira consiste na escolha de uma espécie que pertença ao mesmo táxon de outra cuja composição fitoquímica é conhecida, enquanto a última leva em consideração o conhecimento tradicional sobre as propriedades medicinais das plantas (CHAVES, 2016).

Diante disto, o conhecimento empírico tem grande relevância na descoberta de novas plantas medicinais, fornecedoras de substâncias químicas bioativas oriundas principalmente do metabolismo celular secundário do vegetal (DIEGUES; ARRUDA, 2001). A elucidação estrutural dos princípios ativos de uma planta medicinal constitui um passo indispensável para a compreensão do seu mecanismo de ação (SIMÕES et al., 2014). Por esta razão, o entendimento e isolamento dos princípios ativos das plantas é uma das prioridades da farmacologia (CRAGG; NEWMAN, 2013).

Dessa forma, pesquisadores têm investido na abordagem etnodirigida para a seleção de espécies com potencial para a produção de novas drogas, supondo que tal abordagem traz maior sucesso na descoberta de novos produtos (ALBUQUERQUE; HANAZAKI, 2006). Ao empregar a abordagem etnobotânica e/ou etnofarmacológica, as informações sobre uso de plantas medicinais fornecidas pela comunidade são combinadas aos resultados obtidos em estudos químicos e farmacológicos (SIMÕES et al., 2014) e caso os dados sejam positivos e efetivos, o entendimento da ecologia química das plantas investigadas se tornam essenciais, podendo fornecer informações de melhor época de coleta e melhor período em que a planta produz alto rendimento de substâncias essenciais para o tratamento medicinal e posteriores utilizações farmacológicas.

2.3 Variabilidade química de óleos essenciais relacionados aos fatores ambientais

Em sua grande maioria as substâncias bioativas dos vegetais são classificadas como metabólitos secundários, apresentando duas importantes características: grande variedade estrutural e a possibilidade de apresentarem atividade biológica (VEIGA-JUNIOR et al., 2005). Tais substâncias são biossintetizadas nos vegetais a partir do metabolismo primário (carboidratos, aminoácidos, lipídeos e ácidos nucleicos) e incluem classes químicas como alcaloides, terpenos, compostos fenólicos (ex. flavonoides, taninos, ácidos fenólicos), glicosídeos cianogênicos, dentre outros (MIRANDA et al., 2013; PEREIRA, 2017).

Entre as substâncias sintetizadas pelas plantas, encontram-se os constituintes dos óleos essenciais que são sintetizados em todos os órgãos da planta como flores, folhas, cascas, rizomas e frutos (BIZZO et al., 2009). Os óleos essenciais são líquidos voláteis lipossolúveis, às vezes com aromas e de composição química bastante complexa, podem ser encontrados em diversas partes das plantas. São principalmente constituídos de monoterpenos, sesquiterpenos, fenilpropanoides e outras substâncias de baixa massa molecular (MAIA et al., 2015).

Durante o desenvolvimento das plantas a síntese dos compostos químicos podem ser afetados por uma variedade de fatores, que interferem na sua produção e concentração (ESTELL et al., 2016). Para lidar com a influência de fatores estressantes que influenciam na presença e quantidade de compostos nos óleos essenciais, as plantas desenvolvem alterações nos mecanismos bioquímicos (ARAÚJO et al., 2008). Destacando-se as interações da planta produtora de óleo com outras plantas, através da alelopatia, a interação com insetos e microrganismos por meio de indução por estímulos mecânicos ou ataque de patógenos, idade da planta, fase fenológica, luminosidade, temperatura, pluviosidade, nutrição, época e horário de coleta, técnicas de colheita, pós colheita e poluição atmosférica (GOUVEA et al., 2012; RADUSIENE et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2017). Essa variação tem grande importância porque as substâncias químicas presentes nos extratos/óleos têm significado biossistemático, fisiológico, ecológico, terapêutico e implicações evolutivas (BAKKALI et al., 2008; EDRIS, 2007).

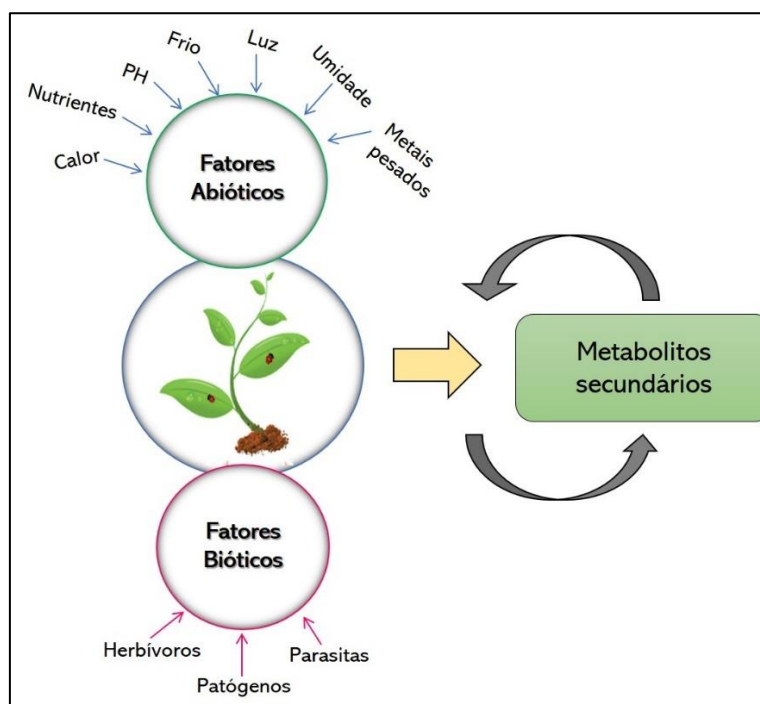
Estudos relatam a interferência de fatores bióticos e abióticos no teor e na composição química do óleo essencial produzido por plantas. De acordo com Trovão et al. (2007) sazonalidade são todas as transformações que acontecem no ambiente em decorrência das mudanças climáticas das estações do ano. As variações sazonais acontecem com os padrões climáticos comuns como: radiação solar, umidade, temperatura entre outros fatores. Um exemplo de influência sazonal é o caso de *Digitalis obscura* L. que apresenta menor concentração de cardenolídeos na primavera e uma fase de rápido acúmulo no verão, seguida

por uma fase de decréscimo no outono (ROCA-PÉREZ et al., 2004). Ainda nas estações seca e chuvosa, Almeida et al. (2014) comparou os perfis fitoquímicos dos óleos essenciais das folhas de *C. langsoerffii* provindos de três áreas selecionadas de cerrado no estado de São Paulo (duas áreas de floresta estacional semidecídua e uma área de cerrado *strictu sensu*), ocasião em que verificou que espécies de copaíba das florestas estacionais semidecíduais mostraram diferenças no perfil fitoquímico obtido em períodos secos e chuvosos e os teores de monoterpenos e sesquiterpenos diminuíram na estação chuvosa.

Considerando as variações químicas ocasionadas por fatores ambientais em conjunto com os eventos fenológicos, pesquisa realizada com *Lipia alba* em condições de cultivo semelhantes demonstrou que o rendimento do óleo e os teores dos componentes majoritários são maiores na fase de crescimento vegetativo (TAVARES et al., 2005). A época em que uma planta é coletada é um dos fatores que podem afetar a natureza dos constituintes ativos, neste contexto Yao et al. (2016) verificaram que para o óleo essencial de *Pyrola incarnata* Fisch, o horário de colheita influenciou sua composição química e rendimento.

A temperatura e a luminosidade também são fatores relevantes que podem influenciar na fotossíntese, pois a interação destes, garante um ambiente ideal para o processo fisiológico da planta (LIU et al., 2014). Os óleos essenciais, na maioria das vezes, apresentam um aumento em seu teor quando as plantas produtoras se encontram em ambientes com temperaturas elevadas, porém, em dias muito quentes, observa-se a perda excessiva destes teores (VALLAT; GU; DORN, 2005).

O fator hídrico também pode afetar significativamente o crescimento e desenvolvimento da planta como um todo. A deficiência hídrica, caracterizada por diferentes formas e intensidades é a principal causa de perda de produtividade (SANTOS et al., 2012) porém, apresenta correlação direta na concentração de metabólitos secundários, havendo relatos na literatura de que o estresse hídrico geralmente induz um aumento na produtividade de alguns terpenoides (MORAIS, 2009). Dentre os inúmeros fatores bióticos e abióticos que podem interferir nas variações do conteúdo de metabólitos secundários, o fator hídrico se destaca, nesse sentido há necessidade mais estudos visando detectar as condições e épocas para coleta que conduzam a uma matéria-prima vegetal com concentrações desejáveis de princípios ativos que estejam relacionados a atividades biológicas (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).



Fonte:Macêdo, 2018

Figura 3: Principais fatores que podem influenciar o acúmulo de metabólitos em plantas.

O estudo da composição química de produtos vegetais possibilita a identificação de substâncias com propriedades tóxicas, terapêuticas e conhecimento de novas estruturas moleculares. Este conhecimento auxilia no controle de qualidade de fitoterápicos, contribuindo para o uso racional de plantas medicinais e ampliando o conhecimento quimiotaxonômico de várias espécies vegetais (LORENZI; MATOS, 2002).

2.4 Mecanismo de resistência de espécies de *Candida* a drogas antifúngicas

As leveduras do gênero *Candida* são consideradas microrganismos oportunistas da microbiota normal de seres humanos, podendo estar presentes na cavidade oral e nos tratos gastrointestinal e urogenital. Geralmente não causam processos infecciosos em indivíduos saudáveis, mas podem acometer pacientes imunocomprometidos e/ou sob terapia antimicrobiana por um período de tempo prolongado (SANTANA, 2010).

Candidíase ou candidose é uma micose ocasionada por leveduras do gênero *Candida*, em que a lesão pode ser branda, aguda ou crônica, superficial ou profunda, e de espectro clínico bem variado. O principal agente das candidíases é *C. albicans*. Esta levedura faz parte da microbiota humana e é considerada um agente oportunista. No entanto, outras espécies são consideradas agentes da candidíase, como: *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. glabrata*, *C. kefyr*, *C. lusitanae*, entre outras (BARBEDO e SGARBI, 2010).

Ao passo do desenvolvimento de novos fármacos, por meio de produtos naturais ou sintéticos bioativos, os fungos desenvolveram seus mecanismos de resistência frente aos antifúngicos utilizados atualmente (KOK et al., 2015). A resistência aos antifúngicos pode ser classificada em resistência microbiológica e resistência clínica. A resistência clínica é definida, classicamente, como persistência ou progressão de uma infecção, mesmo com a administração do tratamento antifúngico adequado. E a resistência microbiológica, por sua vez, é um fenômeno verificado *in vitro*, no qual o agente etiológico consegue se desenvolver na presença de concentrações terapêuticas da referida droga (PEREA; PATTERSON, 2002; SANGUINETTI et al., 2015; KANAFANI; PERFECT, 2008). A dinâmica destes mecanismos de resistência é uma constante, sobretudo pelo aparecimento de novos aperfeiçoamentos e modificações, em uma evolução progressiva, o que dificulta cada vez mais a eficácia das terapias (PERLIN et al., 2015).

As classes de drogas antifúngicas mais utilizadas terapêuticamente incluem: polienos, azóis, alilaminas, flucitosina e equinocandinas (KATHIRAVAN et al. 2012). Dentre os diversos mecanismos de ação tem como alvo a modificação da permeabilidade de membrana da célula, a síntese dos ácidos nucleicos e proteínas. A flucitosina (5-fluorocitosina) atua interferindo no metabolismo de bases pirimidina e, de forma alterando síntese de DNA e RNA, enquanto, as equinocandinas (caspofungina, anidulafungina e micafungina) agem na parede celular (PERLIN et al., 2015). Entre esses antifúngicos citados, os azólicos (por exemplo, fluconazol, voriconazol e posaconazol) e alilaminas (por exemplo, terbinafina) são os mais usados principalmente em razão de sua menor toxicidade. Os derivados azólicos inibem a biossíntese do ergosterol, enquanto polienos (por exemplo, anfotericina B) ligam-se ao ergosterol na membrana plasmática, onde eles formam poros grandes que perturbam células função. (Cowen et al., 2014).

C. albicans desenvolve resistência a drogas antimicóticas padrão regularmente aplicadas, como clotrimazol, nistatina, fluconazol e cetoconazol (VIEIRA; SANTOS, 2016), e, como consequência, a demanda por prevenção é alta. Em todo o mundo vários extratos de plantas têm sido tradicionalmente utilizados para prevenir a Candidíase (HÖFLING et al., 2011). A desvantagem desses tratamentos é que eles podem interagir com outros medicamentos causando mudanças na solubilidade e absorção da droga, metabolismo e fisiologia do trato gastrointestinal (PIRMOHAMED, 2013). Isso resulta em reações adversas a medicamentos, como reações alérgicas, efeitos reduzidos de contraceptivos e danos ao estômago (ABOELLIL; AL-TUWAIJRI, 2010). Por conseguinte, é necessária investigação para identificar, detectar e rastrear alternativas como, por exemplo, compostos de plantas, que sejam eficazes na prevenção da candidíase.

C. tropicalis é uma das espécies de *Candida* mais diagnosticadas em isolados clínicos, tornando-se responsável por diferentes tipos de infecções. Apresenta alta capacidade de formação de biofilme, o que lhe confere vantagens em relação às defesas do hospedeiro. A resistência antifúngica significativa, estabelece um reservatório que favorece reinfecções e tem acarretado maior morbidade e taxas de mortalidade (DEORUKHKAR et al., 2014). Outro fator associado a patogenicidade de *C. tropicalis* é a capacidade de sofrer alteração fenotípica – comutação (MORALEZ et al., 2014), evento importante tanto para que o fungo possa se adaptar às alterações ambientais durante a infecção, quanto para a regulação da patogenicidade em *Candida* spp.

A *C. krusei* foi reconhecida como um agente patogênico fúngico potencialmente multirresistente (RMD), devido à sua resistência intrínseca ao fluconazol, combinada com relatos de suscetibilidade diminuída tanto à flucitosina quanto à anfotericina B (NGUYEN et al., 1996; PFALLER; DIEKEMA, 2007). Vários autores relataram infecções de ruptura por *C. krusei* entre os pacientes que receberam fluconazol ou anfotericina B (PAN et al., 2005; MAJOROS et al., 2006; PEMÁN et al., 2006). Apesar da resistência intrínseca ao fluconazol, *C. krusei* geralmente permanece suscetível *in vitro* ao voriconazol devido à ligação mais efetiva do voriconazol à isoenzima do citocromo P-450 de *C. krusei* (FUKUOKA et al., 2003; PFALLER; DIEKEMA, 2007). Além disso, o voriconazol tem sido usado com sucesso para tratar alguns pacientes infectados com *C. krusei* (KULLBERG et al., 2005). Estas descobertas enfatizam a plasticidade de *C. krusei* no que diz respeito ao desenvolvimento de resistência a uma ampla gama de antifúngicos.

A problemática da resistência fúngica vem sendo amenizada com a introdução de novas formulações terapêuticas para o tratamento de infecções. Entretanto, há uma tendência para a ocorrência de repetição padrão de uso de drogas antifúngicas, uma vez que o uso excessivo destas, favorece o desenvolvimento de novos mecanismos de resistência (O'DONNELL et al., 2015). Uma estratégia promissora para enfrentar tal problemática e a combinação de duas ou mais substâncias na terapia, que de preferência não compartilhem o mesmo mecanismo de ação podendo ser de origem natural ou sintética. O sinergismo ocorre quando a combinação de duas substâncias resulta em uma interação positiva, promovendo um efeito inibidor sobre os microorganismos alvo maior do que a soma dos efeitos individuais (CHANDA; RAKHOLIYA, 2011; SANTOS et al., 2014). Neste caso, pode-se diminuir a dosagem do fármaco, mantendo-se ou aumentando a eficácia e diminuindo ou evitando a toxicidade.

3 REFERÊNCIAS

- ABOELLIL, A.; AL-TUWAIJRI, M. Effect of some alternative medicine and biological factors on *Candida albicans* in Saudi Arabia. **Journal of Yeast and Fungal Research**, v.1, p.100 – 107, 2010.
- ALBUQUERQUE, U. P.; HANAZAKI, N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, 2006.
- ALBUQUERQUE, U.P. et al. New strategies for drug discovery in tropical forests based on ethnobotanical and chemical ecological studies. **Journal of Ethnopharmacology**. 140, p. 197–201, 2012.
- ALMEIDA, F. R., L. et al. Dry and wet seasons set the phytochemical profile of the *Copaifera langsdorffii* Desf essential oils. **Journal of Essential Oil Research**. V.26, p. 292–300, 2014.
- ARAGÃO, J. G.; CONCEIÇÃO, G. M. Myrtaceae: espécies das subtribos *Eugeniinae*, *Myrciniinae* e *Myrtinae* registradas para o Estado do Maranhão. **Revista Sinapse Ambiental**, p. 7-17, 2008.
- ARAUJO, H. M. et al. Chemical profile and antioxidant capacity verification of *Psidium guajava* (Myrtaceae) fruits at different stages of maturation. **Excli Journal**, v. 14, p. 1020-1030, 2015.
- ARAÚJO, T.A.S. et al. A new approach to study medicinal plants with tannins and flavonoids contents form the local knowledge. **Journal of Ethnopharmacology**, v.120, p. 72–80. 2008.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils – a review. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, n.2, p.446-475, 2008.
- BARBEDO, L. S., SGARBI, D. B. G. Candidíase. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v. 22, n. 1, p. 22-38, 2010.
- BIZZO, H. R. et al. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, v. 32, p. 588-594, 2009.
- CALIXTO JÚNIOR J.T. et al. Phytochemical Analysis and Modulation of Antibiotic Activity by *Luehea paniculata* Mart. & Zucc. (Malvaceae) in multi-resistant clinical isolates of *Candida* spp. **Biomed Research International** v. 2015, 2015.
- CAMPOS, L. Z. O. **Etnobotânica do gênero *Psidium* L. (Myrtaceae) no Cerrado brasileiro**. 2010. Dissertação (Mestrado em Botânica). Universidade de Brasília, Brasília.
- CASTRO-MORENO, M. et al. Influence of seasonal variation on the phenology and liriodenine content of *Annona lutescens* (Annonaceae). **Journal of Plant Research**, v.126, p.529–537, 2013.
- CHANDA, S.; RAKHOLIYA, K. Combination therapy: Synergism between natural plant extracts and antibiotics against infectious diseases. **Microbiol Book Series**, p.520-529, 2011.
- CHAVES, T. P. **Estudo químico-farmacológico do extrato seco de *Poincianella pyramidalis* (Tul.) L.P.** 2016. Tese (Doutorado em Etnobiologia e Conservação da Natureza). Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife. p.172.

- COUTINHO, H. D. M. et al. Análise físico-química e avaliação antimicrobiana do fruto cambuí (*Myrcia multiflora*). **Biofar: Revista de Biologia e Farmácia**, v. 9, p. 26-33, 2013.
- CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochim Biophys Acta**. v. 1830, n. 6, p. 3670-3695, 2013.
- CRONQUIST, A. 1981. **An integrated system of classification of flowering plants**. Columbia University Press. New York.
- DAMIANI, C. Caracterização e agregação de valor aos frutos do cerrado: araçá (*Psidium guineenses* Sw.) e marolo (*Annona crassiflora* Mart.). 2009. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos), Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais.
- DEORUKHKAR, S. C. et al. Virulence Factors Contributing to Pathogenicity of *Candida tropicalis* and Its Antifungal Susceptibility Profile. **International Journal of Food Microbiology**. 45:68-78, 2014.
- DIAS, ALLINE LB, et al. "Chemical composition and in vitro antibacterial and antiproliferative activities of the essential oil from the leaves of *Psidium myrtoides* O. Berg (Myrtaceae)." **Natural product research** 1-5., 2018.
- DIAS, C. N. et al. Chemical Composition and Larvicidal Activity of Essential Oils Extracted from Brazilian Legal Amazon Plants against *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 1–8. 2015.
- DIEGUES. A. C.; ARRUDA, R. S. V. **Saberes tradicionais e biodiversidade no Brasil**. Ministério do Meio Ambiente- MMA: Brasília/ USP: São Paulo. 2001.
- DIGNANI, M.C. et al. In: ANAÏSSIE, E.J., MCGINNIS, M.R., PFALLER, M.A. **Clinical Mycology**. 2nd ed., Amsterdam: Elsevier, 2009.
- DUARTE, A. Et al. Antimicrobial Activity and Modulatory Effect of Essential Oil from the Leaf of *Rhaphiodon echinus* (Nees & Mart) Schauer on Some Antimicrobial Drugs. **Molecules**, v. 21, p. 743, 2016.
- DUDAREVA, N. et al. Biosynthesis, function and metabolic engineering of plant volatile organic compounds. **New Phytologist**, v. 198, p. 16-32, 2013.
- EDRIS, A. E. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. **Phytotherapy Research**, v.21, p.308-323, 2007.
- ESTELL, R.E. et al. Effect of light intensity and wavelength on concentration of plant secondary metabolites in the leaves of *Flourensia cernua*. **Biochemical systematics and ecology**, v.65, p.108-114, 2016.
- FINKEL, J. S.; MITCHELL, A. P. Genetic Control of *Candida albicans* biofilm development. **Nature Reviews Microbiology**, Pittsburg, v.09, 109-18, 2011.
- FLORES, G. et al. Chemical composition and antioxidant activity of seven cultivars of guava (*Psidium guajava*) fruits. **Food chemistry**, v. 170, p. 327-335, 2015.
- FRAZON, R.C. et al. Documentos 226 - Araças do gênero *Psidium*: principais espécies, ocorrência, descrição e usos. **Embrapa Cerrados**, Planaltina, DF, 2009.
- FREITAS, M. O. et al. Volatile Constituents of *Psidium myrsinoides* O. Berg. **Journal of Essential Oil Research**, v.14, p.364-365, 2002.

- FUKUOKA, T. et al. Genetic basis for differential activities of fluconazole and voriconazole against *Candida krusei*. *Antimicrob. Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. V.47, p.1213-1219, 2003.
- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova*, São Paulo, v.30, n.2, p.374-381, 2007.
- GOUVEA, D. R. et al. Seasonal variation of the major secondary metabolites present in the extract of *Eremanthus mattogrossensis* Less (Asteraceae: Vernoniae) leaves. *Química Nova*, v.35, p. 2139-2145, 2012.
- GOVAERTS, R.; SOBRAL, M.; ASHTON, P.; BARRIE, F.; HOLST, B.K.; LANDRUM, L. R.; MATSUMOTO, K.; MAZINE, F.F.; NIC LUGHADHA, E.; PROENÇA, C.; SOARES-SILVA, L.H.; WILSON, P.G.; LUCAS, E.J. **World checklist of Myrtaceae**. Kew Publishing, Royal Botanic Gardens, 2008. Disponível em: <<http://www.kew.org/wcsp/myrtaceae>>. Acesso em: 029 de janeiro de 2017.
- GRESSLER, E. et al. Polinização e dispersão de sementes em Myrtaceae do Brasil. *Revista Brasileira de Botânica*, v.29, p.509–530, 2006.
- GUTIÉRREZ, R. M. P. et al. *Psidium guajava*: A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 117, p. 1-27, 2008.
- GUTIÉRREZ, R. M. P.; MITCHELL, S.; SOLIS, R. V. *Psidium guajava*: a review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 117, n. 1, p. 1-27, 2008.
- HÖFLING J. F. et al. Evaluation of antifungal activity of medicinal plant extracts against oral *Candida albicans* and proteinases. *Mycopathologia*, v.172, p.117–124, 2011.
- HUSSAINA, A.I. et al. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. *Food Chemistry*, v.108, p. 86-95, 2008.
- JOLY, A.B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. 13.ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 2002. 778p.
- KANAFANI, Z. A.; PERFECT, J. R. Resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. *Clinical Infectious Diseases*, v. 46, p. 120-128, 2008.
- KOK, E. T. et al. Resistance to Antibiotics and Antifungal Medicinal Products: Can Complementary and Alternative Medicine Help Solve the Problem in Common Infection Diseases? The Introduction of a Dutch Research Consortium. **Evidence-based Complementary And Alternative Medicine**, Leiden, v.2015, 6p. 2015.
- KULLBERG, B. J. et al. Voriconazole versus a regimen of amphotericin B followed by fluconazole for candidemia in non-neutropenic patients: a randomized non-inferiority trial. *Lancet*. 366, 1435-1442, 2005.
- LANDRUM, L. R. A revision of the *Psidium salutare* complex (Myrtaceae). *SIDA, Contributions to Botany*. 20(4): 1449–1469, 2003.

- LANDRUM, L. R. **The Genus *Psidium* (Myrtaceae) in the State of Bahia, Brazil.** Herbarium, Natural History Collections, School of Life Sciences, Arizona State University, 101p. 2017.
- LANDRUM, L. R.; PROENÇA, C. E. B. New species of *Psidium* (Myrtaceae) from the Brazilian Northeast. **Brittonia**, v. 67, p.324 – 327, 2015.
- LANDRUM, R. L.; FUNCH, S. L. Two New Species of *Psidium* (Myrtaceae) from Bahia, Brazil. **Novon**, v.18, p.74–77, 2008.
- LEITE, N. F. et al. Efecto citoprotector de extractos de *Eugenia jambolana* y ***Psidium myrsinites* DC.** A. contra peroxidación lipídica inducida por hierro II. **Acta toxicológica**. v. 24, p. 187-192, 2016.
- LIU, C.C. et al. Multivariate analysis of effects of diurnal temperature and seasonal humidity variations by tropical savanna climate on the emissions of anthropogenic volatile organic compounds. **Science of The Total Environment**, v.470, p.311–323, 2014.
- LIU, H. et al. Effect of drought stress on growth and accumulation of active constituents in *Salvia miltiorrhiza* Bunge. **Industrial Crops and Products**, v.33, p. 84-88, 2011.
- LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: Nativas e exóticas.** Nova Odessa – SP: Instituto Plantarum. 100p, 2002.
- LOZANO, A. et al. The apparency hypothesis applied to a local pharmacopoeia in the Brazilian northeas. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v.10: 2, 2014.
- LUCAS, E.J.; BUNGER M.O. Myrtaceae in the Atlantic forest—their role as a ‘model’ group. **Biodiversidade e Conservação**, v.24, p.2165–2180, 2015.
- MACÊDO, D.G. et al. Versatility and consensus of the use of medicinal plants in an area of cerrado in the Chapada do Araripe, Barbalha-CE- Brazil. **Journal of Medicinal Plants Research**, v.10, p.505–514, 2016.
- MAIA, T. F. et al. Atividade antifúngica de óleos essenciais de plantas. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 17, p. 105-116, 2015.
- MAJOROS, L. et al. Slow response of invasive *Candida krusei* infection to amphotericin B in a clinical time-kill study. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v.25, p. 803-806, 2006.
- MARIN, R. et al. Volatile components and antioxidant activity from some Myrtaceae fruits cultivated in Southern Brazil. **American Journal of Pharmaceutical Education**, v.27, p.172-177. 2008.
- MCVAUGH, R. The genera of American Myrtaceae—Na interim report. **Taxon**, v.17, p.354–418, 1968.
- MEDEIROS, F. C.M. et al. Scents from Brazilian Cerrado: *Psidium myrsinites* DC. (Myrtaceae) leaves and inflorescences essential oil. **Journal of Essential Oil Research**. vol. 27, p.289–292, 2015.
- MENEZES, E. A, et al. Perfil de suscetibilidade *Candida tropicalis* a antifúngicos sistêmicos, **Revista de Patologia Tropical**, v. 42, n. 1, 2013.

- MIRANDA, G.S. et al. Atividade antibacteriana in vitro de quatro espécies vegetais em diferentes graduações alcoólicas. **Revista brasileira de planta medicinais**, v.15, p.104-111, 2013.
- MORAIS, L. A. S. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura Brasileira**, v. 27, 2009.
- MORAIS-BRAGA, M.F.B. et al. *Psidium guajava* L. and *Psidium brownianum* Mart ex DC.: Chemical composition and anti - *Candida* effect in association with fluconazole. **Microbial Pathogenesis** v.95, p.200–207, 2016.
- MORALEZ, A. T. P. et al. Phenotypic switching in *Candida tropicalis*: association with modification of putative virulence attributes and antifungal drug sensitivity. **Medical mycology**, v. 52, p. 106-114, 2014.
- NGUYEN, M. H. et al. The changing face of candidemia: emergence of non-*Candida albicans* species and antifungal resistance. **American Journal of medicine**, v.100, p. 617-623, 1996.
- NIC LUGHADHA, E.N.; PROENÇA, C. A survey of the reproductive biology of the Myrtoideae (Myrtaceae). **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 83, p.480–503, 1996.
- O'DONNELL, L. E. et al. *Candida* Virulence Factors. In: **Oral Candidosis**. Springer Berlin Heidelberg, v.7, p.19. 2015.
- OJEWOLE, J. A. O.; AWE, E. O.; CHIWORORO, W. D. H. Antidiarrhoeal activity of *Psidium guajava* Linn.(Myrtaceae) leaf aqueous extract in rodents. **Journal of Smooth Muscle Research**, v. 44, n. 6, p. 195-207, 2008.
- OLIVEIRA, J.D. et al. Rendimento, composição química e atividades antimicrobiana e antioxidante do óleo essencial de folhas de *Campomanesia adamantium* submetidas a diferentes métodos de secagem. **Revista brasileira de plantas medicinais**. v.18, 2016.
- Organização Mundial da Saúde. **Resistência antimicrobiana: relatório global sobre vigilância**. Organização Mundial da Saúde, 2014.
- PAN, S. C. et al. Septic *Candida krusei* thrombophlebitis of inferior vena cava with persistent fungemia successfully treated by new antifungal agents. **Medical Mycology**, v.43, p.731-734, 2005.
- PEMÁN, J. et al. Spondylodiscitis caused by *Candida krusei*: case report and susceptibility patterns. **Journal of Clinical Microbiology**, v.44, p.1912-1914, 2006.
- PEREA S, PATTERSON T. Antifungal resistance in pathogenic fungi. **Clinical Infectious Diseases**, v.35, p.1073-80, 2002.
- PEREIRA, C. K. B. P. **Estudo químico e atividades microbiológicas de espécies do gênero *Psidium* (Myrtaceae)** 2010. Dissertação (Mestrado em Bioprospecção Molecular) Universidade Regional do Cariri, Crato-CE.
- PEREIRA, J. A. S. **Avaliação da variabilidade do metabolismo secundário em *Cordia verbenacea* DC.** 2017. Tese (Doutorado Ciências Farmacêuticas). Araraquara.
- PERLIN, D. S. et al. Update on antifungal drug resistance. **Current clinical microbiology reports**, v. 2, p. 84-95, 2015.

- PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. **Clinical Microbiology Reviews**, v.20, p.133-163, 2007.
- PIRMOHAMED, M. Drug-grapefruit juice interactions: two mechanisms are clear but individual responses vary. **British Medical Journal**, v.7, p.346, 2013.
- PINO, JORGE A., et al. "Leaf oil of *Psidium salutare* (HBK) Berg. from Cuba." **Journal of Essential Oil Research** 15.1: 19-20, 2003.
- PINO, JORGE A., et al., "Volatile compounds of *Psidium salutare* (HBK) Berg. fruit." **Journal of agricultural and food chemistry** 50.18: 5146-5148, 2002.
- RADUŠIENĖ, J. et al. Effect of external and internal factors on secondary metabolites accumulation in St. John's worth. **Botanica Lithuanica**, v. 18, p. 101-108, 2012.
- RAJAN, S. et al. Anti-enteric bacterial activity of the traditional medicinal plants of Kanyakumari coast, Tamilnadu, India **Journal of Coastal Life Medicine** **Journal of Coastal Life Medicine**, v. 3, n. 8, p. 640-644, 2015.
- RAJAN, S. et al. Anti-enteric bacterial activity of the traditional medicinal plants of Kanyakumari coast, Tamilnadu. **Journal of Coastal Life Medicine**, v. 3, n. 8, p. 640-644, 2015.
- RAMOS, M. F. S. et al. Avaliação da Atividade Antiinflamatória dos óleos essenciais de cinco espécies de Myrtaceae. **Revista Fitos**, v.2, 2006.
- RIBEIRO, D.A. et al. Therapeutic potential and use of medicinal plants in an area of the Caatinga in the state of Ceará, northeastern Brazil. **Revista brasileira de plantas medicinais**. v.16, n.4, p.912-930, 2014.
- ROCA-PÉREZ, L. et al. Seasonal cardenolide production and Dop5betar gene expression in natural populations of *Digitalis obscura*. **Phytochemistry**, v.65, p.18-69, 2004.
- SANGUINETTI, M. et al. Antifungal drug resistance among *Candida* species: mechanisms and clinical impact. **Mycoses**, v. 58, n. S2, p. 2-13, 2015.
- SANTANA, D. P., et al. Prevalência de fatores de virulência de *Candida albicans* isoladas da cavidade bucal de crianças portadoras e não portadoras de síndrome de Down. **Enciclopédia Biosfera**, v. 6, n. 11, p. 1-10, 2010
- SANTOS, D. et al. Cultivares de trigo submetidas a déficit hídrico no início do florescimento, em casa de vegetação. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. v.16, p.836–842, 2012.
- SANTOS, F.R. et al. Influência da idade das folhas de *Eugenia uniflora* L., na composição química do óleo essencial. **Química Nova**, v38, p.762-768, 2015.
- SANTOS, J. F. S. et al. Chemical composition, antifungal activity and potential anti-virulence evaluation of the *Eugenia uniflora* essential oil against *Candida* spp. **Food Chemistry**, v. 261, p. 233-239, 2018.
- SANTOS, N. G. Potential Drug Interactions in the Protocol of Oncologic Palliative Care for Pain. **Revista de Divulgação Científica Sena Aires**, p.57-66, 2014.
- SARAIVA, M. E. et al. Plant species as a therapeutic resource in areas of the savanna in the state of Pernambuco, northeast Brazil. **Journal Ethnopharmacology**, v.171, p.141-53, 2015.

SARDI, J. C. O. et al. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. **Journal of medical microbiology**, v. 62, n, p. 10-24, 2013.

SHRUTHI, D. S. et al. A review on the medicinal plant *Psidium guajava* Linn.(Myrtaceae). **Journal of Drug Delivery and Therapeutics**, v. 3, n. 2, p. 162-168, 2013.

SILVA, S. R. et al. Angiosperms from the Araripe National Forest, Ceará, Brazil. **Check list**, v.766, p.744–751, 2012.

SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Santa Catarina: Editora da UFSC, 2014.

SIMONETTI, EVELINE, et al. "Evaluation of the antimicrobial activity of extracts of *Eugenia anomala* and *Psidium salutare* (Myrtaceae) against the *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes*." **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. 18: 9-18, 2016.

SOARES-SILVA, L. H.; PROENÇA, C. E. B. A new species of *Psidium* L. (Myrtaceae) from southern Brazil. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v.158, p.51–54, 2008.

SOBRAL- SOUZA, et al., Characterization, anti- kinetoplastide and cytotoxic activities of natural products from *Eugenia jambolana* Lam. and *Eugenia uniflora*. **Asian pacific journal of tropical biomedicine**, v. 7, p. 836, 2017.

SOBRAL, M. et al. **Myrtaceae. In: Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2015. Disponível em <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>. Acesso em 27 de agos. 2017.

SOLIMAN, F. M. et al. Comparative study of the volatile oil content and antimicrobial activity of *Psidium guajava* L. and *Psidium cattleianum* Sabine leaves. **Bulletin of Faculty of Pharmacy Cairo University**, v. 54, p. 219-225, 2016.

SOUZA DE OLIVEIRA, L. G. et al. Chemical variability of essential oils of *Copaifera langsdorffii* Desf. in different phenological phases on a savannah in the Northeast, Ceará, Brazil. **Industrial Crops and Products**, v. 97, p.455-464, 2017.

SOUZA, O. E. et al. Effect of collection time on essential oil composition of *Lantana câmara* Linn (Verbenaceae) growing in Brazil Northeastern. **Records of natural products**, v.4, n.1, p. 31-37, 2010.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 640p. 2005.

STAGGEMEIER, V.G. et al. Phylogenetic analysis in *Myrcia* section *Aulomyrcia* and inferences on plant diversity in the Atlantic rainforest. **Annals of Botany**, v.115, p.747–61, 2015.

SUWANMANEE, S.; KITISIN, T.; LUPLERTLOP, N. *In vitro* screening of 10 edible thai plants for potential antifungal properties.**Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, 2014.

SUWANMANEE, S. et al. *In vitro* screening of 10 edible thai plants for potential antifungal properties. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, 2014.

- TAVARES, E.S. et al. Análise do óleo essencial de folhas de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. (Verbenaceae) cultivados em condições semelhantes. **Revista brasileira de farmacognosia**, v.15, p.1-5, 2005.
- TENORIO, A.I.S. et al. Chemical composition of leaf essential oils of *Calyptanthus microphylla* B. Holts & M.L., *Myrcia aff fosteri* Croat and *Eugenia octopleura* Krug & Urb from Panama. **Journal of Essential Oil Research**, 23, p. 29-33, 2011.
- TOLEDO, V.; ALARCÓN-CHÁIRES P. La etnoecología hoy: panorama, avances, desafíos. **Etnoecologica**, v.9, p.1–16, 2012.
- TROVÃO, D. M. de B. M., FERNANDES, P. D., ANDRADE, L. A. de, DANTAS NETO, J. Variações sazonais de aspectos fisiológicos de espécies da Caatinga. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, 11(3), 307–311, 2007.
- TULER, A. C. et al. SSR markers: a tool for species identification in *Psidium* (Myrtaceae). **Molecular Biology Reports**, v.42, p.01-13, 2015.
- TYAGI, A. K. et al. *Eucalyptus Essential Oil* as a Natural Food Preservative: *In Vivo* and *In Vitro* Antiyeast Potential. **BioMed Research International**, v.2014, p.9, 2014.
- VALLAT, A.; GU, H.; DORN, S. How rainfall, relative humidity and temperature influence volatile emissions from apple trees in situ. **Phytochemistry**, v.66, p.1540–1550, 2005.
- VEIGA-JÚNIOR, V.F. et al. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v.28, n.3, p.519-528, 2005.
- VIEIRA, A. J. H.; SANTOS, J. I. Mechanisms of resistance of *Candida albicans* to the antifungals fluconazole, amphotericin B and caspofungin. **Brazilian Journal of clinical Analyses**, v.49, p. 2, 2016.
- VIEIRA, R. F. et al. **Frutas Nativas da Região Centro-Oeste do Brasil**. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia Brasília, DF.v.1, p.320, 2006.
- WCSP. 2017. **World Checklist of Selected Plant Families**, apps.kew.org/wcsp/. Acesso em julho, 2017.
- WEN, L. et al. Actividad antifúngica de cuatro plantas usadas em la medicina tradicional peruana. Aislamiento de 3'-Formil – 2',4',6' – trihidroxidihidrochalcona, principio activo de *Psidium acutangulum*. **Revista da Sociedade Química del Perú**, v. 77, p. 199-204, 2011.
- WILSON, P.G. Myrtaceae. In 'The families and genera of vascular plants. Vol. X. Flowering plants Eudicots: Sapindales, Cucurbitales, Myrtaceae'. (Eds.) Kubitzki, K., Springer-Verlag. 2011.
- YAO, X.H. et al. Different harvest seasons modify bioactive compounds and antioxidant activities of *Pyrola incarnata*. **Industrial Crops and Products**, v.94, p.405–412, 2016.

CAPÍTULO 1

Este capítulo “Variações químicas de duas espécies de *Psidium* (Myrtaceae) em diferentes períodos fenológicos, em área de Cerrado no Nordeste do Brasil dispõe os resultados sobre a influência dos efeitos sazonais sobre a composição química de *Psidium salutare* e *Psidium myrtoides*, em diferentes fases fenológicas e em períodos sazonais distintos, com informações úteis para ampliar o conhecimento sobre estas espécies e estabelecer o período de coleta mais adequado para obter os maiores rendimentos e concentrações de compostos químicos

O capítulo a seguir representa o manuscrito a ser submetido segundo as normas estruturais e bibliográficas do periódico *Environmental and Experimental Botany*.

Variações químicas de duas espécies de *Psidium* (Myrtaceae) em diferentes períodos fenológicos, em área de Cerrado no Nordeste do Brasil.

Delmacia Gonçalves de Macêdo^a, Marta Maria de Almeida Souza^a, Maria de Oliveira Santos^a, Daiany Alves Ribeiro^a, Bianca Vilar de Almeida^a, Irwin Rose Alencar de Menezes^b

^a Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Regional do Cariri, Crato, Ceará – Brasil;

^b Departamento de Química Biológica, Universidade Regional do Cariri, Crato, Ceará – Brasil

*Autora Correspondente. Tel.: (55) 88 99929744.

E-mail:delmaciamacedo@yahoo.com.br

Resumo

Entre os fatores que podem influenciar a quantidade e a proporção relativa de metabólitos secundários nas plantas, estão os eventos fenológicos e os períodos sazonais. Desta forma, este estudo teve como objetivo avaliar a variabilidade química dos óleos essenciais de *Psidium salutare* e *Psidium myrtoides*, em diferentes fases fenológicas e em períodos sazonais distintos. As fenofases vegetativa (queda foliar e brotamento) e reprodutiva (floração e frutificação) foram observadas como presente ou ausente durante dois anos (2016 e 2017). Os óleos essenciais das folhas, foram extraídos pelo processo de hidrodestilação em aparelho tipo Clevenger adaptado. As caracterizações químicas dos componentes dos óleos essenciais foram realizadas por CG/EM. As fases de floração e frutificação para as duas espécies ocorreram no período chuvoso, com duração de quatro meses (fevereiro a maio), já a queda foliar foi observada no período seco. Os óleos essenciais durante os dois anos de estudo, apresentaram rendimentos variando de 0,15 a 0,75% para *P. salutare* e de 0,35 a 1,17% para *P. myrtoides*, com maiores valores no período reprodutivo associada a estação chuvosa. A presença de monoterpenos foi bastante pronunciada em relação aos sesquiterpenos, em ambas as espécies e em todo período de estudo. Foram identificados 33 constituintes em *P. myrtoides* e 40 para *P. salutare*. Os principais constituintes para *P. myrtoides* foram 1,8-cineol (29,5-46,6%), α -eudesmol (10,3-21,2%), γ -eudesmol (2,49-10,2%) e α -pineno (5,01- 12,8%), e para *P. salutare*, γ -terpineno (10,3- 24,0%), terpinoleno (16,9-18,2%), p-cimeno (5,05- 24,2%) e τ -cadinol (5,72-14,1%), os quais apresentaram alterações na composição química destes compostos durante todo período das análises. Assim, plantas amostradas em diferentes períodos fenológicos ou

sazonais podem ter composições diferentes e, conseqüentemente, conter ou não constituintes bioativos específicos. Essas informações são úteis para ampliar o conhecimento sobre estas espécies e colaboram para estabelecer o período de coleta mais adequado para obter os maiores rendimentos e concentrações de compostos químicos.

Palavras-chave: óleo essencial; variação química; fenologia; períodos sazonais.

1. Introdução

O cerrado é fonte de diversos produtos naturais e, dentre eles os óleos essenciais, compostos metabólitos secundários produzidos por diversas plantas que se destacam por suas aplicações seja no uso popular para medicina, culinária entre outros (NOVAES et al., 2013) e, ou pela alta demanda industrial de matéria-prima (GUIMARÃES et al., 2008). Estudos mostraram que a composição química das espécies do cerrado estão diretamente relacionados à sazonalidade (DE SÁ et al., 2016; GATTI et al., 2014; MALHEIROS, 2016). O ambiente em que a planta se encontra pode redirecionar a rota metabólica, ocasionando a biossíntese de diferentes compostos (MORAIS, 2009).

Assim, presume-se que a síntese dos metabólitos secundários podem ser influenciados por diversos fatores, tais como genéticos, climáticos e/ou edáficos (GOBBO-NETO; LOPES, 2007). Dentre estes a temperatura, os níveis de precipitação e o seu ciclo fenológico podem promover uma variação da composição química de uma determinada planta medicinal (CARVALHO et al., 2014; CRUZ et al., 2014; ESTELL et al., 2016). A tendência no aumento do rendimento dos óleos essenciais é mais suscetível ao ciclo vegetativo que as variações climáticas observadas (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

A fenologia trata da ocorrência de eventos biológicos repetitivos, suas causas em relação a fatores bióticos e abióticos e as inter-relações entre as fases caracterizadas por esses eventos, da mesma ou de diferentes espécies (Morellato, 2003). Ao longo das fases de desenvolvimento fenológico, as plantas tendem a aperfeiçoar suas defesas para a proteção de partes vegetais tendo que distribuir ou realocar seus compostos entre os tecidos (CARVALHO et al., 2014). Isso ocorre em virtude das necessidades de adaptação conforme a etapa de desenvolvimento da planta (OLIVEIRA et al., 2005).

Desta forma, estudos têm reconhecido a importância da variabilidade química de espécies vegetais a fim de comparar estas variações nos componentes químicos ativos em diferentes períodos (FIGUEIREDO et al., 2009; YAO et al., 2016). Portanto a determinação da melhor época de coleta é importante para a obtenção de um maior rendimento de óleo essencial e do princípio ativo desejado (CHEN et al., 2010).

Espécies da família Myrtaceae são reconhecidas por apresentar características importantes como a produção de óleos essenciais. Dentre estas, destaca-se o gênero *Psidium*, ocorrente em diferentes regiões do norte, nordeste e sudeste. Neste contexto, temos as espécies *Psidium myrtoides* O. Berg e *Psidium salutare* (Kunth) O. Berg, frequentemente encontradas em áreas de cerrado na Chapada do Araripe, sul do estado do Ceará (MACÊDO et al., 2016; RIBEIRO-SILVA et al., 2012), onde se destacam por seu valor medicinal e como alimento.

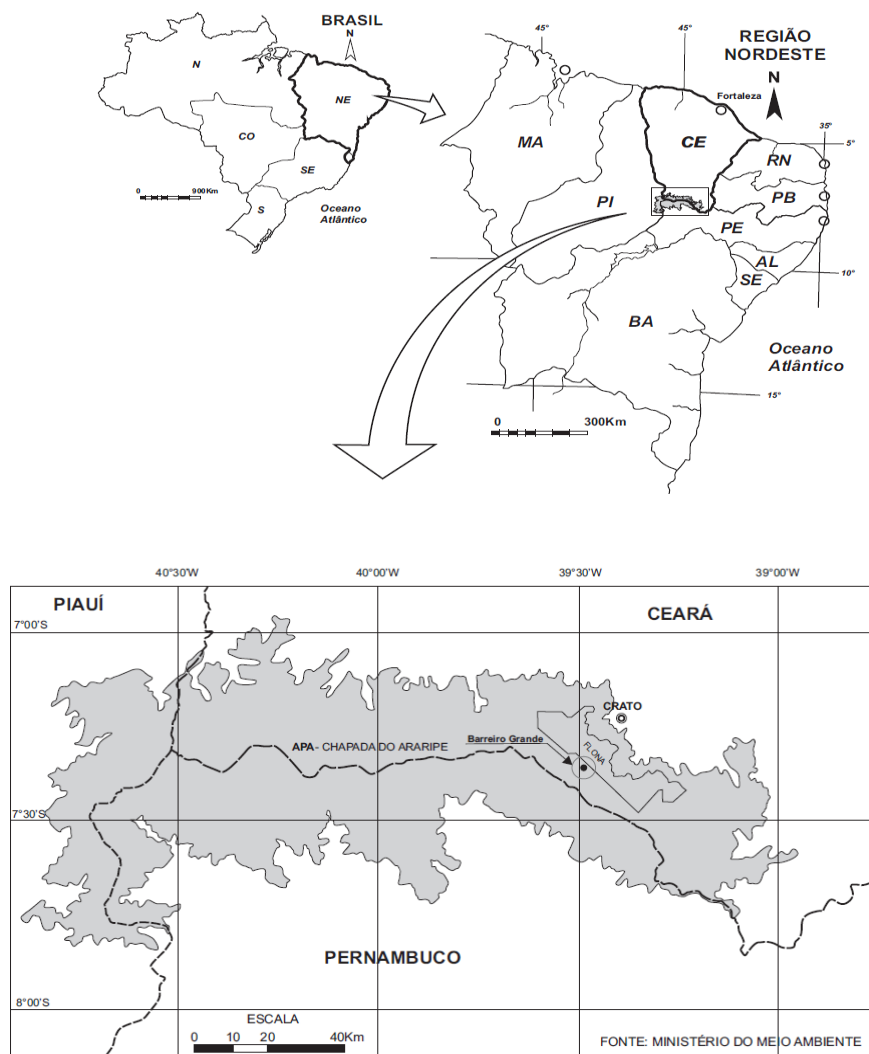
Poucas são as informações sobre os metabólitos secundários destas espécies, por esta razão acredita-se que determinar a época de colheita em função da produção de princípios ativos é uma ferramenta para possíveis aplicações industriais, alimentícias, cosméticas, agrícolas, dentre tantas outras. Diante do exposto, este estudo pretende contribuir com informações sobre o perfil químico do óleo essencial de *P. salutare* e *P. myrtoides*, avaliando as variações químicas durante os períodos fenológicos em função da sazonalidade.

2. Material e Métodos

2.1 Área de estudo

O estudo foi realizado na Floresta Nacional do Araripe (FLONA), município do Crato, Nordeste do Brasil (Figura 1.). A área de amostragem é conhecida como Barreiro Grande (latitude: 7°21'41,7''S e longitude 39°28'42,4''W), localizada em uma área de cerrado. com predominância de solos Latossolos Vermelho-Distróficos, clima Tropical quente úmido e Tropical semiárido com temperatura média anual entre 24 e 26 °C (COSTA; ARAÚJO; LIMA-VERDE, 2004).

A Chapada do Araripe apresenta relevo tabular e altitudes que variam de 800 m a 1000 m, com clima tropical quente. Caracterizada por duas estações bem definidas: uma chuvosa (dezembro a maio) e outra seca (junho a novembro), com média pluviométrica de 1.100 mm anuais e temperatura média que varia de 32 °C (máxima) a 22 °C (mínima). A cobertura vegetal é composta de caatinga arbustiva densa, carrasco, cerrado, cerrado e mata úmida (DA SILVA et al., 2013; COSTA; ARAÚJO; LIMA-VERDE, 2004). Esta área é caracterizada por atividades de extrativismo sustentável e a coleta de lenha seca para uso doméstico por famílias de baixa renda.



Fonte: Macêdo et al. (2016)

Figura 1. Localização geográfica da área de estudo no município de Crato, Ceará, Brasil.

2.2 Fenologia

Os dados fenológicos foram obtidos mensalmente, durante os anos de 2016 e 2017. As fenofases foram classificadas segundo a metodologia de Morellato et al., (1989) e Locatelli e Machado (2004), considerando-se como período de floração aquele em que os indivíduos apresentarem flores em antese; o período de frutificação, quando apresentaram frutos verdes e/ou maduros; como brotamento, quando surgiram folhas novas até $\frac{3}{4}$ do tamanho das folhas adultas e queda de folhas, quando as mesmas mudaram de cor e tornaram-se senescentes.

2.3 Dados climáticos

Os dados relacionados a temperatura e índice pluviométrico dos anos de 2016 e 2017, foram obtidos a partir dos registros da Fundação Cearense de Meteorologia e Recursos Hídricos (FUNCEME) sendo utilizadas as informações referentes ao posto Lameiro em Crato-Ceará. Os

dados foram usados para fins de comparação com as variações quantitativas e qualitativas observadas para os óleos essenciais das espécies de *Psidium*.

2.4 Material vegetal

Durante o período reprodutivo, cinco amostras férteis de *Psidium salutare* e *Psidium myrtoides* foram coletadas a partir de fevereiro de 2016. O material coletado foi preparado e tratado de acordo com as técnicas usuais de herborização (MORI et al., 1985). Em seguida as exsiccatas foram produzidas e posteriormente identificadas pelo Dr. Marcos Sobral (especialista na família Myrtaceae) e depositada no Herbário Caririense Dárdano de Andrade-Lima da Universidade Regional do Cariri – URCA sob os números 12600 (*P. myrtoides*) e 12601 (*P. salutare*) HCDAL, sob a autorização do Sistema de Autorização e Informação da Biodiversidade (SISBIO) (n°50362-2).

2.5 Obtenção e análise dos óleos essenciais

Foram coletadas 500g de folhas de *P. salutare* (07°21'S e 39° 27' W e 912m de altitude) e 400g de *P. myrtoides* (07°21'S e 39° 28'W e 923m de altitude) em cada coleta, durante os períodos chuvosos (fevereiro e maio) e secos (agosto e novembro) e em diferentes fases fenológicas, dos anos de 2016 e 2017, entre 8h30min e 9h30min da manhã. Os indivíduos selecionados apresentaram características semelhantes em relação ao comprimento, diâmetro e em condições ambientais homogêneas. O material foi coletado com distância mínima de 5 m e máxima de 100 m. Em seguida as folhas foram lavadas, trituradas e submetidas ao processo de hidrodestilação durante 2 h, em aparelhos de tipo Clevenger adaptados. A mistura óleo-água foi coletada, tratada com sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄) e os óleos essenciais foram separados e mantidos sob temperatura de refrigeração inferior a < 4 ° C até serem analisados.

A identificação dos principais componentes dos óleos vegetais foi realizada por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG/EM), utilizando uma série Shimadzu GC-MS QP2010 equipada com uma coluna capilar de sílica fundida Rtx-5MS (30m × 0,25mm ID, 0,25 m) e temperatura programada como segue: 60-240 °C em 3 °C/min, depois a 280 °C a 10 °C /min, terminando com 10 min a 280 °C. O gás transportador estava a uma taxa de fluxo de 1,5 mL/min e o modo de divisão tinha uma proporção de 1:50. A porta de injeção foi ajustada a 220 °C. Parâmetros operacionais de quadripolo significativos de MS: temperatura da interface 240 °C; ionização de impacto de elétrons a 70 eV com faixa de massa de varredura

de 40-350 m/z a uma taxa de amostragem de 1,0 varredura/s. Volume injetado: 1 µl de solução 5 µg / mL em diclorometano.

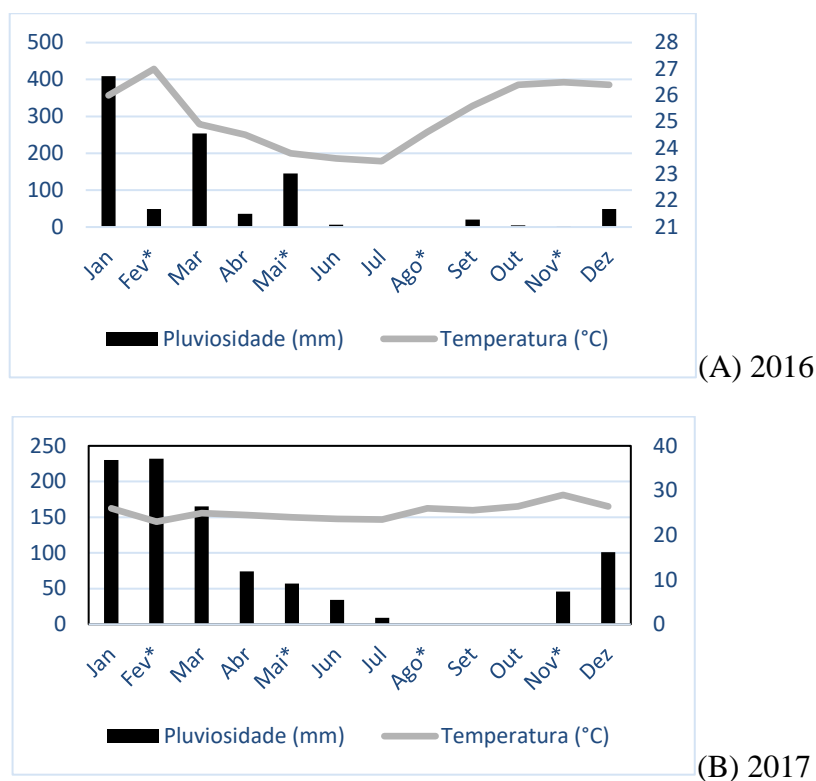
Os constituintes foram identificados por pesquisa de computador usando bibliotecas digitais de dados espectrais de massa (NIST 08) e por comparação de seus autênticos espectrômetros de massa (ADAMS, 2001). A extração e análise do óleo foi realizada no Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais (LPPN) da Universidade Regional do Cariri-URCA.

3. Resultados e Discussão

3.1 Dados meteorológicos

O período chuvoso foi registrado nos meses de janeiro a maio e o seco de julho a novembro para o ano de 2016, já para 2017 o período chuvoso teve início mais cedo, começando em novembro e estendendo-se até junho, sendo este, considerado o ano mais chuvoso em relação ao anterior. Os dados meteorológicos registrados para o ano de 2016 mostraram uma precipitação de 968.0 mm (média de 80,41 mm /mês) com pico máximo nos meses de janeiro (409 mm) e março (254 mm). Para o ano de 2017, a maior precipitação foi para os meses de janeiro (230 mm) e fevereiro (232 mm), com 1008.0 mm anual (Figura 2).

As temperaturas variaram de 23,8 a 26 °C em 2016 com os menores valores em maio e os maiores em novembro. E em 2017 variou de 23 a 29 °C, com os menores índices nos meses de fevereiro e maio (23 °C) e o maior no mês de novembro (29 °C).



* Meses de coleta.

Figura 2. Climatograma dos anos de 2016 (A) e 2017 (B).

3.2 Rendimento do óleo em diferentes fases fenológicas

Ambas as espécies apresentaram fase vegetativa (queda de folhas e brotação) e reprodutiva (floração e frutificação), sendo que os períodos de coleta dos óleos essenciais coincidiram com a fase de brotamento, com exceção apenas do mês de novembro/2017 para *P. myrtooides*. As fases de floração e frutificação ocorreram no período chuvoso (fevereiro e maio, 2016/2017).

A queda foliar foi observada para as duas espécies no período seco, sendo que para *P. salutare* houve uma perda de folhas quase que completa para todos os indivíduos nos meses de novembro de 2016 e outubro e novembro de 2017. De acordo com os autores Klink et al., 2005, Palhares et al., 2010, e Malheiros, 2016, o ciclo vegetativo das plantas do cerrado ocorre sob influência de fenômenos climáticos naturais. No início da estação seca, grande parte das espécies vegetais entram em repouso vegetativo, induzindo ao caducifolismo foliar.

Observa-se que o período reprodutivo de *P. myrtooides* e *P. salutare* tiveram início no período chuvoso estendendo-se até o início do período de estiagem, com duração de quatro meses (fevereiro a maio). *P. salutare* teve sua floração no mês de fevereiro e frutificação em maio, enquanto *P. myrtooides* teve floração e frutificação tanto em fevereiro quanto em maio. O padrão de floração e frutificação anual destas espécies assemelham-se aos resultados descritos

por Landrum, 2017, em uma revisão de 28 espécies de *Psidium* ocorrentes no estado da Bahia, (Brasil). Assim também ocorre para *psidium cattleyanum* e *psidium myrsinoides* ocorrentes em Planaltina, Distrito Federal (FRANZON et al., 2009).

Os resultados mostram variações no rendimento de *P. salutare* (0,15 a 0,75%) e *P. myrtooides* (0,35 a 1,17%) (Tabela 1). O rendimento dos óleos essenciais, durante os dois anos de estudo, apresentou as maiores quantidades no período reprodutivo associada a estação chuvosa, com exceção de *P. myrtooides*- o qual teve também um dos maiores rendimentos na presença de folhas. Nesse período, a temperatura variou de 23 a 26 °C.

Os maiores teores para *P. salutare* ocorreram no período reprodutivo, intensificado no período de floração (0,76-0,75%), fevereiro 2016/2017, decaindo nos meses de agosto e novembro relacionados a queda foliar (0,20%). Segundo Hosni et al., 2011, o aumento observado no teor de óleo essencial durante a floração e sua diminuição no estágio de queda foliar refletem uma regulação do desenvolvimento da biossíntese de óleo essencial.

Para *P. myrtooides* o maior rendimento ocorreu no período de floração e frutificação (1,17%) (fevereiro, 2017) no mês de maior precipitação e na queda foliar (1,02%) (novembro, 2016), com temperatura em torno de 26,5 °C, estação seca.

Os valores mais altos de rendimento para as duas espécies estiveram associados a fase de floração e frutificação com altos níveis de precipitação. A influência da sazonalidade no rendimento evidencia a combinação de fatores entre as estações chuvosa e seca favorecendo o aumento ou redução na produção de metabólitos secundários. De modo geral, a fenologia parece influenciar no rendimento de *P. salutare* com maiores valores de porcentagens na floração e frutificação, no entanto para *P. myrtooides* os maiores rendimentos ocorreram na fase vegetativa, queda foliar e floração e frutificação

Tabela 1. Rendimento dos óleos essenciais de *Psidium salutare* e *Psidium myrtooides* coletadas em diferentes períodos.

Mês/Ano	Precipitação (mm)	Temperatura (°C)	Período Fenológico		Rendimento óleo essencial (%)	
			<i>P. s</i>	<i>P. m</i>	<i>P. s</i>	<i>P. m</i>
Fev 2016	49	26	Floração	Floração/ frutificação	0,73	0,48
Mai 2016	145	23,8	Frutificação	Frutificação	0,29	0,36
Ago 2016	0	24,5	Folha	Folha	0,15	0,96
Nov 2016	2	26,5	Queda foliar	Queda foliar	0,20	1,02
Fev 2017	232	23	Floração	Floração/ frutificação	0,75	1,17
Mai 2017	57	24	Frutificação	Frutificação	0,62	0,68
Ago 2017	0	26	Folhas	Folha	0,39	0,46
Nov 2017	46	29	Queda foliar	Queda foliar/ Brotamento	0,24	0,35

P.s: Psidium salutare; P.m: Psidium myrtooides

Trabalhos dessa natureza realizados com outras espécies ressaltam a importância dos fatores fenológicos no rendimento do óleo essencial. Em *Copaifera langsdorffii* Desf., os maiores rendimentos também coincidiram com a fenofase de frutificação em áreas antrópicas, tendo sido afetado por fatores climáticos ao final da estação chuvosa (SOUZA DE OLIVEIRA et al., 2017). Os óleos essenciais de *Artemisia molinieri* (MASOTTI et al., 2003) e *Origanum vulgare* (BÉJAOUÏ et al., 2013), também foram afetados por seus estágios fenológicos, levando a variações quantitativas de compostos químicos durante as fases vegetativa e de florescimento.

Além das fases fenológicas, outros trabalhos também relatam a influência dos fatores climáticos na síntese de compostos químicos. Em uma correlação entre o rendimento do óleo de *Lippia origanoides* Kunth., com a radiação solar, temperatura e umidade relativa na área da coleta, o rendimento do óleo foi diretamente proporcional ao aumento da radiação solar e da temperatura e inversamente proporcional à taxa de umidade relativa do ar (SARRAZIN et al., 2015). De acordo com o mesmo autor, temperaturas elevadas podem promover mudanças na atividade dos estômatos das folhas, reduzindo assim a volatilização desses óleos. Nas espécies *Mentha x piperita* L., *M. spicata* L., e *M. arvensis* L. o maior nível de precipitação pode ter contribuído para o desenvolvimento vegetativo superior destas espécies e conseqüentemente o maior rendimento dos óleos essenciais (DESCHAMPS et al., 2008).

3.3 Composição química em diferentes fases fenológicas

Os resultados mostraram a identificação de 33 (95,5%) constituintes químicos para *P. myrtoides* e 40 (88,2%) para *P. salutare* (tabela 2 e 3). Entre os compostos identificados, 18 constituintes foram comuns às duas espécies, 15 compostos foram únicos de *P. myrtoides* e 23 de *P. salutare*. A composição química de *P. myrtoides* variou de 12 a 33 compostos, sendo o maior número de composto no mês de fevereiro (95,5%) (2016), quando a espécie apresentava flor e frutos, e novembro o menor (87,7%) (2017) na queda foliar e início do brotamento. Para *P. salutare*, também houve variação do número de compostos de 13 a 40, onde fevereiro (88,2%) (2016) apresentou o maior número, quando a espécie estava em pleno florescimento, e menor em novembro (95,6%) (2017) correspondendo ao período de perda foliar.

P. myrtoides na fenofase de queda foliar apresentou maiores níveis de monoterpênicos oxigenados (40-70,5%) durante a estação seca compondo 70,5% da amostra (novembro/2016), com destaque para 1,8-cineol (43,1%) e α -pineno (12,8%), seguido por monoterpênicos hidrocarbonados (3,61-6,52%) com temperaturas em torno de 26 a 29 °C. Na estação chuvosa, durante o desenvolvimento da floração e frutificação, os sesquiterpênicos oxigenados (α -

eudesmol, elemol e γ -eudesmol) mostraram maiores quantidades durante os meses de fevereiro e maio (35-39%) seguida de uma produção mínima de sesquiterpenos hidrocarbonados (1,47-7,35%).

Já para *P.salutare* os monoterpenos oxigenados tiveram as maiores quantidades nos estágios vegetativos e de queda foliar, representando 33% da amostra (novembro de 2017), seguida de sesquiterpenos oxigenados (5,11-16,9%) nos meses mais secos, com temperaturas entre 23 a 26°C. Nesta espécie os monoterpenos hidrocarbonados (p-cimeno e γ -terpineno) perfizeram a maioria das amostras (31,3-45,4%) tanto nas fases reprodutivas como vegetativa, durante os dois anos de estudo, seguido por sesquiterpenos hidrocarbonados (τ -cadinol e copaeno) variando de 12,3-34,3%.

Outros estudo realizados na Chapada do Araripe para *Copaifera langsdorffi* uma predominância de sesquiterpenos com variação significativa dos compostos majoritários, β -cariofileno, nos diferentes meses aumento de 72,2% durante a fenofase de floração (SOUZA DE OLIVEIRA et al., 2017). De acordo com esses dados, o aumento de sesquiterpenos parece estar condicionada ao período de floração, visto que os maiores teores desta classe também ocorreram durante a floração em *P. myrtoides*.

Em outros estudos, os óleos essenciais de espécies deste gênero são caracterizados pela predominância de sesquiterpenos oxigenados seguido de monoterpenos (DA SILVA DE SOUZA et al., 2017; SOLIMAN et al., 2016). Esta diferença na predominância destes compostos pode estar relacionada ao fator temperatura. De acordo Duhl et al., (2008) em uma revisão, 20% das emissões de sesquiterpenos são afetadas por temperatura e 80% por temperatura e luz em conjunto. Com base nesta observação, múltiplos fatores ambientais podem alterar o metabolismo especializado em plantas, resultando na produção de diferentes terpenos.

Na literatura não foram encontrados estudos que relacionem a composição química de espécies de *Psidium* em função dos eventos fenológicos, somente quando relacionado a fatores sazonais. Em estudo sobre a influência da sazonalidade na variabilidade química dos óleos de *Psidium guajava*, maiores teores de monoterpenos oxigenados foram encontrados na primavera e verão, enquanto que monoterpenos hidrogenados não exibiram variação significativa entre as estações do ano, para a classe de sesquiterpenos, uma variação considerável foi detectada na primavera com uma redução de hidrogenado e um aumento de variantes oxigenadas (MENDES et al., 2018). Quando analisado por GC/MS o óleo foliar de *Psidium myrsinites*, a predominância de componentes principais foi de sesquiterpenos (óxido de cariofileno, β -cariofileno, β -guaiano, α -humuleno e viridiflorol) seguido de monoterpenos (mirceno), onde os maiores percentuais de compostos químicos identificados ocorreram nos meses secos sendo

indicado o período mais adequado para a extração de óleos essenciais desta espécie (CASTELO et al., 2012).

Dos 33 compostos encontrados para *P. myrtoides*, sete compostos ocorreram em todas as coletas, 1,8-cineol (29,8-46,6%), α -eudesmol (10,3-21,1%), α -pineno (5-12,8%), β -pineno (4,15-7,31%), γ -eudesmol (2,49-10,2%), α -terpineol (1,12-4,11%) e limoneno (0,88- 1,84%), e 11 estiveram presentes apenas em dois a três meses, a exemplo; viridifloreno, β -cariofileno, γ -muruleno. Em *P. salutare* dos 40 compostos, 10 estiveram presentes durante todas análises, isocariofileno (1,13-5,63%), linalol (1,88-7,26%), copaeno (1,66-5,15%), ocimeno (0,63- 5,44%), p-cimeno (3,91- 20,75%), terpineol (0,12- 2,78%), terpinoleno (6,90-25,4%), γ -muruleno (0,87-4,62%), γ -terpineno (8,85-24%), e τ -cadinol (4,61-14%), e 18 estavam presentes em dois a três meses, entre estes temos; cubenol, mirtenol e cubebeno

Em outros estudos com espécies deste gênero, alguns compostos citados anteriormente também foram relatados em *P. myrsinites* como componentes principais como óxido de cariofileno, β -guaiane, viridiflorol e mirceno apresentaram variação nos componentes principais entre os períodos analisados (CASTELO et al., 2012). Na análise do óleo foliar de *P. guajava* L., os monoterpenos (1,8-cineol e limoneno) e os sesquiterpenos (trans-cariofileno e óxido de cariofileno) também foram detectados na amostra durante as estações chuvosa e seca (SILVA et al., 2018).

As diferenças observadas na composição química destas espécies podem estar relacionadas a síntese de produção de óleo essencial que sofre variações de acordo com a constituição genética da planta, bem como em resposta a fatores ambientais (KHADHRI et al., 2014). Quanto mais longa a via, maior o número de genes, e maior a interação entre eles e o ambiente, influenciando na composição do óleo (DA SILVA DE SOUZA et al., 2017).

Os óleos voláteis das duas espécies em estudo, permitiram a identificação de quatro compostos majoritários para cada espécie (área relativa > 10%) (tabela 2 e 3), sendo para *Psidium myrtoides*, o 1,8-cineol (29,5-46,6%), α -eudesmol (10,3-21,2%), γ -eudesmol (2,49-10,2%) e α -pineno (5,01- 12,8%) e para *Psidium salutare*, γ -terpineno (10,3- 24,0%), terpinoleno (16,9-18,2%), p-cimeno (5,05- 24,2%) e τ -cadinol (5,72- 14,1%).

O 1,8-cineol foi o composto majoritário em todo período analisado, com um aumento de 46,6% durante a fase de floração e frutificação (maio/2017) e na queda foliar (43%). Este composto também foi detectado em alta porcentagem no óleo foliar de *Psidium guajava* L. (32,14%) (SOLIMAN et al., 2016) e *Psidium cattleianum* Sabine (16,4%) (MARQUES et al., 2008). Segundo Padovan et al., (2014) existe um padrão quimiotípico de terpenos foliares nas espécies de *Psidium*, em que os monoterpenos α -pineno e 1,8-cineol são os mais comuns e abundantes na maioria das espécies, podendo se tratar de um potencial marcador químico para

o gênero *Psidium*. Trata-se de um óxido monoterpênico também conhecido como eucaliptol, conhecido por apresentar atividade antiparasitária contra *Leishmania* (MACHADO et al., 2014), e como analgésico e anti-inflamatório (TAKAISHI et al., 2012).

O maior conteúdo dos compostos α -eudesmol e γ -eudesmol esteve presente na fase de floração e frutificação (fevereiro e maio/2016 e 2017) nos meses chuvosos. Estes compostos também foram marjoritários nos frutos e nas folhas de *Myrciaria cauliflora* Mart. (34,4-39,7% fruto; óleo de folha, 8-12%) e apresentam importante papel na defesa das plantas, incluindo resistência ao ataque de formigas, patógenos sazonais e insetos, bem como mostram atividade antifúngica (DUARTE et al., 2012).

O α -pineno teve maior incidência nos meses secos (12,8%) (agosto e novembro) coincidindo com a queda foliar e brotamento. É um monoterpeneo bicíclico e hidrofóbico, provavelmente o mais antigo terpeno foliar em Myrtaceae, amplamente difundido no reino vegetal, presente em elevadas concentrações nos óleos essenciais de muitas espécies de *Psidium* (DE MEDEIROS et al., 2015; KHADHRI et al., 2014; PADOVAN et al., 2014).

Tabela 2. Porcentagem dos constituintes químicos dos óleos voláteis de folhas de *Psidium myrtoides* por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (CG/EM) nos anos de 2016 e 2017.

Compostos	TR* (min)	2016				2017			
		Fev	Mai	Ago	Nov	Fev	Mai	Ago	Nov
1,8-cineol	5,5	30,1	29,8	29,5	43,1	30,3	46,6	31,3	43,8
10-12- Pentacosadinóico	14,7	0,90	0,27	-	-	-	-	-	-
acetato de mirtenilo	10,0	0,13	0,07	-	-	-	-	-	-
Copaeno	11,2	0,22	0,14	0,16	-	-	-	-	-
Elemol	13,7	6,00	6,72	4,09	3,32	4,02	2,56	-	2,30
espatulenol	14,1	2,94	3,27	2,47	1,97	-	1,66	-	-
germacreno D	12,1	0,17	0,23	0,18	-	2,19	0,88	0,77	-
Limoneno	5,4	1,34	1,24	1,68	1,84	1,35	1,36	1,70	0,88
linalol	6,6	0,46	0,25	0,24	-	0,47	0,53	-	-
mirtenal	8,4	0,38	0,19	0,37	0,36	0,22	0,11	-	-
óxido de cariofileno	14,3	2,50	2,74	1,93	1,43	0,63	0,44	0,60	-
p-cimeno	5,3	0,41	0,15	0,16	0,57	0,28	-	-	0,52
Pinocarveol	7,4	0,42	0,19	0,32	0,48	-	-	-	-
Pinocarvone	7,8	0,14	-	0,15	-	-	-	-	-
Terpineol	8,0	1,61	0,53	1,12	0,70	0,91	0,92	0,51	-
Viridifloreno	15,3	0,89	1,02	-	-	-	-	-	-

Compostos	TR* (min)	2016				2017			
		Fev	Mai	Ago	Nov	Fev	Mai	Ago	Nov
Viridiflorol	14,6	0,64	0,67	-	-	0,72	1,27	-	-
α -amorfenol	12,9	0,15	0,36	0,19	0,46	-	0,74	0,49	1,19
α -calacoreno	13,6	0,10	0,14	-	-	-	-	-	-
α -eudesmol	15,5	18,2	20,0	13,0	10,7	17,3	10,6	21,2	10,3
α -muroleno	13,1	0,24	0,90	-	-	-	-	-	-
α -pineno	3,8	8,14	5,01	6,08	12,8	9,23	6,84	10,5	9,77
α -terpineol	8,3	2,95	3,15	1,12	3,29	4,11	2,96	3,51	2,34
β -bourboneno	11,3	0,33	-	0,16	-	-	-	-	-
β -cariofileno	11,9	0,43	0,25	-	-	-	-	-	-
β -cubebeno	12,0	0,60	1,12	0,67	-	0,80	0,92	0,64	0,57
β -mirceno	4,6	0,22	0,15	0,18	-	0,78	0,32	-	-
β -pineno	4,5	5,75	4,15	4,73	4,60	7,14	7,31	6,15	7,14
γ -cadineno	11,2	0,11	0,22	0,88	-	2,36	1,20	0,92	0,90
γ -eudesmol	15,1	4,60	5,82	2,94	2,49	7,05	8,60	10,2	10,1
γ -muuroloeno	13,1	0,23	0,26	-	-	-	-	-	-
δ -cadineno	13,2	1,20	0,22	-	-	-	-	-	-
δ -cadinol	15,2	2,93	2,65	1,08	-	1,09	1,63	1,34	-
Monoterpenos hidrocarbonados		5,48	4,88	3,61	6,18	6,52	4,64	5,21	3,74
Sesquiterpeno hidrocarbonados		7,35	7,01	3,13	-	6,44	4,63	3,67	1,47

Compostos	TR* (min)	2016				2017			
		Fev	Mai	Ago	Nov	Fev	Mai	Ago	Nov
Monoterpenos oxigenados		46,4	40,0	42,0	70,5	48,2	62,3	48,4	60,7
Sesquiterpenos oxigenados		35,1	39,0	24,4	21,0	29,7	25,1	32	22,7
Outros		1,28	0,84	0,19	0,46	-	0,74	0,49	1,19
Total		95,5	91,5	73,4	98,1	90,9	97,5	89,8	87,7

*TR = Tempo de Retenção do OEFPM: óleo essencial das folhas de *Psidium myrtoides* 1^a coleta (fevereiro), 2^a coleta (maio), 3^a coleta (agosto) e 4^a coleta (novembro).

Tabela 3. Porcentagem dos compostos químicos dos óleos essenciais das folhas de *Psidium salutare* por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (CG/EM) nos anos de 2016 e 2017.

Compostos	TR* (min)	2016 ^a				2017			
		Fev	Mai	Ago	Nov	Fev	Mai	Ago	Nov
1,8 cineol	5,5	0,61	0,51	1,05	1,47	1,41	0,71	0,57	-
copaeno	11,2	3,22	3,53	1,91	5,15	3,93	1,66	4,74	3,54
acetato de dimetil benzilcarbinila	8,2	0,19	0,15	0,65	-	-	-	-	-
cubenol	14,8	0,63	-	3,42	-	-	0,76	-	0,86
espatulenol	12,2	0,23	0,30	0,13	-	-	-	-	-
sabineno	8,1	2,28	3,48	3,94	-	2,15	3,74	3,90	3,15
isocarofileno	11,9	3,78	3,75	1,20	2,64	5,63	1,86	1,13	4,25
limoneno	5,4	1,10	1,15	1,14	0,79	1,36	1,59	1,35	-
linalol	6,6	5,55	4,72	7,26	3,29	4,87	7,64	1,88	4,45
mirceno	4,7	0,65	0,42	0,08	-	1,03	0,58	-	-
mirtenol	7,5	0,21	0,16	0,09	-	-	-	-	-
ocimeno	5,7	2,15	1,93	1,50	0,63	3,90	2,15	1,94	5,44
palustrol	14,1	0,05	0,11	0,10	-	-	-	-	-
patchoulane	14,7	0,25	0,19	3,08	-	-	-	-	-
p-cimene	5,3	5,05	6,37	17,8	24,2	3,91	10,8	20,7	15,4
selina-3,7 (11) -diene	13,6	0,37	0,28	-	-	-	-	-	-
seychelleno	13,9	0,20	0,17	0,40	-	-	-	-	-
terpineol	8,3	1,67	0,90	0,12	0,67	1,68	2,22	1,55	2,78
terpinoleno	6,4	16,9	14,4	6,90	11,4	18,9	18,2	8,15	25,4
valenceno	13,3	0,23	0,09	0,30	-	-	-	-	-

Compostos	TR*	2016 ^a				2017			
		(min)	Fev	Mai	Ago	Nov	Fev	Mai	Ago
viridifloreno	16,4	0,12	-	0,35	-	-	-	-	-
viridiflorol	14,7	0,53	0,95	2,07	-	2,47	1,20	1,22	-
α -felandrene	5,0	0,15	0,08	0,15	-	0,24	0,49	-	-
α -cariofileno	12,4	0,24	0,29	1,68	-	-	-	-	-
α -cubebeno	15,0	0,90	2,05	-	-	-	-	-	-
α -farneseno	13,8	0,03	0,03	0,24	-	-	-	-	-
α -gurjuneno	11,7	0,21	0,10	0,08	2,12	0,61	-	0,54	-
α -muuroleno	12,6	0,63	0,72	0,69	-	-	-	-	-
α -pineno	5,1	0,83	0,55	0,62	0,45	0,61	-	0,56	-
β -cadinene	5,9	0,96	1,45	0,83	-	-	-	-	-
β -elemeno	13,7	0,16	0,12	0,70	1,91	0,16	-	0,98	-
β -eudesmene	12,8	0,15	0,11	-	-	-	-	-	-
β -guaianum	15,5	2,79	3,12	-	1,45	-	1,90	-	0,97
γ -gurjunene	13,6	0,10	0,21	0,26	-	-	-	-	-
γ -muuroleno	13,2	2,58	2,42	3,20	4,62	2,28	0,87	4,05	3,18
γ -terpineno	5,9	13,9	17,0	10,3	8,85	19,4	24,0	19,8	20,4
δ -cadineno	13,3	5,27	3,88	3,84	5,14	1,20	2,04	1,79	-
δ -cadinol	15,3	1,68	-	0,92	-	-	-	-	-

Compostos	TR* (min)	2016 ^a				2017			
		Fev	Mai	Ago	Nov	Fev	Mai	Ago	Nov
δ-guaiene	14,9	0,28	0,28	3,70	-	-	-	-	-
τ-cadinol	15,2	12,7	10,5	10,3	14,01	4,61	6,81	10,57	5,72
Monoterpenos hidrocarbonados		40,0	41,5	37,8	35,2	31,3	41,4	45,4	44,1
Sesquiterpenos hidrocarbonados		21,6	22,1	18,9	34,3	12,3	13,2	22,6	13,4
Monoterpenos oxigenados		11,1	11,0	15,1	16,6	28,0	30,2	15,0	33,0
Sesquiterpenos oxigenados		15,8	11,87	16,99	2,64	8,1	3,79	2,35	5,11
Total		89,7	86,6	91,00	88,7	79,9	89,0	85,3	95,6

*TR = Tempo de Retenção do OEFPM: óleo essencial das folhas de *Psidium salutare* 1^a coleta (fevereiro), 2^a coleta (maio), 3^a coleta (agosto) e 4^a coleta (novembro) a= dados publicados por Macedo et al., (2018)

Na ecologia, o α -pineno apresenta alta toxicidade frente aos insetos predadores, tais como formigas e besouros (SIMÕES et al., 2001) e apresenta ainda atividade antifúngica e função anti-séptica (STOW e BEATTIE, 2008).

O γ -terpineno foi o composto mais elevado na amostra (24,0%) com a maior concentração observada no período de frutificação (maio/2017) na estação chuvosa, sendo que sua quantidade se manteve constante independente da fase fenológica e período sazonal. Este composto é um monoterpene presente em espécies de plantas farmacologicamente ativas, por exemplo, em óleos essenciais de *Origanum onites* L. (ECONOMOU et al., 2011) e *Carum copticum* (SNOUSSI et al., 2018).

Observa-se que o composto terpinoleno apresentou os maiores percentuais no período chuvoso (18,9 %) (fevereiro/ 2017) quando coletado nas fenofases de floração e frutificação e no final da estação seca (25,4 %) (novembro de 2017) na fase de queda foliar. O terpinoleno trata-se de um monoterpene e é encontrado em uma variedade de plantas. Diversas atividades biológicas foram atribuídas a este composto, como atividade antioxidante (AYDIN, TÜRKEZ, TAŞDEMİR, 2013), larvicida (CONTI et al., 2012) e anticâncer (HARADA et al., 2012).

Vale ressaltar que, os compostos p-cimeno (24,2%) e τ -cadinol (14,1%) também apresentaram quantidades elevadas, com valores mais altos ao final da estação seca (período de queda foliar) nos meses de agosto e novembro de 2017. O p-cimeno é o precursor do carvacrol e é um monoterpene com um anel de benzeno sem quaisquer grupos funcionais nas suas cadeias laterais. Apresenta atividade biológica quando usado isoladamente (BAGAMBOULA; UYTTENDAELE; DEBEVERE, 2004). Já o τ -cadinol pertence a uma classe de hidrocarbonetos orgânicos voláteis, especificamente sesquiterpenos. Sua ocorrência foi registrada como um dos majorantes, em espécies de *Senna occidentalis* (L.) Link (ESSIEN et al., 2018), *Psidium guajava* (WANG et al., 2017) e *Eugenia brasiliensis* Lam (SIEBERT et al., 2015). Semelhante a este estudo, em *Copaifera langsdorffii* Desf., o cadinol apresentou maior tendência durante a estação seca, os sesquiterpenos não oxigenados diminuíram na colheita tardia durante a estação das chuvas; no entanto, observou-se uma tendência inversa durante a estação seca (DE ALMEIDA et al., 2016).

O estágio fenológico e os fatores ambientais podem alterar de forma significativa as vias bioquímicas e os processos fisiológicos que alteram o metabolismo da planta e, portanto, a biossíntese do óleo essencial (SANGWAN et al., 2001). Assim, as plantas amostradas em diferentes estações podem ter composições diferentes e conseqüentemente conter ou não constituintes bioativos específicos. Diversos trabalhos relatam que os fatores fenológicos das plantas devem ser levados em conta ao estudar a influência da sazonalidade sobre a composição

química dos seus óleos essenciais (HOSNI et al., 2011; MENDES et al., 2018; SOUZA DE OLIVEIRA et al., 2017; STEFANELLO et al., 2010). No presente estudo pode-se observar, que parece haver influência da fase de floração e frutificação na composição química dos óleos de ambas as espécies, com o aumento nas porcentagens dos compostos 1,8-cineol, α -eudesmol, terpinoleno e γ -terpineno.

4. Conclusão

Neste estudo observa-se uma possível influência na variação da composição química dos óleos essenciais, entre períodos de estações secas e chuvosas e nos diferentes estágios fenológicos. Os valores mais altos de rendimento para as duas espécies estiveram associados a fase de floração e frutificação com altos níveis de precipitação. A presença de monoterpenos foi bastante pronunciada no período seco em relação aos sesquiterpenos das espécies de *Psidium* em estudo. De maneira geral, observa-se que 1,8-cineol, γ -terpineno e p-cimeno foram os compostos com maiores quantidades nos indivíduos estudados. Esses dados suportam a importância de monitorar as respostas metabólicas das plantas causadas por fatores ambientais. Outras investigações usando órgãos separados (caules, flores e frutos) de diferentes fases fenológicas, enriqueceria a compreensão da dinâmica de síntese de metabólitos secundários, com fins de obtenção de concentrações máximas de compostos bioativos.

Referências

- Adams, R.P., 2001. *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy*. Baylor University. Allured. 804p.
- Aydin, E., Türkez, H., Taşdemir, Ş., 2013. Anticancer and antioxidant properties of terpinolene in rat brain cells. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* 64, 415–424. <https://doi.org/10.2478/10004-1254-64-2013-2365>
- Bagamboula, C.F., Uyttendaele, M., Debevere, J., 2004. Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. *Food Microbiol.* 21, 33–42. [https://doi.org/10.1016/S0740-0020\(03\)00046-7](https://doi.org/10.1016/S0740-0020(03)00046-7)
- Béjaoui, A., Chaabane, H., Jemli, M., Boulila, A., Boussaid, M., 2013. Essential Oil Composition and Antibacterial Activity of *Origanum vulgare* subsp. *glandulosum* Desf. at Different Phenological Stages. *J. Med. Food* 16, 1115–1120. <https://doi.org/10.1089/jmf.2013.0079>
- Carvalho, S., Macel, M., Mulder, PP, Skidmore, A., Putten, W.H. 2014. A variação química em *Jacobaea vulgaris* é influenciada pela interação do estágio sucessional da estação e da vegetação. *Phytochem*, 99, 86-94.

- Castelo, A.V.M., Del Menezzi, C.H.S., Resck, I.S. 2012. Seasonal Variation in the Yield and the Chemical Composition of Essential Oils from Two Brazilian Native Arbustive Species. *J. Appl. Sci.*, 12: 753-760.
- Chen, H., Li, X., Chen, J., Guo, S., Cai, B. 2010. Simultaneous determination of eleven bioactive compounds in *Saururus chinensis* from different harvesting seasons by HPLC-DAD. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 51(5), 1142–1146. doi:10.1016/j.jpba.2009.11.004
- Conti, B., Benelli, G., Flamini, G., Cioni, P.L., Profeti, R., Ceccarini, L., Macchia, M., Canale, A., 2012. Larvicidal and repellent activity of *Hyptis suaveolens* (Lamiaceae) essential oil against the mosquito *Aedes albopictus* Skuse (Diptera: Culicidae). *Parasitol. Res.* 110, 2013–2021. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2730-8>
- Costa, I.R. da, Araújo, F.S. de, Lima-Verde, L.W., 2004. Flora e aspectos auto-ecológicos de um enclave de cerrado na chapada do Araripe, Nordeste do Brasil. *Acta Bot. Brasilica* 18, 759–770.
- Cruz, E.M.D.O., Pinto, J.A.O., Fontes, S.S., Arrigoni-Blank, M.D.F., Bacci, L., Jesus, H.C.R. De, Santos, D.D.A., Alves, P.B., Blank, A.F., 2014. Water deficit and seasonality study on essential oil constituents of *lippia gracilis* schauer germplasm. *Sci. World J.* 2014.
- da Silva de Souza, T., da Silva Ferreira, M.F., Menini, L., de Lima Souza, J.R.C., Parreira, L.A., Cecon, P.R., Ferreira, A., 2017. Essential oil of *Psidium guajava*: Influence of genotypes and environment. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 216, 38–44. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.12.026>
- da Silva, M.A.P., Medeiros Filho, S., Duarte, A.E., Mendonça, A.C.A.M., dos Santos, A.C.B., de Almeida Souza, M.M., 2013. Fenologia De *Caryocar Coriaceum* Wittm. Caryocaraceae, Ocorrentes Na Chapada Do Araripe—Crato-Ce-Brasil. *Cad. Cult. e Ciência* 12, 21–31.
- De Almeida, L.F.R., De Portella, R.O., Bufalo, J., Marques, M.O.M., Facanali, R., Frei, F., 2016. Non-Oxygenated sesquiterpenes in the essential oil of *Copaifera langsdorffii* Desf. Increase during the day in the dry season. *PLoS One* 11, 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149332>
- De Medeiros, F.C.M., Del Menezzi, C.H.S., Bizzo, H.R., Vieira, R.F., 2015. Scents from Brazilian Cerrado: *Psidium myrsinites* DC. (Myrtaceae) leaves and inflorescences essential oil. *J. Essent. Oil Res.* 27, 289–292. <https://doi.org/10.1080/10412905.2015.1037020>
- de Sá, S., Fiuza, T.S., Borges, L.L., Ferreira, H.D., Tresvenzol, L.M.F., Ferri, P.H., Rezende, M.H., Paula, J.R., 2016. Chemical composition and seasonal variability of the essential oils of leaves and morphological analysis of *Hyptis carpinifolia*. *Brazilian J. Pharmacogn.* 26, 688–693.
- Deschamps, C., Zanatta, J.L., Bizzo, H.R., Oliveira, M.D.C., Roswalka, L.C., 2008. Seasonal evaluation of essential oil yield of mint species. *Cienc. e Agrotecn.*, 32, 725–730. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542008000300004>

- Duarte, A.R., Santos, S.C., Seraphin, J.C., Ferri, P.H., 2012. Influence of spatial, edaphic and genetic factors on phenols and essential oils of *Myrciaria cauliflora* fruits. *J. Braz. Chem. Soc.* 23, 737–746. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532012000400020>
- Duhl, T.R., Helmig, D., Guenther, A., 2008. Sesquiterpene emissions from vegetation: A review. *Biogeosciences* 5, 761–777. <https://doi.org/10.5194/bg-5-761-2008>
- Economou, G., Panagopoulos, G., Tarantilis, P., Kalivas, D., Kotoulas, V., Travlos, I.S., Polysiou, M., Karamanos, A., 2011. Variability in essential oil content and composition of *Origanum hirtum* L., *Origanum onites* L., *Coridothymus capitatus* (L.) and *Satureja thymbra* L. populations from the Greek island Ikaria. *Ind. Crops Prod.* 33, 236–241. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2010.10.021>
- Essien, E.E., Thomas, P.S., Ascrizzi, R., Setzer, W.N., Flamini, G., 2018. *Senna occidentalis* (L.) Link and *Senna hirsuta* (L.) H. S. Irwin & Barneby: constituents of fruit essential oils and antimicrobial activity. *Nat. Prod. Res.* 6419, 1–4. <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1425842>
- Estell, R.E., Fredrickson, E.L., James, D.K. 2016. Effect of light intensity and wavelength on concentration of plant secondary metabolites in the leaves of *Flourensia cernua*. *Biochem. Syst. Ecol.*, 65, 108-114.
- Figueiredo, L. S., Bonfim, F.P.G., Siqueira, C. S., Fonseca, M. M., Silva, A. H., Martins, E. R. 2009. Efeito da época de colheita na produção de fitomassa e rendimento de óleo essencial de alecrim pimenta (*Lippia sidoides* Cham). *Rev. Bras. Plantas Med, Botucatu*, v.11, n. 2, p. 154-158.
- Frazon, R. C., Campos, L. Z. O.; Proença, C. E. B.; Sousa-Silva, J. C. 2009. Araçás do gênero *Psidium*: principais espécies, ocorrência, descrição e usos. Planaltina: Embrapa Cerrados.
- Gatti, A., Takao, L., Pereira, V., Ferreira, A., Lima, M., Gualtieri, S., 2014. Seasonality effect on the allelopathy of cerrado species. *Brazilian J. Biol.* 74, S064–S069.
- Gobbo-Neto, L., Lopes, N.P., 2007. Plantas medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Quim. Nova* 30, 374–381.
- Guimarães, L.G.D.L., Cardoso, G., Zacaroni, L.M., Moraes, A.R. De, 2008. Artigo 31, 1476–1480.
- Harada, T., Harada, E., Sakamoto, R., Ashitani, T., Fujita, K., 2012. Regio- and Substrate-Specific Oxidative Metabolism of Terpinolene by Cytochrome P450 Monooxygenases in *Cupressus lusitanica* Cultured Cells 2012, 268–275. <https://doi.org/10.4236/ajps.2012.32032>
- Hosni, K., Msaada, K., Ben Taârit, M., Marzouk, B., 2011. Phenological variations of secondary metabolites from *Hypericum triquetrifolium* Turra. *Biochem. Syst. Ecol.* 39, 43–50.
- Khadhri, A., Mokni, R. El, Almeida, C., Nogueira, J.M.F., Eduarda, M., Araújo, M., 2014. Chemical composition of essential oil of *Psidium guajava* L. growing in Tunisia. *Ind. Crops Prod.* 52, 29–31. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.10.018>

- Klink, C. a., Klink, C. a., Machado, R.B., Machado, R.B., 2005. A conservação do Cerrado brasileiro. *Megadiversidade* 1, 147–155.
- Landrum, L.R., 2017. The genus *Psidium* (Myrtaceae) in the state of Bahia, Brazil. *Canotia* 13, 1–101.
- Locatelli, E., Machado, I. E. 2004. Fenologia das espécies arbóreas de uma mata serrana (Brejo de Altitude) em Pernambuco, Nordeste do Brasil. In: PORTO, K.C.; CABRAL, J.P.J; TABARELLI, M. (Orgs.). Brejos de altitudes em Pernambuco e Paraíba: história natural, ecologia e conservação. Brasília: Ministério do Meio Ambiente. p.255-276.
- Masotti, V. R., Juteau, F., Bessieã, J.M., Viano, J. Seasonal and Phenological Variations of the Essential Oil from the Narrow Endemic Species *Artemisia molinieri* and Its Biological Activities. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 7115–7121, 2003.
- Macêdo, D.G., Menezes, I.R.A., Lacerda, S.R., Silva, M.A.P., Ribeiro, A., Macêdo, M.S., Oliveira, L.G.S., Saraiva, M.E., Alencar, S.R., Oliveira, S.F., Santos, M.O., Almeida, B.V. De, Macedo, J.G.F., Sousa, F.F.S., Soares, M.A., Araújo, T.M.S. De, Souza, M.M.A., 2016. Versatility and consensus of the use of medicinal plants in an area of cerrado in the Chapada do Araripe, *J. med. Plants. Res.*, 10, 505–514.
- Morellato, L.P.C. 2003. Phenological data, networks, and research: South America. In *Phenology: an integrative environmental science* (M.D. Schwartz, org.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, p.75-92
- Machado, M., Dinis, A.M., Santos-Rosa, M., Alves, V., Salgueiro, L., Cavaleiro, C., Sousa, M.C., 2014. Activity of *Thymus capitellatus* volatile extract, 1,8-cineole and borneol against *Leishmania* species. *Vet. Parasitol.* 200, 39–49. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.11.016>
- Malheiros, R.–, 2016. A Influência Da Sazonalidade Na Dinâmica Da Vida No Bioma Cerrado. *Rev. Bras. Climatol.* 12, 1980–55.
- Marques, F.A., Wendler, E.P., Sales Maia, B.H.L.N., Coffani-Nunes, J. V., Campana, J., Guerrero, P.G., 2008. Volatile oil of *Psidium cattleianum* Sabine from the brazilian atlantic forest. *J. Essent. Oil Res.* 20, 519–520. <https://doi.org/10.1080/10412905.2008.9700077>
- Mendes, L.A., da Silva de Souza, T., Menini, L., Guilhen, J.H.S., de Oliveira Bernardes, C., Ferreira, A., da Silva Ferreira, M.F., 2018. Spring alterations in the chromatographic profile of leaf essential oils of improved guava genotypes in Brazil. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 238, 295–302. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.04.065>
- Morais, L.A.S. De, 2009. Influência Dos Fatores Abióticos Na Composição Química Dos Óleos Essenciais. *Hortic. Bras.* 27, 4050–4063.
- Mori, S.A., L.A.M. Silva, G. Lisboa and L. Coradin. 1985. Manual de manejo do herbário fanerogâmico. Ilhéus: Centro de Pesquisas do Cacau. 97 p.
- Novaes, P., Molinillo, J.M.G., Varela, R.M., Macías, F.A., 2013. Ecological phytochemistry of Cerrado (Brazilian savanna) plants. *Phytochem. Rev.* 12, 839–855.

- Oliveira, M.J., Campos, I.F.P., Oliveira, C.B.A., Santos, M.R., Souza, P.S., Santos, S.C., Seraphin, J.C., Ferri, P.H., 2005. Influence of growth phase on the essential oil composition of *Hyptis suaveolens*. *Biochem. Syst. Ecol.* 33, 275–285. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2004.10.001>
- Padovan, A., Keszei, A., Külheim, C., Foley, W.J., 2014. The evolution of foliar terpene diversity in Myrtaceae. *Phytochem. Rev.* 13, 695–716. <https://doi.org/10.1007/s11101-013-9331-3>
- Palhares, D., Franco, a C., Zaidan, L.P., 2010. Respostas fotossintéticas de plantas do cerrado nas estações seca e chuvosa. *Rev. Bras. Biociências* 8, 213–220.
- Ribeiro-Silva, S., Medeiros, M.B., Gomes, B.M., Seixas, E.N.C., Silva, M.A.P., 2012. Angiosperms from the Araripe National Forest, Ceará, Brazil. *Check List* 8, 744–751.
- Sangwan, N.S., Farooqi, A.H.A., Shabih, F., Sangwan, R.S., 2001. Regulation of essential oil production in plants. *Plant Growth Regul.* 34, 3–21. <https://doi.org/10.1023/A:1013386921596>
- Sarrazin, S.L.F., Da Silva, L.A., De Assunção, A.P.F., Oliveira, R.B., Calao, V.Y.P., Da Silva, R., Stashenko, E.E., Maia, J.G.S., Mourão, R.H. V., 2015. Antimicrobial and seasonal evaluation of the carvacrol-chemotype oil from *Lippia origanoides* kunth. *Molec.*, 20, 1860–1871. <https://doi.org/10.3390/molecules20021860>
- Siebert, D.A., Tenfen, A., Yamanaka, C.N., De Cordova, C.M.M., Scharf, D.R., Simionatto, E.L., Alberton, M.D., 2015. Evaluation of seasonal chemical composition, antibacterial, antioxidant and anticholinesterase activity of essential oil from *Eugenia brasiliensis* Lam. *Nat. Prod. Res.* 29, 289–292. <https://doi.org/10.1080/14786419.2014.958736>
- Silva, E.A.J., Da Silva, V.P., Alves, C.C.F., Alves, J.M., Souchie, E.L., Barbosa, L.C.A., 2018. Chemical composition of the essential oil of *Psidium guajava* leaves and its toxicity against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Semin. Agrar.* 39, 865–874. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2018v39n2p865>
- Simões, C. M. O., Schenkel, E.P., Gosmann, G., Mello, J.C.P., Mentz, L.A., Petrovick, P.R. 2001. *Farmacosia: da planta ao medicamento*. 3ª edição. Porto Alegre/ Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS/ Editora da UFSC.
- Snoussi, M., Noumi, E., Punchappady-Devasya, R., Trabelsi, N., Kanekar, S., Nazzaro, F., Fratianni, F., Flamini, G., de Feo, V., Al-Sieni, A., 2018. Antioxidant properties and anti-quorum sensing potential of *Carum copticum* essential oil and phenolics against *Chromobacterium violaceum*. *J. Food Sci. Technol.* 1–9. <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3219-6>
- Soliman, F.M., Fathy, M.M., Salama, M.M., Saber, F.R., 2016. Comparative study of the volatile oil content and antimicrobial activity of *Psidium guajava* L. and *Psidium cattleianum* Sabine leaves. *Bull. Fac. Pharmacy, Cairo Univ.* 54, 219–225. <https://doi.org/10.1016/j.bfopcu.2016.06.003>
- Souza de Oliveira, L.G., Alves Ribeiro, D., Eufrazio Saraiva, M., Gonçalves de Macêdo, D., Gonçalves Ferreira Macedo, J., Gonçalves Pinheiro, P., Martins da Costa, J.G., de Almeida Souza, M.M., Alencar de Menezes, I.R., 2017. Chemical variability of essential oils of

Copaifera langsdorffii Desf. in different phenological phases on a savannah in the Northeast, Ceará, Brazil. *Ind. Crops Prod.* 97, 455–464. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.12.031>

Stefanello, M.É.A., Cervi, A.C., Wisniewski, A., Simionatto, E.L., 2010. Composição e variação sazonal do óleo essencial de *Myrcia obtecta* (O. Berg) Kiaersk. var. *obtectata*, Myrtaceae. *Brazilian J. Pharmacogn.* 20, 82–86. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2010000100017>

Stow, A., Beattie, A., 2008. Chemical and genetic defenses against disease in insect societies. *Brain. Behav. Immun.* 22, 1009–1013. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2008.03.008>

Takaishi, M., Fujita, F., Uchida, K., Yamamoto, S., Shimizu, M.S., Uotsu, C.H., Shimizu, M., Tominaga, M., 2012. 1,8-cineole, a TRPM8 agonist, is a novel natural antagonist of human TRPA1. *Mol. Pain* 8. <https://doi.org/10.1186/1744-8069-8-86>

Wang, L., Wu, Y., Huang, T., Shi, K., & Wu, Z. 2017. Chemical Compositions, Antioxidant and Antimicrobial Activities of Essential Oils of *Psidium guajava* L. Leaves from Different Geographic Regions in China. *Chem. Biodiv.*, 14(9).

Yao, X.H., Zhang, Z.B., Song, P., Hao, J.Y., Zhang, D.Y., Zhang, Y. F. 2016. Different harvest seasons modify bioactive compounds and antioxidant activities of *Pyrola incarnata*. *Ind. Crops Prod.*, 94, 405-412.

CAPÍTULO 2

Este capítulo “Efeito da sazonalidade no perfil químico e atividade antifúngica do óleo essencial isolado das folhas *Psidium salutare* (Kunth) O. Berg, dispõe os resultados sobre a influência da variabilidade sazonal na composição química do óleo essencial de *Psidium salutare*, seu potencial antifúngico e efeito na morfogênese de *Candida albicans*. Estes resultados suportam a noção de que esta planta pode ter um potencial uso em produtos farmacêuticos e conservantes.

O capítulo a seguir representa o manuscrito aceito para publicação e redigido segundo as normas estruturais e bibliográficas do periódico PeerJ - Qualis B2.

Effect of seasonality on chemical profile and antifungal activity of essential oil isolated from leaves *Psidium salutare* (Kunth) O. Berg

Delmacia G. de Macêdo^{1,*}, Marta Maria A. Souza^{1,*}, Maria Flaviana B. Morais-Braga¹, Henrique Douglas M. Coutinho², Antonia Thassya L. dos Santos², Rafael P. da Cruz², José Galberto M. da Costa², Fábio Fernandes G. Rodrigues², Lucindo J. Quintans-junior³, Jackson Roberto G. da Silva Almeida⁴ and Irwin Rose A. de Menezes²

¹ Department of Biological Sciences, Regional University of Cariri, Crato, Ceara, Brazil

² Department of Biological Chemistry, Regional University of Cariri, Crato, Ceará, Brazil

³ Physiology Department, Federal University of Sergipe, Aracaju, Sergipe, Brazil

⁴ Center For Studies and Research of Medicinal Plants, Federal University of San Francisco Valley, Petrolina, Pernambuco, Brazil

*These authors contributed equally to this work.

ABSTRACT

Medicinal plants play a crucial role in the search for components that are capable of neutralizing the multiple mechanisms of fungal resistance. *Psidium salutare* (Kunth) O. Berg is a plant native to Brazil used as both food and traditional medicine to treat diseases and symptoms such as stomach ache and diarrhea, whose symptoms could be related to fungal infections from the genus *Candida*. The objective of this study was to investigate the influence of seasonal variability on the chemical composition of the *Psidium salutare* essential oil, its antifungal potential and its effect on the *Candida albicans* morphogenesis. The essential oils were collected in three different seasonal collection periods and isolated by the hydrodistillation process in a modified Clevenger apparatus with identification of the chemical composition determined by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC/MS). The antifungal assays were performed against *Candida* strains through the broth microdilution method to determine the minimum fungicidal concentration (MFC). Fungal growth was assessed by optical density reading and the *Candida albicans* dimorphic effect was evaluated by optical microscopy in microculture chambers. The chemical profile of the essential oils identified 40 substances in the different collection periods with γ -terpinene being the predominant constituent. The antifungal activity revealed an action against the *C. albicans*, *C. krusei* and *C. tropicalis* strains with an IC_{50} ranging from 345.5 to 2,754.2 $\mu\text{g/mL}$ and a MFC higher than 1,024 $\mu\text{g/mL}$. When combined with essential oils at sub-inhibitory concentrations (MIC/16), fluconazole had its potentiated effect, i.e. a synergistic effect was observed in the combination of fluconazole with *P. salutare* oil against all *Candida* strains; however, for *C. albicans*, its effect was reinforced by the natural product in all the collection periods. The results show that the *Psidium salutare* oil affected the dimorphic transition capacity, significantly reducing the formation of hyphae and pseudohyphae in increasing concentrations. The results show that

Submitted 8 March 2018
Accepted 30 July 2018
Published 1 November 2018

Corresponding authors
Delmacia G. de Macêdo,
delmaciamedo@yahoo.com.br
Irwin Rose A. de Menezes,
irwin.alencar@urca.br

Academic editor
Siouxsie Wiles

Additional Information and
Declarations can be found on
page 13

DOI 10.7717/peerj.5476

Copyright
2018 de Macêdo et al.

Distributed under
Creative Commons CC-BY 4.0

OPEN ACCESS

How to cite this article: de Macêdo et al. (2018), Effect of seasonality on chemical profile and antifungal activity of essential oil isolated from leaves *Psidium salutare* (Kunth) O. Berg. PeerJ 6:e5476; DOI 10.7717/peerj.5476

Effect of seasonality on chemical profile and antifungal activity of essential oil isolated from leaves *Psidium salutare* (Kunth) O. Berg.

Delmacia Gonçalves de Macêdo^{a*}, Marta Maria de Almeida Souza^a, Maria Flaviana B. Morais-Braga^a, Henrique Douglas M. Coutinho^b, Antonia Thassya L. dos Santos^a, Rafael Pereira da Cruz^a, José Galberto Martins da Costa^b, Fábio Fernandes Galvão Rodrigues^b; Lucindo J. Quintans-Júnior^c; Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida^d, Irwin Rose Alencar de Menezes^{b*}

^a Department of Biological Sciences, Regional University of Cariri, URCA, 63105-000, Crato, CE, Brazil

^b Department of Biological Chemistry, Regional University of Cariri, URCA, 63105-000, Crato, CE, Brazil

^c Physiology Department, Federal University of Sergipe, Sergipe, Brazil.

^d Center For Studies and Research of Medicinal Plants, Federal University of San Francisco Valley, Petrolina, Brazil

* Corresponding author at. University of the Region of Cariri, URCA, 63105-000, Crato, CE, Brazil .Tel.: (55) 88 99929744.

E-mail addresses:delmaciamacedo@yahoo.com.br / irwinalencar@yahoo.com.br

Abstract

Medicinal plants play a crucial role in the search for components that are capable of neutralizing the multiple mechanisms of fungal resistance. *Psidium salutare* (Kunth) O. Berg is a plant native to Brazil used as both food and traditional medicine to treat diseases and symptoms such as stomach ache and diarrhea, whose symptoms could be related to fungal infections from the genus *Candida*. The objective of this study was to investigate the influence of seasonal variability on the chemical composition of the *Psidium salutare* essential oil, its antifungal potential and its effect on the *Candida albicans* morphogenesis. The essential oils were collected in three different seasonal collection periods and isolated by the hydrodistillation process in a modified Clevenger apparatus with identification of the chemical composition determined by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC/MS). The antifungal assays were performed against *Candida* strains through the broth microdilution method to determine the minimum fungicidal concentration (MFC). Fungal growth was assessed by optical density reading and the *Candida albicans* dimorphic effect was evaluated by optical microscopy in microculture chambers. The chemical profile of the essential oils identified 40 substances in the different collection periods with γ -terpinene being the predominant constituent. The antifungal activity revealed an action against the *C. albicans*, *C. krusei* and *C. tropicalis* strains with an IC₅₀ ranging from 345.5 to 2754.2 μ g/mL and a MFC higher than 1024 μ g/mL. When combined with essential oils at sub-inhibitory concentrations (MIC/16), fluconazole had its potentiated effect, ie a synergistic effect was observed in the combination of fluconazole with *P. salutare* oil against all *Candida* strains, however, for *C. albicans*, its effect was reinforced by the natural product in all the collection periods. The results show that the *Psidium salutare* oil affected the dimorphic transition capacity, significantly reducing the

formation of hyphae and pseudohyphae in increasing concentrations. The results show that *P. salutare* oil exhibits a significant antifungal activity against three *Candida* species and that it can act in synergy with fluconazole. These results support the notion that this plant may have a potential use in pharmaceutical and preservative products.

Keywords: γ -terpinene, precipitation, micromorphology, seasonal variation, pathogenesis, chemical composition, *Candida* sp., morphogenesis.

1. Introduction

Seasonality variations such as climatic conditions, water restriction, the presence of predators and soil mineral composition may alter secondary plant metabolism (FIGUEIREDO et al., 2008) and, consequently, alter the composition of essential oils throughout the year (PRINS; VIEIRA; FREITAS, 2010). In addition, some specific constituents that present chiral chemical groups are affected by the luminosity rate (MULAS; GARDNER; CRAKER, 2006). The isolation of plant essential oils is also influenced beyond taxonomic factors, as well as by the variety of epidermal cellular structures that are responsible for the production and storage of essential oils volatile organic compounds (PINTO et al., 2007). Therefore, understanding the seasonal events that alter the quality of the active compounds in the plant is fundamental to support pharmacological studies that contemplate and aim at the formulation of new drugs and direct collection periods in direct commercial plantations of this crop to obtain the oil with greater therapeutic potential.

Many species of the family Myrtaceae have a history of use as traditional medicines in ethnobotanical practices in both tropical and subtropical regions (MACÊDO et al., 2016; SOUZA et al., 2014). Family members comprise the genera *Eugenia*, *Myrcianthes*, *Campomanesia* and *Psidium*. The *Psidium* genus has approximately 150 species and can be found in all the tropics and subtropics of America and Australia (PINO et al., 2003) with several therapeutic potentials already described, especially for *Psidium guajava* Linn. (GUPTA; CHAHAL; ARORA, 2011; JOSEPH; PRIYA, 2011). Antimicrobial activity has been described for several species such as *Psidium cattleianum* (FALEIRO et al., 2016) and *Psidium guineense* (FERNANDES et al., 2012).

Psidium salutare (Kunth) O. Berg., is popularly known in the Northeast region as a "araça preto", often found in Cerrado areas in the Chapada do Araripe, southern Ceará state (RIBEIRO-SILVA et al., 2012), with five varieties of this species being recognized: var. *sericeum*, var. *mucronatum*, var. *decussatum* and var. *pohlianum*, which are also found in other countries such as Paraguay, the Caribbean and Mexico (LANDRUM, 2003). In the Cariri region, in addition to the fruit being edible, the leaves are used in traditional medicine to treat diseases and symptoms such as stomach ache and diarrhea, which may be related to *Candida* infections (MACÊDO et al., 2016; RIBEIRO et al., 2014; SOUZA et al., 2014).

Fungal infections caused by dermatophytes and yeasts of *Candida* spp., are a serious health problem in immunocompromised patients in particular and are aggravated by the increase in clinical resistance to the antifungal agents (MORAIS-BRAGA et al., 2016a; SILVA et al., 2012). In view of this problem, the interest in the use of vegetable derivatives with

therapeutic potential for antifungal action has intensified (MACÊDO et al., 2015). These new substances of plant origin may represent alternative and less toxic treatments for the treatment of infections (Vandeputte, Ferrari and Coste, 2011), synergism and inhibition of germ tube formation by compounds derived from *Crocus sativus* against *Candida* spp (Carradori et al., 2016). Considering the medicinal importance of the genus *Psidium* and the absence of studies with *Psidium salutare*, this is the first study to describe the chemical profile of *P. salutare* leaf essential oil, and the influence of seasonal variation on its composition, antifungal activity and potency to inhibit the morphogenetic switch in *Candida* species.

2. Materials and Methods

2.1 Collection area of botanical material

Psidium salutare leaves were collected in an area of Cerrado *sensu stricto*, at Fazenda Barreiro Grande (latitude: 7°21'41.7''S and longitude 39°28'42.4''W, altitude of 909 m above sea level), located in the Chapada do Araripe, Ceará, Northeast of Brazil, presenting altitudes varying between 870 and 970 meters. The region receives on average of 1.043 mm (mm) of rainfall per year (FUNCEME, 2016), where they concentrate between January and May with a dry period that lasts between five and seven months, with a critical shortage between July and September (Table 1). According to the Köppen classification system, the climate is hot humid Tropical (Aw) with an average annual of temperature between 24 and 26 °C. The collection is under the authorization of the competent ICMBio with number (n°. 50362-2).

2.2 Plant material

Fresh leaves of the species *Psidium salutare* were collected in the months of February, May and August in different periods, dry and rainy season, to evaluate the antifungal activity and the chemical compounds, as described in Table 1, between 8:30 am and 9:30 am. They were then transported to Laboratory of Ecology of Plants of the Regional University of Cariri - URCA. Species exsiccates were produced, identified by Dr. Marcos Sobral (specialist in the Myrtaceae family) and deposited in the Herbarium of Caririense Dárdano de Andrade-Lima of the Regional University of Cariri - URCA under number 12601 HCDAL.

Table 1. The average annual of meteorological conditions for each collection (2016).

Collection period	February	May	August	2016 Average annual
	OEFPs1/ winter	OEFPs2/ winter	OEFPs3/ summer	
Precipitation (mm)	49	145	0.0	968.0
Yield (%)	0.73	0.29	0.15	
Temperature (°C)	26	27	35	

OEFPs: Essential Oil of *Psidium salutare* sheets, 1, 2, 3 collection.

2.3 Obtaining and analyzing the essential oil

Approximately 500 g of fresh leaves collected were selected, washed, crushed and submitted to the hydrodistillation process for two hours in a Clevenger type apparatus. The essential oil was then dehydrated with anhydrous sodium sulfate (Na_2SO_4) and kept in an amber flask under refrigeration $< 4^\circ\text{C}$ until analyzed. The yields were determinate by volume/weight on dry weight basis.

Analysis of the oil was performed using a Shimadzu GC-17 A/MSQP5050A (GC/MS system): DB-5HT capillary column (30 m x 0.251 mm, 0.1 mm of thickness); helium carrier gas at 1.7 mL / min; injection temperature 270°C ; detector temperature 290°C ; column temperature 60°C (2 min) -180°C (1 min) at $4^\circ\text{C}/\text{min}$, then $180-260^\circ\text{C}$ at $10^\circ\text{C} / \text{min}$ (10 min). The reading speed was 0.5 scan/s of m/z 40-450 with a split ratio of 1:30. The injection volume was $1\mu\text{L}$ of 5 mg/mL of ethyl acetate solution. Avoid dead time = 3 min. The mass spectrometer was operated with ionization energy of 70 eV. The identification of the components was by comparison of their respective mass spectrum standards with those registered in the database of Wiley Online Library (229) and with the calculated retention indices with values of literature (ADAMS, [s.d.]; MCLAFFERTY; STAUFFER, 1994).

2.4 Antifungal activity evaluation

2.4.1 Culture media and inocula

For the antifungal activity assays, three standard strains of yeast fungi of the genus *Candida* were used: *C. albicans* - CA INCQS 40006, *C. tropicalis* - CT INCQS 40042 and *C. krusei* - CK INCQS 40095, obtained from the Oswald Cruz Cultures Collection of the National Institute of Quality Control in Health (INCQS). All strains were grown on Sabouraud Dextrose agar (SDA-KASVI) and incubated at 37°C for 24 h. From these, suspensions of the

microorganisms were prepared in tubes containing 3 ml of sterile solution (0.9% NaCl). The inoculum concentration was standardized according to the McFarland scale, comparing inoculum turbidity with the 0.5 standard on the scale equivalent to $10^5/10^6$ cells per mL. The potato dextrose agar (PDA, DIFCO) was prepared by diluting it more than that recommended by the manufacturer to make it a depleted medium capable of stimulating yeast to produce hyphae. Agar was added to this diluted medium to obtain a solid medium.

2.4.2 Determination of the Inhibitory Concentration of 50% of the microorganisms (IC₅₀) and obtaining the cellular viability curve

The different *P. salutare* essential oil samples from the periodic collections in the rainy and dry seasons were tested for their antifungal activity. Both the essential oil and antifungal fluconazole (from Sigma - F8929 \geq 98% (HPLC), powder) was previously diluted in dimethylsulfoxide (DMSO - Dynamic) and its final concentration was adjusted with addition of distilled water to obtain the desired concentration for (16384 $\mu\text{g}/\text{ml}$). The oil and fluconazole solutions were posteriorly microdiluted in Sabouraud Dextrose Broth (SDB) medium in a serial concentration manner ranging from 8192 to 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in 96-well plates. The penultimate well, the latter serving as a growth control (JAVADPOUR et al., 1996). The concentration of DMSO at the oil concentrations ranged from 5 to 0.004%. Product dilutions (using saline instead of inoculum) and medium sterility controls were also achieved. The plates were then taken to an incubation chamber for 24 hours at 37 °C and following this period the plates were read using an ELISA spectrophotometer (Thermoplate[®]) apparatus. The results obtained in the ELISA reading were used to construct the cell viability curve and to determine the IC₅₀ of the *P. salutare* essential oils (Morais- Braga et al., 2016 b). All test were performed in triplicate.

2.4.3 Determination of the minimal fungicidal concentration (MFC)

A small sterile rod was placed in each well of the microdilution test plate, with the exception of the sterility control. After mixing the medium in each well, the rod was taken to a large petri dish containing SDA, where by touching the surface, the solution (medium + inoculum + natural product) was transferred for yeast subculture and cell viability analysis. The plates were incubated at 37 °C for 24 hours, and checked for the growth or non-growth of *Candida* colonies (ERIKA J. ERNST, MICHAEL E. KLEPSEK, MICHAEL E. ERNST,

SHAWN A. MESSER, 1999). The concentration at which there was no growth of fungal colonies was considered the MFC of the natural product.

2.5 Evaluation of the Psidium salutare essential oil modulating effect on the antifungal activity of fluconazole

The solution containing the essential oil of *P. salutare* (OEFPs) was tested in subinhibitory concentration (MFC/16). The volume of 100 μL of a solution containing SDB (Sabouraud Dextrose Broth), 10% inoculum and natural product were distributed in each well in the alphabetical direction of the plate. Afterwards, 100 μL of the antifungal were mixed to the first well and serially microdiluted in a ratio of 1: 1, the latter cavity being used as fungus growth control (COUTINHO et al., 2008). The fluconazole concentrations varied gradually from 8192 to 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Dilution controls of the natural products (OEFPs) were used where the inoculum was replaced by saline/DMSO and control of sterility with the medium. The plates were incubated at 37 °C for 24 hours and reading was done on a spectrophotometer, Thermoplate® ELISA, with a wavelength of 630 nm (Morais- Braga et al., 2016 b).

2.6 Effect of the Psidium salutare leaf oil on Candida albicans morphogenesis

The essential oil from the three samples collected at different periods were used to observe if the natural product caused any alteration in the morphogenesis of *C. albicans*, the oil was tested in different concentrations such as the Superior Evaluated Concentration - SEC (8,192 $\mu\text{g}/\text{mL}$), SEC/4 (2,048 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and SEC/16 (512 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

The trials were performed with some modifications according to Sidrim and Rocha (2010) and Mendes (2011). The medium (3 mL) were combined to the tested product, were poured into the slide of the microscope at the respective concentrations, previously homogenized by the agitator. After solidification of the medium, the yeast was seeded with the aid of a 1 μL calibrated loop and two parallel grooves were extracted. The striae were covered with sterile lamellae. Plates were incubated and after 24 hours as slides were subsequently observed under a 40x objective optical microscope. A control for yeast growth (hyphae stimulated by depleting medium) was performed, as well as a control with the conventional antifungal fluconazole for comparative purposes. Tests using DMSO as a control were previously performed (Morais-Braga et al., 2016a), demonstrating that it does not cause inhibition of hyphae at the concentrations tested.

2.7 Statistical analysis

The data obtained for each sample were checked for their normal distribution and then analyzed by *One-Way* ANOVA followed by Tukey's test. The IC₅₀ values were computed by linear regression for interpolation in standard curves relating the percentage (%) growth values and the concentration of the product in µg/mL using the GraphPad Prism software, version 6.0. All analyzes were performed in triplicates (see raw data in supplementary data attached).

3. Results

In the evaluation of the yield of the essential oil *Psidium salutare* in the analyzed periods, February (0.73%), May (0.29%) and August (0.15%) show that highest yields coincident with the precipitation periods and dryness in the region, however, it was not possible to obtain a statistically significant correlation. Then, when analyzing the *Psidium salutare* oil yield, the beginning of the rainy season was the ideal period for collection. In the *P. salutare* GC/MS analysis it was possible to identify an average of 89.13% of the constituents corresponding to 40 compounds (Table 2).

When calculating the average of the compounds, a predominance of monoterpene hydrocarbons (39.79%), sesquiterpene hydrocarbons (20.94%), oxygenated monoterpenes (12.98%) and oxygenated sesquiterpenes (14.91%) can be observed.

Table 2. Determination of the percentage composition of the chemical composition of the *Psidium salutare* leaf essential oil by Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry (CG/MS) in different collection periods.

Compounds	TR* (min)	OEFPs1	OEFPs2	OEFPs3	% (media)
1,8 Cineole	5.5	0.61 ^a	0.51 ^a	1.05 ^a	0.72
Dimethyl benzylcarbinyl acetate	8.2	0.19 ^a	0.15 ^a	0.65 ^a	0.33
Copaene	11.2	3.22 ^a	3.53 ^a	1.91 ^a	2.89
Cubenol	14.8	0.63 ^a	0.0 ^a	3.42 ^a	1.35
Espatulenol	12.2	0.23 ^a	0.30 ^a	0.13 ^a	0.22
Sabinene hydrate	8.1	2.28 ^a	3.48 ^a	3.94 ^a	3.23
Isocarofilene	11.9	3.78 ^a	3.75 ^a	1.20 ^a	2.91
Limonene	5.4	1.10 ^a	1.15 ^a	1.14 ^a	1.13
Linalool	6.6	5.55 ^a	4.72 ^a	7.26 ^a	5.84
Myrcene	4.7	0.65 ^a	0.42 ^a	0.08 ^b	0.38
Myrtenol	7.5	0.21 ^a	0.16 ^a	0.09 ^a	0.15
Ocimene	5.7	2.15 ^a	1.93 ^a	1.50 ^a	1.86
Palustrol	14.1	0.05 ^a	0.11 ^a	0.10 ^a	0.09
Patchoulane	14.7	0.25 ^a	0.19 ^a	3.08 ^a	1.17
P-Cymene	5.3	5.05 ^b	6.37 ^b	17.83 ^e	9.75

Compounds	TR* (min)	OEFPs1	OEFPs2	OEFPs3	% (media)
Selina-3,7 (11) -diene	13.6	0.37 ^a	0.28 ^a	0.0 ^a	0.22
Seychellene	13.9	0.20 ^a	0.17 ^a	0.40 ^a	0.26
Terpineol	8.3	1.67 ^a	0.90 ^a	0.12 ^a	0.90
Terpinolene	6.4	16.99 ^c	14.49 ^c	6.90 ^b	12.79
Valencene	13.3	0.23 ^a	0.09 ^a	0.30 ^a	0.21
Viridiflorene	16.4	0.12 ^a	0.0 ^a	0.35 ^a	0.16
Viridiflorol	14.7	0.53 ^a	0.95 ^a	2.07 ^a	1.18
α -phellandrene	5.0	0.15 ^a	0.08 ^a	0.05 ^a	0.09
α -caryophyllene	12.4	0.24 ^a	0.29 ^a	1.68 ^a	0.74
α -cubebene	15.0	0.90 ^a	2.05 ^a	0.0 ^a	0.98
α -farnesene	13.8	0.03 ^a	0.03 ^a	0.24 ^a	0.10
α -gurjunene	11.7	0.21 ^a	0.10 ^a	0.08 ^a	0.13
α -muurolene	12.6	0.63 ^a	0.72 ^a	0.69 ^a	0.68
α -pinene	5.1	0.83 ^a	0.55 ^a	0.62 ^a	0.67
β -cadinene	5.9	0.96 ^a	1.45 ^a	0.83 ^a	1.08
β -elemene	13.7	0.16 ^a	0.12 ^a	0.70 ^a	0.33
β -eudesmene	12.8	0.15 ^a	0.11 ^a	0.0 ^a	0.09
β -guaianum	15.5	2.79 ^a	3.12 ^a	0.0 ^a	1.97
γ -gurjunene	13.6	0.10 ^a	0.21 ^a	0.26 ^a	0.19
γ -muurolene	13.2	2.58 ^a	2.42 ^a	3.20 ^a	2.73
γ -terpinene	5.9	13.97 ^d	17.09 ^d	10.32 ^c	13.79
δ -cadinene	13.3	5.27 ^a	3.88 ^a	3.84 ^a	4.33
δ -cadinol	15.3	1.68 ^a	0.0 ^a	0.92 ^a	0.87
δ -guaiene	14.9	0.28 ^a	0.28 ^a	3.70 ^b	1.42
τ -cadinol	15.2	12.75 ^d	10.51 ^d	10.35 ^d	11.20
Monoterpenes hydrocarbons		40.06	41.53	37.82	39.79
Sesquiterpenes hydrocarbons		21.65	22.15	18.98	20.94
Oxygenated monoterpenes		11.15	10.32	13.08	12.98
Oxygenated sesquiterpenes		15.87	11.87	16.99	14.91
Others		1.01	0.79	4.13	1.44
Total		89.74	86.66	91.00	90.6

TR = Retention Time and OEFPs: essential oil from the leaves of *Psidium salutare* First collection (February), Second collection (May) e Third collection (August). Averages followed by different letters differ by Tukey test at $p < 0.05$

The major constituents were linalool, p-cymene, terpinolene, γ -terpinene and τ -cadinol. The results obtained during the collection periods showed that although several compounds presented a random composition, others remained constant. In the rainy season in February and May, the compounds that stood out were terpinolene (14.49 - 16.99%), γ -terpinene (13.97 - 17.09%), τ -cadinol (12.75-10.51%), p-cymene (5.05-6.37%) and linalool (5.55-4.72%). In the dry season, represented by August, the major compounds were p-cymene (17.83%), γ -terpinene (10.32%), τ -cadinol (10.35%) and linalool (7.26%). In the dry season, represented by August, the major compounds were p-cymene (17.83%), γ -terpinene (10.32%), τ -cadinol (10.35%) and linalool (7.26%). This variation can be partly explained by the fact that environmental factors

can affect certain chemical compounds while exerting any influence on the production of other chemicals.

The intrinsic *P. salutare* essential oil antifungal activity at different collection times, against different *Candida* strains showed no significant clinical activity (MIC ≥ 1024 $\mu\text{g/mL}$), demonstrating that it was little influenced by changes in the chemical composition of the oil and by rainfall (Table 3). In this sense, although punctually significant, the chemical variations in the oil composition were not able to exhibit satisfactory inhibitory effect against *Candida* strains showing effects only in high concentrations, *Candida albicans* INCQS 40006 (4096 $\mu\text{g/mL}$), *Candida tropicalis* INCQS 40042 ($\geq 16,384$ $\mu\text{g/mL}$) and *Candida krusei* INCQS 40095 (1024 $\mu\text{g/mL}$) (Table 3).

Among the analyzed periods, the IC₅₀ (Ability to Inhibit 50% of cells), of products ranged from 345.5 to 2754.2 $\mu\text{g/mL}$ and image of the cellular viability curve in different concentrations of essential oil, the lowest value recorded for *C. albicans* was related to the first collection period, with an IC₅₀ of 581.3 $\mu\text{g/mL}$ (Figure 1A), precipitation of 49 mm and elevated major compounds, such as terpinolene, τ -cadinol and γ -terpinene.

Table 3. The inhibitory effect of association the essential oil of *Psidium salutare* with fluconazole on *Candida* ($\mu\text{g/mL}$).

Tested Products	Strains					
	CA INCQS 40006		CT INCQS 40042		CK INCQS 40095	
	CFM	IC ₅₀	CFM	IC ₅₀	CFM	IC ₅₀
	$\mu\text{g/mL}$	$\mu\text{g/mL}$	$\mu\text{g/mL}$	$\mu\text{g/mL}$	$\mu\text{g/mL}$	$\mu\text{g/mL}$
Fluconazole (FCZ)	8192	16.8	≥ 16384	9.3	≥ 16384	271
OEFPs 1+FCZ	1024	2.7	≥ 16384	2.6	8192	44.4
OEFPs 2+FCZ	8192	8.0	≥ 16384	5.3	1024	32.4
OEFPs 3+FCZ	4096	6.3	≥ 16384	3.7	8192	45.2

OEFPs: Essential oil of *Psidium salutare* leaves, 1, 2 and 3 collections; CA: *Candida albicans*; CT: *Candida tropicalis*; CK: *Candida krusei*; INCQS: National Institute of Health Quality Control. IC₅₀ ($\mu\text{g/mL}$): the inhibitor concentration that decreases 50% the of growth.

For *C. tropicalis*, the lowest IC₅₀ value was observed in the last collection period (1621.8 $\mu\text{g/mL}$) (Figure 1C), coinciding with the dry period in the region, with p-cymene, linalol, γ -terpinene and τ -cadinol in higher concentrations in the sample.

However, for *C. krusei* the antifungal activity was showed more active in second collection period (345.5 $\mu\text{g/mL}$) (Figure 1E) with significant value when compared to

fluconazole IC₅₀ of 271.3 µg/mL (Table 4). This result corroborates with an incidence of precipitation of 145 mm and presence of the major γ-terpinene, τ-cadinol and terpinolene compounds in the sample.

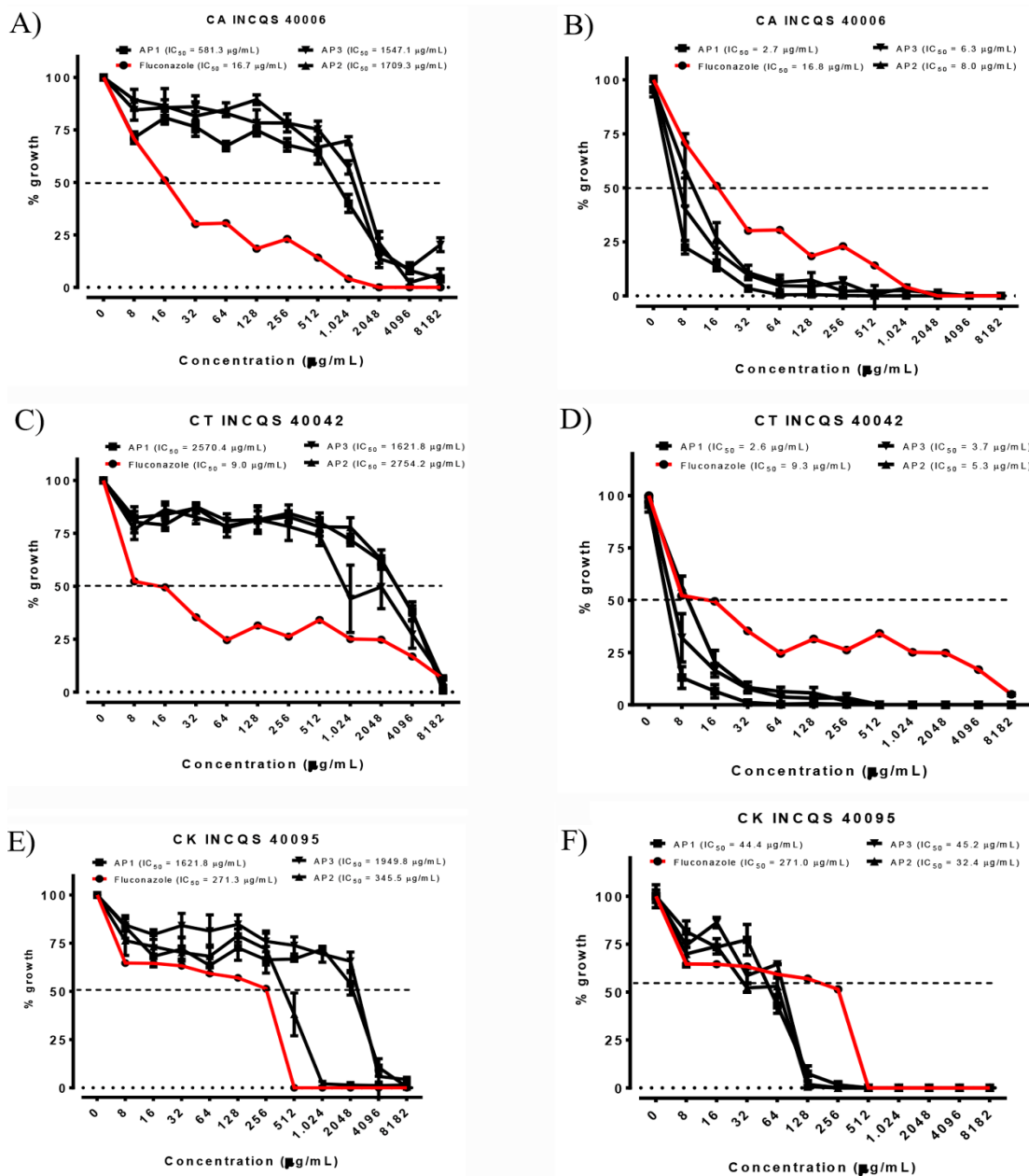
For the Intrinsic Minimal Fungicide Concentration (MFC) the results showed a chemical variation in the essential oil composition between dry and rainy periods, thus influencing the concentration for *C. albicans* (4096 µg/mL) and *C. krusei* (1024 µg/mL), however for *C. tropicalis* (≥16,384 µg/mL) the concentrations remained constant

Table 4. The CFM (µg/mL) of the essential oil of *Psidium salutare* on different strains of *Candida* in modulatory effect.

Strains	Tested Products					
	OEFPs1 µg/mL	OEFPs1+FCZ µg/mL	OEFPs2 µg/mL	OEFPs2+FCZ µg/mL	OEFPs3 µg/mL	OEFPs3+FCZ µg/mL
CA INCQS 40006	1024	581.3	8192	1709.3	4096	1547.1
CT INCQS 40042	≥16384	2570.4	≥16384	2754.2	≥16384	1621.8
CK INCQS 40095	8192	1621.8	1024	345.5	8192	1949.8

OEFPs: Essential oil of Leaves of *Psidium salutare*, 1,2 and 3 collections; CA: *Candida albicans*; CT: *Candida tropicalis*; CK: *Candida krusei*; INCQS: National Institute of Quality Control in Health;

Figure 1. Cell viability curve and IC₅₀ of the *Psidium salutare* essential oil (A, C and E) and the oil in combined with fluconazole (B, D and F) against different *Candida* spp. strains, at different collection periods.

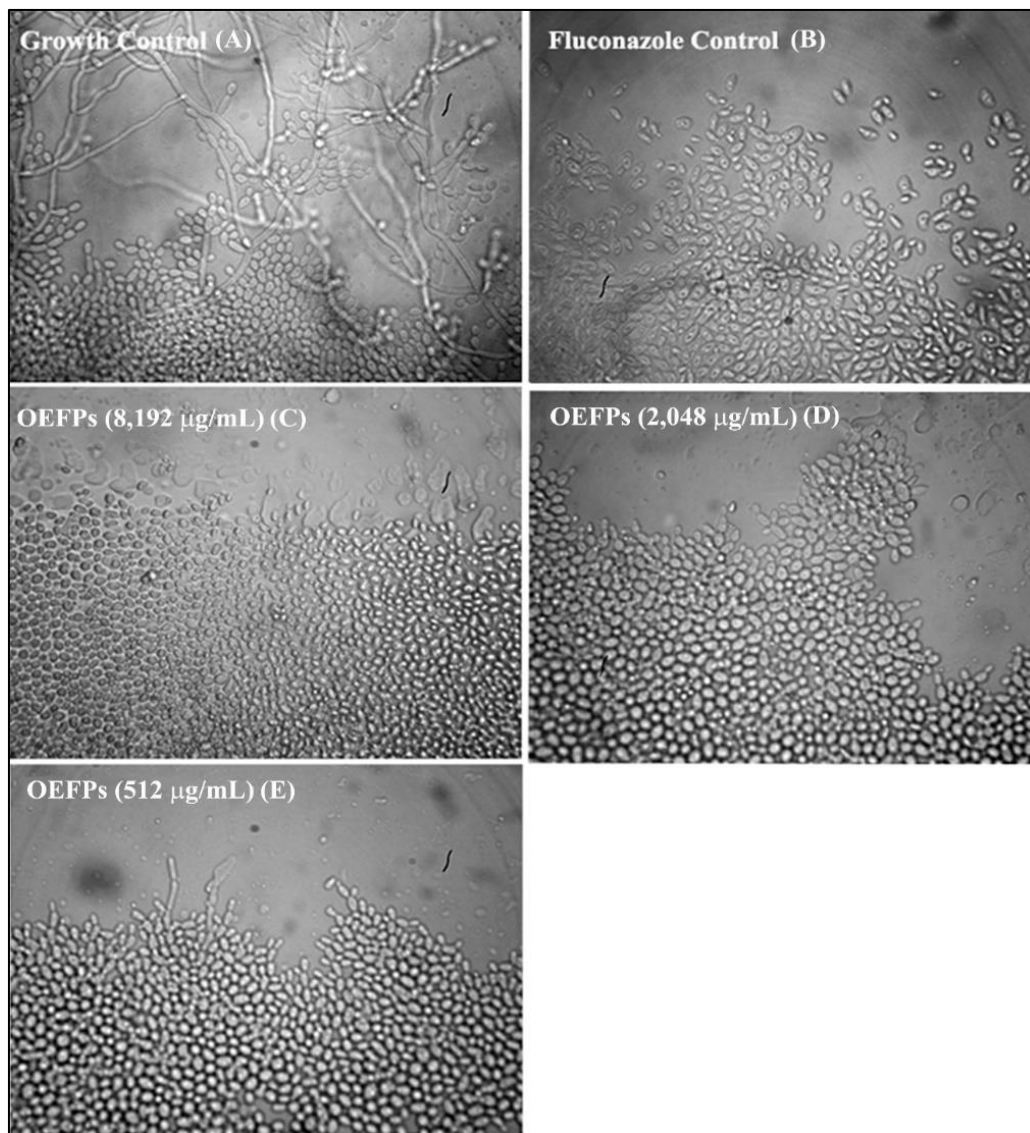


Concentration of fluconazole: 2,048 µg/mL. OEFPs: Essential oil of the leaves of *Psidium salutare*, 1, 2 and 3 collections; CA: *Candida albicans*; CT: *Candida tropicalis*; CK: *Candida krusei*; INCQS- National Institute of Quality Control in Health.

The effect of the natural product on morphological transition in *C. albicans* was evaluated by microculture assay. It can be observed that the essential oil inhibited the formation of hyphae and pseudohyphae at concentrations starting from 512.0 µg/mL, resulting in the reduction of fungal virulence (Figure 2). The microscopy results shown in Figure 2 demonstrate

that the essential oil can inhibit germinative tube formation and reduce hyphae elongation, which can be considered effective against *C. albicans* dimorphism, thus reducing fungal progression and the spread of infection.

Figure 2. Effect of the *Psidium salutare* essential oil on *Candida albicans* yeast micromorphological aspects.



Culture performed in depleted *Potato Dextrose Agar* medium, with 40x objective visualization. (A) Growth Control, (B) Fluconazole Antifungal effect at 2,048 µg/mL, (C) *Psidium salutare* essential oil effect at 8,192 µg/mL, (D) *Psidium salutare* essential oil effect at 2,048 µg/mL and (E) (C) *Psidium salutare* essential oil effect at 512 µg/mL; CA: *Candida albicans*; INCQS: National Institute of Quality Control in Health.

4. Discussion

As expected, the chemical composition varied during the analyzed period. This result corroborates with other studies that have shown that environmental factors can affect certain chemical compounds, while in others they have no influence on their production (Araujo et al.,

2010; Estell et al., 2016). In the leaves of *Camellia sinensis*, the main catechins (epigallocatechin gallate, epicatechin) varied during the year, and this variation was associated to the following environmental factors that can act in combination or alone: day length, sunlight and / or temperature (Yao et al. al., 2005). According to studies the rainy season was favorable for the production of *Copaifera langsdorffii* Desff oils (Souza de Oliveira et al., 2017), *Eucalyptus citriodora* Hook (Castro et al., 2008) and *Cymbopogon citratus* (Santos et al., 2009).

In the present study, the production of the major compounds such as Terpinolene and γ -terpinene in the milder months (26 °C) was positively influenced, with an increase in the percentage of these compounds in the sample, whereas the production of P-cymene was positively influenced in the warmer period, which shows that similar compounds can be altered simultaneously by the same factor, resulting in variations throughout the year, except for the τ -cadinol compound that remained stable.

Comparing the results with available literature, the rainy season was also favorable for the yield of oils *Copaifera langsdorffii* Desff (SOUZA DE OLIVEIRA et al., 2017), *Eucalyptus citriodora* Hook (CASTRO et al., 2008) and *Cymbopogon citratus* (SANTOS et al., 2009). The presence of the major compounds as, γ -terpinene, terpinolene, τ -cadinol, p-cymene and linalool in the essential oil of the species under study, were also present in *P. myrsinites* Mart. (DE MEDEIROS et al., 2015), *Psidium pohlianum* O. Berg, *Psidium guyanensis* Pers (NETO et al., 1994) and *Psidium caudatum* McVaugh (YÁÑEZ et al., 2002).

Variations in plant active components are important parameters to correlate biological activity, including antibacterial, antifungal and insecticide. Knowledge of the abiotic factors influencing the chemical variability and essential oil yield is important for optimizing crop conditions and harvesting time so that they are of high quality, factors essential for commercialization. In addition, a number of biotic factors such as plant/micro-organism (STOPPACHER et al., 2010), plant/insects (KESSLER; BALDWIN, 2001) and plant/plant interactions, age and development stage, as well as abiotic factors such as luminosity (TAKSHAK; AGRAWAL, 2016), temperature, rainfall, nutrition, time and harvest time (BITU et al., 2015), may present correlations with each other, acting in conjunction, and may exert a joint influence on the chemical variability and essential oil yield.

The major compounds terpinolene, τ -cadinol and γ -terpinene, have already been reported in other plants that have been studied for their antifungal activity against *C. albicans* (TAMPIERI et al., 2005), however, none of the compounds were studied to evaluate their activity against *C. krusei*. Moreover, studies with *C. tropicalis* verify that the compounds p-cymene and linalool also possess an inhibitory effect (HSU et al., 2013; SILVA et al., 2017).

Combination therapy using natural and antimicrobial products has been reported as an important strategy to combat the development of microbial resistance due to the production of an additive or synergistic effect. Thus, we demonstrated that the essential oil association with fluconazole may represent a therapeutic benefit in reducing the antifungal dosage, representing an improvement in toxic levels, while producing a fungicidal effect (PEMMARAJU et al., 2013).

This is the first work that shows the potential modulating activity of *P. salutare* essential oil, so there was no way to compare the results here with respect to the species. Within the genus *Psidium*, some data exist, however, they are related to extracts. Morais-Braga et al. (2016) observed fluconazole and all extracts had high inhibitor concentrations, however, when these were in association with sub-inhibitory concentrations (MIC/16), fluconazole had an improved effect, thus a synergistic effect was observed in the combination of fluconazole with extracts of *Psidium brownianum* against all strains of *Candida* (MORAIS-BRAGA et al., 2016a). According to this study, Castro et al. (2015) demonstrated that the *Psidium cattleianum* essential oil had an effect on the inhibition of important clinical fungal strains such as *Trichosporon asahii* (CASTRO et al., 2015), *Candida parapsilosis*, *Candida albicans*, *Candida lipolytica* and *Candida guilhermondii*, with concentrations ranging from 41.67 ± 18.04 to $16,670 \pm 72.17$ $\mu\text{g/mL}$ for the tested strains.

The *C. albicans* was selected for association study, because, it is the most common pathogenic agent involved in systemic infections and the main strain responsible for infections caused by *Candida* fungi (ROMANI, 2012; YAPAR, 2014). In previous studies, of our research group, with other species of this genus, *P. brownianum* and *P. guajava* extracts had their antifungal potential investigated, obtaining favorable results, where they also managed to affect the phenotypic plasticity of *C. albicans* and *C. tropicalis*, reducing the formation process of hyphae and pseudohyphae as their concentrations were increased (MORAIS-BRAGA et al., 2016a, 2017, 2016b).

Candida albicans is a polymorphic fungus that can grow both in the yeast form (ovoid form), elongated ellipsoid cells with constrictions in the septa (pseudohyphae), or as true hyphae of parallel walls, as can be observed in Figure 2 - Growth Control (Berman, 2002). The hyphae or pseudohyphae forms are responsible for the infectious process ranging from superficial skin infections to life-threatening systemic infections. Transition to the hyphae form can be triggered by increases in temperature to 37 °C, increases in pH, and the addition of inducers (Shareck and Belhumeur, 2011). In this form, the germinating tube and the tip extension can generate strong pressures for tissue penetration due to the secretion of proteases, lipases and other histological enzymes. This is important since hyphae formation is central to

another aspect of *Candida*'s virulence: development of biofilms that is associated with increased resistance to antifungal medications (CALDERONE; FONZI, 2001).

Some authors have proposed that the essential oil activity may be in part related to its hydrophobicity, responsible for its partition of the cell membrane lipid bilayer, leading to a change in permeability and cell membrane damage resulting from direct damage to the membrane resulting in a reduced ability to maintain cellular functions (BRAGA et al., 2007; HSU et al., 2013). Another mechanism is related to a metabolic impairment with a reduction of 3':5"-cyclic adenosine monophosphate (cAMP) formation and, together with a mitogenic activation protein (MAP) signaling pathway, responsible for playing an important role in the formation of filamentous forms (DEVEAU et al., 2010; DIŽOVÁ; BUJDÁKOVÁ, 2017; HOLLOSÝ; KERI, 2004). Several mechanisms have been tested in order to provide new and valuable means to combat *Candida* pathogenesis that may lead to new strategies for the development of antifungal drugs.

5. Conclusion

In conclusion, the essential oil of *P. salutare* presented as main components, hydrogenated monoterpenes, as γ -terpinene, whose composition was influenced by the beginning of the rainy season, proving to be the ideal period for the isolation of oil. It is not possible to affirm that the antifungal activity of the oil was influenced by the seasonal changes in the precipitation, with the exception of *C. krusei*, where it presented the lower MFC and IC₅₀ values. The essential oil demonstrated a significant effect on *Candida* morphogenesis, reducing the ability of morphological transitions from invasive infectious processes and resistance to *C. albicans*. In this way, the presented results can be a starting point for new in vivo assays for the possible development of new complementary and alternative therapies, as well as to support its popular medicinal use against diseases of fungal origin.

6. Acknowledgments

The authors acknowledge the support and cooperation received from LEV/LPPN/ LMBM (Laboratory of plant ecology/ Laboratory of Natural Products Research / Microbiology and Molecular Biology Laboratory).

7. References

- ADAMS, Robert P. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography / Mass Spectroscopy. [s. l.], [s.d.].
- AYDIN, Elanur; TÜRKEZ, Hasan; TAŞDEMİR, Şener. Anticancer and antioxidant properties of terpinolene in rat brain cells. **Arhiv za Higijenu Rada i Toksikologiju**, [s. l.], v. 64, n. 3, p. 415–424, 2013.
- BAGAMBOULA, C. F.; UYTTENDAELE, M.; DEBEVERE, J. Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. **Food Microbiology**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 33–42, 2004.
- BÉJAOU, Afef et al. Essential Oil Composition and Antibacterial Activity of *Origanum vulgare* subsp. *glandulosum* Desf. at Different Phenological Stages. **Journal of Medicinal Food**, [s. l.], v. 16, n. 12, p. 1115–1120, 2013. Disponível em: <<http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/jmf.2013.0079>>
- BITU, Vanessa et al. Effect of collection time on composition of essential oil of *Lippia gracilis* Schauer (Verbenaceae) growing in Northeast Brazil. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, [s. l.], 2015.
- BRAGA, P. C. et al. Inhibitory activity of thymol against the formation and viability of *Candida albicans* hyphae. **Mycoses**, [s. l.], v. 50, n. 6, p. 502–506, 2007.
- CALDERONE, Richard A.; FONZI, William A. Virulence factors of *Candida albicans*. **Trends in microbiology**, [s. l.], v. 9, n. 7, p. 327–335, 2001.
- CARVALHO, Sabrina et al. Chemical variation in *Jacobaea vulgaris* is influenced by the interaction of season and vegetation successional stage. **Phytochemistry**, [s. l.], v. 99, p. 86–94, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2013.12.004>>
- CASTRO, Micheli R. et al. Essential oil of *Psidium cattleianum* leaves: Antioxidant and antifungal activity. **Pharmaceutical biology**, [s. l.], v. 53, n. 2, p. 242–250, 2015.
- CASTRO, N. E. A. et al. Avaliação de rendimento e dos constituintes químicos do óleo essencial de folhas de *Eucalyptus citriodora* Hook. colhidas em diferentes épocas do ano em municípios de Minas Gerais. **Rev. Bras. Pl. Méd.**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 70–75, 2008.
- CONTI, Barbara et al. Larvicidal and repellent activity of *Hyptis suaveolens* (Lamiaceae) essential oil against the mosquito *Aedes albopictus* Skuse (Diptera: Culicidae). **Parasitology Research**, [s. l.], v. 110, n. 5, p. 2013–2021, 2012.
- COSTA, Itayguara Ribeiro Da; ARAÚJO, Francisca Soares De; LIMA-VERDE, Luiz Wilson. Flora e aspectos auto-ecológicos de um enclave de cerrado na chapada do Araripe, Nordeste do Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, [s. l.], v. 18, n. 4, p. 759–770, 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-330620040004000006&lng=pt&tlng=pt>
- COUTINHO, Henrique D. M. et al. Enhancement of the antibiotic activity against a multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and chlorpromazine. **Chemotherapy**, [s. l.], v. 54, n. 4, p. 328–330, 2008.
- CRUZ, Elizangela Mércia De Oliveira et al. Water deficit and seasonality study on essential oil

- constituents of *lippia gracilis* schauer germplasm. **Scientific World Journal**, [s. l.], v. 2014, 2014.
- DA SILVA DE SOUZA, Tércio et al. Essential oil of *Psidium guajava*: Influence of genotypes and environment. **Scientia Horticulturae**, [s. l.], v. 216, p. 38–44, 2017.
- DA SILVA, Maria Arlene Pessoa et al. Fenologia De *Caryocar Coriaceum* Wittm. Caryocaraceae, Ocorrentes Na Chapada Do Araripe–Crato-Ce-Brasil. **Cadernos de Cultura e Ciência**, [s. l.], v. 12, n. 2, p. 21–31, 2013.
- DE ALMEIDA, Luiz Fernando Rolim et al. Non-Oxygenated sesquiterpenes in the essential oil of *Copaifera langsdorffii* desf. Increase during the day in the dry season. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 11, n. 2, p. 1–12, 2016.
- DE MEDEIROS, Fernando C. M. et al. Scents from Brazilian Cerrado: *Psidium myrsinites* DC. (Myrtaceae) leaves and inflorescences essential oil. **Journal of Essential Oil Research**, [s. l.], v. 27, n. 4, p. 289–292, 2015.
- DE SÁ, Stone et al. Chemical composition and seasonal variability of the essential oils of leaves and morphological analysis of *Hyptis carpinifolia*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, [s. l.], v. 26, n. 6, p. 688–693, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bjp.2016.05.011>>
- DESCHAMPS, Cícero et al. Seasonal evaluation of essential oil yield of mint species. **Ciencia e Agrotecnologia**, [s. l.], v. 32, n. 3, p. 725–730, 2008.
- DEVEAU, Aurélie et al. Farnesol induces hydrogen peroxide resistance in *Candida albicans* yeast by inhibiting the Ras-cyclic AMP signaling pathway. **Eukaryotic cell**, [s. l.], v. 9, n. 4, p. 569–577, 2010.
- DÍŽOVÁ, S.; BUJDÁKOVÁ, H. Properties and role of the quorum sensing molecule farnesol in relation to the yeast *Candida albicans*. **Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 72, n. 6, p. 307–312, 2017.
- DUARTE, Alessandra R. et al. Influence of spatial, edaphic and genetic factors on phenols and essential oils of *Myrciaria cauliflora* fruits. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, [s. l.], v. 23, n. 4, p. 737–746, 2012.
- DUHL, T. R.; HELMIG, D.; GUENTHER, A. Sesquiterpene emissions from vegetation: A review. **Biogeosciences**, [s. l.], v. 5, n. 3, p. 761–777, 2008.
- ECONOMOU, G. et al. Variability in essential oil content and composition of *Origanum hirtum* L., *Origanum onites* L., *Coridothymus capitatus* (L.) and *Satureja thymbra* L. populations from the Greek island Ikaria. **Industrial Crops and Products**, [s. l.], v. 33, n. 1, p. 236–241, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2010.10.021>>
- ERIKA J. ERNST, MICHAEL E. KLEPSE, MICHAEL E. ERNST, SHAWN A. MESSER, And Michael A. Pfaller. In Vitro Pharmacodynamic Properties of MK-0991 Determined by Time-kill Methods. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, [s. l.], v. 36, n. 2, p. 101–105, 1999.
- ESSIEN, Emmanuel E. et al. *Senna occidentalis* (L.) Link and *Senna hirsuta* (L.) H. S. Irwin & Barneby: constituents of fruit essential oils and antimicrobial activity. **Natural Product Research**, [s. l.], v. 6419, p. 1–4, 2018. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/14786419.2018.1425842>>

- ESTELL, Rick E.; FREDRICKSON, Ed L.; JAMES, Darren K. Effect of light intensity and wavelength on concentration of plant secondary metabolites in the leaves of *Flourensia cernua*. **Biochemical Systematics and Ecology**, [s. l.], v. 65, p. 108–114, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bse.2016.02.019>>
- FALEIRO, José Henrique et al. The chemical featuring, toxicity, and antimicrobial activity of *Psidium cattleianum* (Myrtaceae) Leaves. **New Journal of Science**, [s. l.], v. 2016, 2016.
- FERNANDES, Tiago Gomes et al. In vitro synergistic effect of *Psidium guineense* (Swartz) in combination with antimicrobial agents against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. **The Scientific World Journal**, [s. l.], v. 2012, 2012.
- FIGUEIREDO, A. Cristina et al. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. **Flavour and Fragrance journal**, [s. l.], v. 23, n. 4, p. 213–226, 2008.
- FIGUEIREDO, L. S. et al. Efeito da época de colheita na produção de fitomassa e rendimento de óleo essencial de alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* Cham.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, [s. l.], v. 11, n. 2, p. 154–158, 2009.
- FRANZON, Rodrigo Cezar et al. Araças do Gênero *Psidium*: principais espécies, ocorrência, descrição e usos. **Embrapa Cerrados**, [s. l.], p. 1–47, 2009.
- GATTI, AB et al. Seasonality effect on the allelopathy of cerrado species. **Brazilian Journal of Biology**, [s. l.], v. 74, n. 3 suppl 1, p. S064–S069, 2014. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1519-69842014003000009&lng=en&tlng=en>
- GOBBO-NETO, Leonardo; LOPES, Norberto P. Plantas medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, [s. l.], v. 30, n. 2, p. 374–381, 2007.
- GOMES, Sueli Maria et al. Anatomia foliar de espécies de Myrtaceae: contribuições à taxonomia e filogenia. **Acta Botanica Brasilica**, [s. l.], v. 23, n. 1, p. 224–238, 2009.
- GUIMARÃES, Luiz Gustavo De L. et al. Artigo. [s. l.], v. 31, n. 6, p. 1476–1480, 2008.
- GUPTA, Girish Kumar; CHAHAL, Jagbir; ARORA, Deeksha. *Psidium guajava* Linn.: Current research and future prospects. **J Pharm Res**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 42–46, 2011.
- HARADA, Takako et al. Regio- and Substrate-Specific Oxidative Metabolism of Terpinolene by Cytochrome P450 Monooxygenases in *Cupressus lusitanica* Cultured Cells. [s. l.], v. 2012, n. February, p. 268–275, 2012.
- HOLLOSZY, Ferenc; KERI, Gyorgy. Plant-derived protein tyrosine kinase inhibitors as anticancer agents. **Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents**, [s. l.], v. 4, n. 2, p. 173–197, 2004.
- HOSNI, Karim et al. Phenological variations of secondary metabolites from *Hypericum triquetrifolium* Turra. **Biochemical Systematics and Ecology**, [s. l.], v. 39, n. 1, p. 43–50, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bse.2011.01.001>>
- HSU, Chih-Chieh et al. The inhibitory activity of linalool against the filamentous growth and biofilm formation in *Candida albicans*. **Medical mycology**, [s. l.], v. 51, n. 5, p. 473–482, 2013.
- JAVADPOUR, Maryam M. et al. De Novo Antimicrobial Peptides with Low Mammalian Cell Toxicity. [s. l.], 1996. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/sharingguidelines>>

- JOSEPH, B.; PRIYA, R. M. Phytochemical and biopharmaceutical aspects of *Psidium guajava* (L.) essential oil: a review. **Res J Med Plant**, [s. l.], v. 5, n. 4, p. 432–442, 2011.
- KESSLER, André; BALDWIN, Ian T. Defensive function of herbivore-induced plant volatile emissions in nature. **Science**, [s. l.], v. 291, n. 5511, p. 2141–2144, 2001.
- KHADHRI, Ayda et al. Chemical composition of essential oil of *Psidium guajava* L. growing in Tunisia. **Industrial Crops and Products**, [s. l.], v. 52, p. 29–31, 2014. a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.10.018>>
- KHADHRI, Ayda et al. Chemical composition of essential oil of *Psidium guajava* L. growing in Tunisia. **Industrial Crops and Products**, [s. l.], v. 52, p. 29–31, 2014. b. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.10.018>>
- KLINK, Carlos a. et al. A conservação do Cerrado brasileiro. **Megadiversidade**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 147–155, 2005.
- LANDRUM, Leslie R. A revision of the *Psidium salutare* complex (Myrtaceae). **SIDA, Contributions to Botany**, [s. l.], p. 1449–1469, 2003.
- LANDRUM, Leslie R. The genus *Psidium* (Myrtaceae) in the state of Bahia, Brazil. **Canotia**, [s. l.], v. 13, p. 1–101, 2017.
- MACÊDO, D. G. et al. Therapeutic traditional practices: Usage and knowledge of cerrado plants in the State of Pernambuco (Northeastern Brazil). **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas**, [s. l.], v. 14, n. 6, 2015.
- MACÊDO, D. G. et al. Versatility and consensus of the use of medicinal plants in an area of cerrado in the Chapada do Araripe. [s. l.], v. 10, n. 31, p. 505–514, 2016.
- MACHADO, M. et al. Activity of *Thymus capitellatus* volatile extract, 1,8-cineole and borneol against *Leishmania* species. **Veterinary Parasitology**, [s. l.], v. 200, n. 1–2, p. 39–49, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.11.016>>
- MALHEIROS, R. A Influência Da Sazonalidade Na Dinâmica Da Vida No Bioma Cerrado. **Revista Brasileira de Climatologia**, [s. l.], v. 12, n. 19, p. 1980–55, 2016.
- MARQUES, Francisco A. et al. Volatile oil of *Psidium cattleianum* sabine from the brazilian atlantic forest. **Journal of Essential Oil Research**, [s. l.], v. 20, n. 6, p. 519–520, 2008.
- MASOTTI, Véronique et al. Seasonal and Phenological Variations of the Essential Oil from the Narrow Endemic Species *Artemisia molinieri* and Its Biological Activities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 51, n. 24, p. 7115–7121, 2003.
- MCLAFFERTY, Fred W.; STAUFFER, D. B. Wiley registry of mass spectral data. **Mass Spectrometry Library Search System Bench-Top/PBM, version**, [s. l.], v. 3, 1994.
- MENDES, Luiza Alves et al. Spring alterations in the chromatographic profile of leaf essential oils of improved guava genotypes in Brazil. **Scientia Horticulturae**, [s. l.], v. 238, n. March, p. 295–302, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.04.065>>
- MORAIS-BRAGA, M. F. B. et al. *Psidium guajava* L. and *Psidium brownianum* Mart ex DC.: Chemical composition and anti - *Candida* effect in association with fluconazole. **Microbial Pathogenesis**, [s. l.], v. 95, p. 200–207, 2016. a.

- MORAIS-BRAGA, M. F. B. et al. Phenolic composition and medicinal usage of *Psidium guajava* Linn.: Antifungal activity or inhibition of virulence? **Saudi Journal of Biological Sciences**, [s. l.], v. 24, n. 2, 2017.
- MORAIS-BRAGA, Maria Flaviana B. et al. High-performance liquid chromatography-diodic array detector, fungistatic, and anti-morphogenical analysis of extracts from *Psidium brownianum* Mart. Ex DC. Against yeasts of the genus *Candida*. **International Journal of Food Properties**, [s. l.], 2016. b.
- MORAIS, Lilia Aparecida Salgado De. Influência Dos Fatores Abióticos Na Composição Química Dos Óleos Essenciais. **Horticultura Brasileira**, [s. l.], v. 27, n. 2, p. 4050–4063, 2009.
- MULAS, Giuliana; GARDNER, Zoë; CRAKER, Lyle E. Effect of light quality on growth and essential oil composition in rosemary. In: I INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE LABIATAE: ADVANCES IN PRODUCTION, BIOTECHNOLOGY AND UTILISATION 723 2006, **Anais...** [s.l: s.n.]
- NETO, Manoel Andrade et al. Volatile constituents of *Psidium pohlianum* Berg. and *Psidium guyanensis* Pers. **Journal of Essential Oil Research**, [s. l.], v. 6, n. 3, p. 299–300, 1994.
- NOVAES, Paula et al. Ecological phytochemistry of Cerrado (Brazilian savanna) plants. **Phytochemistry Reviews**, [s. l.], v. 12, n. 4, p. 839–855, 2013.
- OLIVEIRA, Márcio J. et al. Influence of growth phase on the essential oil composition of *Hyptis suaveolens*. **Biochemical Systematics and Ecology**, [s. l.], v. 33, n. 3, p. 275–285, 2005.
- PADOVAN, Amanda et al. The evolution of foliar terpene diversity in Myrtaceae. **Phytochemistry Reviews**, [s. l.], v. 13, n. 3, p. 695–716, 2014.
- PALHARES, D.; FRANCO, A César; ZAIDAN, Lb Penteadó. Respostas fotossintéticas de plantas do cerrado nas estações seca e chuvosa. **Revista Brasileira de Biociências**, [s. l.], v. 8, p. 213–220, 2010. Disponível em: <<http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Respostas+fotossint?ticas+de+plantas+de+cerrado+nas+esta??es+seca+e+chuvosa#0>>
- PEMMARAJU, Suma C. et al. *Candida albicans* biofilm inhibition by synergistic action of terpenes and fluconazole. [s. l.], 2013.
- PINO, Jorge A. et al. Leaf oil of *Psidium salutare* (HBK) Berg. from Cuba. **Journal of Essential Oil Research**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 19–20, 2003.
- PINTO, José Eduardo B. P. et al. Morphophysiological aspects and essential oil content in Brazilian-lavender as affected by shadowing. **Horticultura Brasileira**, [s. l.], v. 25, n. 2, p. 210–214, 2007.
- PRINS, Cláudia L.; VIEIRA, Ivo J. C.; FREITAS, Silvério P. Growth regulators and essential oil production. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, [s. l.], v. 22, n. 2, p. 91–102, 2010.
- RIBEIRO-SILVA, Suelma et al. Angiosperms from the Araripe National Forest, Ceará, Brazil. **Check List**, [s. l.], v. 8, n. 4, p. 744–751, 2012. Disponível em: <<http://www.checklist.org.br/getpdf?SL016-12>>
- RIBEIRO, Daiany Alves et al. Promising medicinal plants for bioprospection in a Cerrado area of Chapada do Araripe, Northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, [s. l.], v. 155, n. 3, p. 1522–1533, 2014.

- ROMANI, Luigina. Immunology of invasive candidiasis. In: **Candida and Candidiasis, Second Edition**. [s.l.] : American Society of Microbiology, 2012. p. 127–136.
- SANGWAN, N.S., FAROOQI, A.H.A., SHABIH, F., SANGWAN, R. S. Regulation of essential oil production in plants. **Plant Growth Regul.**, [s. l.], v. 34, n. 1, p. 3–21, 2001.
- SANTOS, Adriana et al. Determinação do rendimento e atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf em função de sazonalidade e consorciamento. **Rev Bras Farmacogn**, [s. l.], v. 19, n. 2, p. 436–441, 2009.
- SARRAZIN, Sandra Layse F. et al. Antimicrobial and seasonal evaluation of the carvacrol-chemotype oil from *Lippia origanoides* kunth. **Molecules**, [s. l.], v. 20, n. 2, p. 1860–1871, 2015.
- SIEBERT, Diogo Alexandre et al. Evaluation of seasonal chemical composition, antibacterial, antioxidant and anticholinesterase activity of essential oil from *Eugenia brasiliensis* Lam. **Natural Product Research**, [s. l.], v. 29, n. 3, p. 289–292, 2015.
- SILVA, E. A. J. et al. Chemical composition of the essential oil of *Psidium guajava* leaves and its toxicity against *Sclerotinia sclerotiorum*. **Semina: Ciências Agrárias**, [s. l.], v. 39, n. 2, p. 865–874, 2018.
- SILVA, K. V. Souza et al. Investigation of the antifungal potential of linalool against clinical isolates of fluconazole resistant *Trichophyton rubrum*. **Journal de Mycologie Medicale**, [s. l.], v. 27, n. 2, p. 195–202, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mycmed.2017.01.011>>
- SILVA, Sônia et al. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. **FEMS microbiology reviews**, [s. l.], v. 36, n. 2, p. 288–305, 2012.
- SNOUSSI, Mejdí et al. Antioxidant properties and anti-quorum sensing potential of *Carum copticum* essential oil and phenolics against *Chromobacterium violaceum*. **Journal of Food Science and Technology**, [s. l.], p. 1–9, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s13197-018-3219-6>>
- SOLIMAN, Fathy M. et al. Comparative study of the volatile oil content and antimicrobial activity of *Psidium guajava* L. and *Psidium cattleianum* Sabine leaves. **Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University**, [s. l.], v. 54, n. 2, p. 219–225, 2016. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1110093116300242>>
- SOUZA DE OLIVEIRA, L. G. et al. Chemical variability of essential oils of *Copaifera langsdorffii* Desf. in different phenological phases on a savannah in the Northeast, Ceará, Brazil. **Industrial Crops and Products**, [s. l.], v. 97, 2017.
- SOUZA, Renata Kelly Dias et al. Ethnopharmacology of medicinal plants of carrasco, northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, [s. l.], v. 157, p. 99–104, 2014.
- STEFANELLO, Maria Élide Alves et al. Composição e variação sazonal do óleo essencial de *Myrcia obtecta* (O. Berg) Kiaersk. var. *obtectata*, Myrtaceae. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 82–86, 2010.
- STOPPACHER, Norbert et al. Identification and profiling of volatile metabolites of the biocontrol fungus *Trichoderma atroviride* by HS-SPME-GC-MS. **Journal of Microbiological Methods**, [s. l.], v. 81, n. 2, p. 187–193, 2010.

- STOW, Adam; BEATTIE, Andrew. Chemical and genetic defenses against disease in insect societies. **Brain, Behavior, and Immunity**, [s. l.], v. 22, n. 7, p. 1009–1013, 2008.
- TAKAISHI, Masayuki et al. 1,8-cineole, a TRPM8 agonist, is a novel natural antagonist of human TRPA1. **Molecular Pain**, [s. l.], v. 8, 2012.
- TAKSHAK, Swabha; AGRAWAL, S. B. The role of supplemental ultraviolet-B radiation in altering the metabolite profile, essential oil content and composition, and free radical scavenging activities of *Coleus forskohlii*, an indigenous medicinal plant. **Environmental Science and Pollution Research**, [s. l.], v. 23, n. 8, p. 7324–7337, 2016.
- TAMPIERI, Maria Paola et al. The inhibition of *Candida albicans* by selected essential oils and their major components. **Mycopathologia**, [s. l.], v. 159, n. 3, p. 339–345, 2005.
- YÁÑEZ, Xiomara et al. Chemical composition of the essential oil of *Psidium caudatum* McVaugh. **Molecules**, [s. l.], v. 7, n. 9, p. 712–716, 2002.
- YAO, Xiao Hui et al. Different harvest seasons modify bioactive compounds and antioxidant activities of *Pyrola incarnata*. **Industrial Crops and Products**, [s. l.], v. 94, p. 405–412, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.08.033>>
- YAPAR, Nur. Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. **Therapeutics and clinical risk management**, [s. l.], v. 10, p. 95, 2014.

CAPÍTULO 3

Este capítulo “Avaliação da sazonalidade sobre a composição química e atividade antifúngica do óleo essencial de *Psidium myrtoides* O. Berg contra patógenos oportunistas”. Esse capítulo, tem como objetivo investigar a influência da sazonalidade de diferentes períodos de coleta na composição química do óleo essencial de *Psidium myrtoides* O. Berg sobre a atividade antifúngica.

O capítulo a seguir representa o manuscrito submetido e redigido segundo as normas estruturais e bibliográficas do periódico *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*.

Avaliação da sazonalidade sobre a composição química e atividade antifúngica do óleo essencial de *Psidium myrtoides* O. Berg contra patógenos oportunistas.

Delmacia Gonçalves de Macêdo^a, Marta Maria de Almeida Souza^a, Maria Flaviana B. Morais-Braga^a, Henrique Douglas M. Coutinho^b, Antonia Thassya L. dos Santos^a, Rafael Pereira da Cruz^a, José Galberto Martins da Costa^b, Irwin Rose Alencar de Menezes^b

^a Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Regional do Cariri, Crato, Ceará – Brasil;

^b Departamento de Química Biológica, Universidade Regional do Cariri, Crato, Ceará – Brasil

E-mail: delmaciamacedo@yahoo.com.br

Resumo

Devido a uma variedade de fatores a incidência de infecções causadas por espécies de *Candida* têm aumentado ao longo dos anos e estes microrganismos comensais têm sido reconhecidos como patógenos oportunistas, muitos dos quais resistentes a fármacos. Nesse sentido, há necessidade de identificar novas substâncias com potencial antifúngico. O presente trabalho teve como objetivo investigar a influência da sazonalidade de diferentes períodos de coleta na composição química do óleo essencial de *Psidium myrtoides* O. Berg (OEFPM) sobre a atividade antifúngica. As coletas foram realizadas pela manhã nos meses de fevereiro, maio, agosto e novembro de 2016 compreendendo o período seco e chuvoso na região. A composição química do OEFPM foi avaliada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG/MS). A atividade antifúngica intrínseca dos óleos e de sua combinação em concentração subinibitória (CFM/16) com fluconazol foi avaliada por microdiluição em caldo frente a leveduras do gênero *Candida*, enquanto a Concentração Fungicida Mínima (CFM) foi realizada por subcultivo em placas de Petri. A IC₅₀ foi determinada. O efeito sobre o pleomorfismo de *Candida albicans* foi avaliado em câmaras de microcultivo. Os óleos essenciais apresentaram rendimentos variando de 0,36 a 1,02%, com maiores valores registrados no período seco (0,96 – 1,02%), apresentando o composto 1-8 cineol como constituinte majoritário em todas as amostras. O OEFPM apresentou efeito fungistático, com CFM variando de 1.024 a ≥ 16.384 µg/mL para as diferentes linhagens de *C. albicans*, *C. krusei* e *C. tropicalis* e valores de IC₅₀ variando de 103.3 a 3564.5 µg/mL. A avaliação da associação do OEFPM com fluconazol mostrou que o produto natural é capaz de potencializar ação do fluconazol em todos os períodos de coletas contra *Candida* spp. Na análise da alteração morfológica de *C. albicans*, os óleos essenciais afetaram a transição morfológica em todas as concentrações testadas. Os resultados deste trabalho mostram que o período de coleta afetou a composição química e as atividades antimicrobianas do óleo essencial. Uma variação significativa no conteúdo da maioria dos componentes químicos e atividades biológicas das amostras coletadas sazonalmente foram documentadas, com destaque para a inibição de um importante fator de virulência do gênero, a transição morfológica.

Palavras-chave: *Psidium*; compostos químicos; variação sazonal; *Candida* spp.; inibição fitoquímica.

1. Introdução

A frequência de mortes causadas por micoses invasivas por fungos oportunistas aumentou significativamente ao longo dos anos, devido à complexidade dos quadros clínicos estabelecidos em pacientes. Portanto, as micoses oportunistas representam consideráveis desafios tanto para o diagnóstico como para o tratamento. Nos últimos anos foram identificadas mais de 17 espécies diferentes de *Candida* etiologicamente importantes, entretanto, aproximadamente 95% de todas as micoses oportunistas causada pelo gênero *Candida* são causados por quatro espécies: *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei* e *Candida parapsilosis* (Sardi et al., 2013).

O surgimento de cepas com resistência intrínseca e adquirida aos azóis e outros agentes antifúngicos comumente utilizados, representa hoje grave problema para a saúde pública em todo o mundo (Laxminarayan et al., 2013). Diante desta problemática, novas estratégias terapêuticas requerem urgência, dentre as quais destaca-se a busca de novos insumos ativos oriundos de fontes biológicas, onde moléculas, predominantemente metabólitos secundários, contribuem para a elaboração de novos medicamentos (Taylor, 2013). Em muitos casos, estes metabólitos, mesmo não apresentando atividade antifúngica por si só, podem atuar de maneira sinérgica com fármacos antifúngicos, potencializando seu efeito quando combinados ou interferindo nos mecanismos de resistência dos micro-organismos (Kalana et al., 2011).

Nos últimos anos, os óleos essenciais atraíram um grande interesse científico devido a substâncias com potencial fungicidas ou fungistáticas. Entretanto, é notório saber que a constituição genética e as condições ambientais como as condições climáticas, podem alterar o metabolismo secundário vegetal e, conseqüentemente, pode afetar o rendimento e os valores relativos de componentes do óleo essencial ao longo das estações do ano. Foram detectadas correlações entre polimorfismo químico, polimorfismo sexual e meio ambiente (Gouyon et al., 1986). Os teores de óleos essenciais podem ser influenciados por fatores abióticos e, assim sendo, o conhecimento do horário ideal para colheita das plantas, visando à obtenção de maiores teores de princípios ativos é de fundamental importância para sua comercialização e/ou uso (Silva et al., 2003).

Na literatura existem poucos dados sobre a influência da variação sazonal e seus efeitos sobre alteração química dos constituintes, principalmente sobre do óleo essencial de *Psidium myrtoides*. Entanto, na literatura há estudos que avaliam a composição química de extratos e óleos essenciais de diversas espécies do gênero *Psidium* em diferentes regiões do mundo. Quanto à sua atividade antimicrobiana, os resultados mostraram uma ampla potencialidade,

devido à grande variabilidade na presença de compostos bioativos, entre as plantas estudadas temos *Psidium guajava* no México, Tailândia e Tunísia (Padrón-Márquez et al., 2012; Khadhri et al., 2014), *Psidium cattleianum* no Brasil (Medina et al., 2011), *Psidium acutangulum* na Guiana Francesa (Houël et al., 2016) e *Psidium sartorianum* no México (Camacho-Hernandez et al., 2004).

Neste contexto, temos *Psidium myrtoides* O. Berg (Myrtaceae), conhecida popularmente como “araçá de veado” apresenta até sete sinônimos, dentre estes: *Guajava myrsinoides*, *Guajava myrtoides* e *Psidium myrsinoides* (The plant list, 2016). A espécie encontra-se distribuída nos estados de Goiás, Bahia, Mato Grosso, Minas Gerais, Tocantins, Ceará, Maranhão, no cerrado brasileiro e em áreas de encosta (Frazon et al., 2009). Na medicina tradicional as folhas de *P. myrtoides*, são utilizadas para o tratamento de enfermidades, dentre as quais se pode citar diarreia e disenteria, sintomatologias que podem estar associadas a infecções por *Candida* spp., além de inflamações em geral (Souza e Felfili, 2006; Macêdo et al., 2016). Assim, este trabalho tem como objetivo verificar a influência dos períodos de coleta na composição química e na atividade antifúngica e moduladora de *P. myrtoides*, bem como seu efeito na micromorfologia fungica de *Candida albicans*.

2. Material e Métodos

2.1 Coleta do material vegetal

As amostras foram coletadas em uma área de Cerrado *sensu stricto*, localizado na Fazenda Barreiro Grande (latitude: 7°21'41,7''S e longitude 39°28'42,4''W, altitude de 909 m acima do nível do mar), situada na Chapada do Araripe, Ceará, Nordeste do Brasil. As coletas foram realizadas entre 8h30min e 9h30min da manhã, nos meses de fevereiro, maio, agosto e novembro de 2016 compreendendo o período seco e chuvoso na região. O material coletado em campo foi acondicionado em sacos plásticos, em seguida armazenado em câmara fria (10 ° C, 50% de umidade relativa) até a extração de óleo essencial. A espécie foi identificada pelo botânico Dr. Marcos Sobral (especialista na família Myrtaceae) e depositada no Herbário Caririense Dárdano de Andrade-Lima da Universidade Regional do Cariri – URCA, respectivamente sob o número 12600, HCDAL. Sob a autorização do ICMBio (n°50362-2).

2.2 Obtenção do óleo essencial e condições de análise de GC-MS

As folhas frescas coletadas (cerca de 400g por indivíduo) foram submetidas ao processo de hidrodestilação por duas horas no aparelho do tipo Clevenger. A mistura óleo-água foi separada, fração oleosa foi coletada e tratada com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4). Os óleos essenciais foram mantidos sob temperatura de refrigeração em frasco ambar até serem analisados ou utilizados nos ensaios biológicos.

A análise dos compostos químicos do óleo essencial de *P.myrtoides* foi realizada utilizando uma série Shimadzu GC-MS QP2010 equipada com uma coluna capilar de sílica fundida Rtx-5MS (30m × 0,25mm ID, 0,25 m) e temperatura programada como segue: 60-240 °C em 3 °C/min, depois a 280 °C a 10 °C /min, terminando com 10 min a 280 °C. O gás transportador estava a uma taxa de fluxo de 1,5 mL/min e o modo de divisão tinha uma proporção de 1:50. A porta de injeção foi ajustada a 220 °C. Parâmetros operacionais de quadripolo significativos de MS: temperatura da interface 240 °C; ionização de impacto de elétrons a 70 eV com faixa de massa de varredura de 40-350 m/z a uma taxa de amostragem de 1,0 varredura/s. Volume injetado: 1 µl de solução 5 µg / mL em diclorometano. Os constituintes foram identificados por pesquisa de computador usando bibliotecas digitais de dados espectrais de massa (NIST 08) e por comparação de seus autênticos espectrômetros de massa (Adams, 2001).

2.3 Ensaios antifúngicos

2.3.1 Microrganismos, meios de cultura e inóculos

Para a avaliação da atividade antifúngica foram utilizadas três linhagens padrão do gênero *Candida*, sendo estas: *C. albicans* – CA INCQS 40006, *C. Tropicalis* – CT INCQS 40042 e *C. Krusei* – CK INCQS 40095, obtidas da Coleção de Culturas Oswald Cruz do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS). Todas as linhagens foram inoculadas em Agar Sabouraud Dextrose (ASD – KASVI) e incubadas a 37 ° C, durante 24 h. A partir destas, foram preparadas suspensões dos microrganismos em tubos contendo 3 mL de solução estéril (NaCl a 0,9 %). A concentração de inóculo foi padronizada de acordo com a escala de McFarland, comparando a turbidez do inóculo com o padrão 0,5 na escala equivalente a concentração do 10^5 células por mL. Para análise da morfologia fúngica foi utilizado o meio *Potato Dextrose Agar* (PDA), adquirido da Difco[®], empobrecido por diluição e acrescido de

ágar. Os meios foram solubilizados com água destilada e esterilizados em autoclave, a 121 °C por 15 minutos.

2.3.2 Drogas e reagentes

O antifúngico fluconazol (CIMED®) e óleo foram previamente diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO - Dinâmica) e, acrescentado água destilada estéril com a finalidade de obter a concentração desejada para a realização dos testes (16.384 µg/mL).

2.3.3 Determinação da IC₅₀ e curva de viabilidade celular do óleo essencial de *Psidium myrtoides*

As diferentes amostras do óleo essencial provenientes das coletas periódicas de *P. myrtoides* foram testadas quanto a sua atividade antifúngica, através da determinação da IC₅₀ em DMSO e posteriormente em água estéril e em seguida foram microdiluído em Caldo Sabouraud Dextrose (ASD) em concentrações seriadas variando de 8192 a 8 µg/mL em placas de 96 poços (Ellof, 1998; Morais-Braga et al, 2017 com modificações). Em cada poço da placa foi adicionado 100 µL do meio líquido CSD duplamente concentrado. Para distribuição na placa de microdiluição foram preparados tubos eppendorf® contendo cada um deles com 1,5 mL de solução contendo 1350 µL de ASD duplamente concentrado e 150 µL da suspensão fúngica. A placa foi preenchida no sentido numérico adicionando-se 100 µL desta solução em cada poço e em seguida procedendo-se a microdiluição seriada com a solução de 100 µL do produto natural até o penúltimo poço, sendo que o último serviu de controle de crescimento (Morais Braga et al., 2016 com modificações), foram feitos controles de esterilidade do meio e de diluição do óleo essencial e do fluconazol.

A concentração de DMSO nas concentrações de óleo variou de 5 a 0,004%. As placas foram levadas à estufa por 24 h a 37 °C e após este período foi feita a leitura em aparelho de espectrofotometria de ELISA (Termoplate®). Os resultados obtidos na leitura de ELISA foram utilizados para construir a curva de viabilidade celular e a IC₅₀ (Morais-Braga et al., 2017). Todos os resultados foram realizados em triplicata.

2.3.4 Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM)

Em cada poço da placa do teste da CFM, foi adicionada uma haste estéril, que após homogeneizar o meio contido na cavidade, foi subcultivada em placa de *Petri* contendo SDA, através da transferência de uma pequena alíquota da solução teste (meio + inóculo + produto

natural) para verificação de viabilidade celular. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas, e verificadas quanto ao crescimento ou não de colônias de *Candida*. A CFM foi definida como a menor concentração capaz de inibir o crescimento de colônia fúngica frente ao produto natural (Ernst et al., 1999 com modificações).

2.4 Efeito modulador do óleo de *P. myrtooides* na atividade antifúngica associada ao fluconazol

Para o teste, a solução contendo óleo essencial foi avaliada em concentração sub-inibitória (CFM/16) em associação com o fluconazol. O volume de 100 µL de uma solução contendo CSD, 10% inóculo e produto natural foram distribuídos em cada poço. Em seguida, 100 µL de cada antifúngico, individualmente, foi misturado ao primeiro poço, procedendo a microdiluição em série, numa proporção de 1:1 até a penúltima cavidade a última cavidade foi usada para controle de crescimento fúngico. Os valores de concentrações do antifúngico (Fluconazol) variaram gradualmente de 8.192 a 8 µg/mL (Morais- Braga et al., 2016 com modificações). Foram utilizados controles de diluição dos produtos naturais, onde o inóculo foi substituído por salina, e o controle de esterilidade do meio. A leitura foi feita em espectrofotometro, com comprimento de onda de 630 nm, ELISA Termoplate® (Morais-Braga et al., 2017).

2.5 Efeito sobre a morfologia de *Candida albicans*

Para se observar as alterações morfológicas, os testes foram realizados apenas para *Candida albicans* – CA INCQS 40006, onde o óleo foi testado em diferentes concentrações, tais como a Concentração Superior Avaliada - CSA (8192 µg/mL), CSA/4 (2.048 µg/mL) e CSA/16 (512µg/mL). A técnica empregada foi a de microcultivo de leveduras, utilizando o meio *Potato Dextrose Agar* - PDA empobrecido em câmaras úmida. Na lâmina de microscopia foram vertidos três mL do meio, associado ao produto testado, nas respectivas concentrações, anteriormente homogeneizado pelo agitador. Após a solidificação do meio, foi semeada a levedura com ajuda de uma alça calibrada de 1 µL e traçadas 02 estrias paralelas. As estrias foram cobertas com lamínulas estéreis. As placas foram incubadas, após 24 horas, as lâminas sendo posteriormente observadas em microscópio óptico em objetiva de 40x. Os testes foram realizados com algumas alterações de acordo com Sidrim e Rocha (2010).

2.6 Análises estatísticas dos testes microbiológicos

Todos os testes foram realizados em triplicatas, sendo aplicados para cada amostra a análise de variância ANOVA *one-way* com teste de Tuckey. Os valores da IC₅₀ foram computados por regressão linear para interpolação em curvas padrão relacionando o percentual (%) de valores de crescimento e a concentração do produto em µg/mL utilizando software *Graphpad Prism*, versão 6.0.

3. Resultados e Discussão

3.1 Análise da composição química

Os teores de óleo essencial de *Psidium myrtoides*, obtidos nos diferentes meses de coleta apresentaram os maiores rendimentos para o período do verão (0,96 – 1,02%), decaindo no inverno, atingindo valores entre 0,36 – 0,48% (Tabela 1). No entanto, houve diferenças notáveis nos rendimentos e nas quantidades de vários compostos comparando período de verão e inverno. Há uma correlação inversamente proporcional ao rendimento e a pluviosidade (Pearson $r = -0.86$). Indivíduos desta espécie se adaptam a diversos tipos de clima e solo geralmente em altitudes 400-800 m acima do nível do mar, são capazes de resistir a longos períodos de seca, o que permite maior desenvolvimento. No mês de novembro *P. myrtoides* teve um alto teor de óleo essencial (1,02 mL/400 g de folhas frescas) coincidindo com o período seco, sugerindo que existe um ótimo momento para a colheita. Pode-se observar que a intensidade luminosa é um fator predominante que influencia diretamente na concentração dos óleos essenciais. Parte disso se deve pela maneira que a radiação solar intervém diretamente sobre o crescimento e o desenvolvimento da planta e, indiretamente pelos efeitos no regime térmico, sendo fundamental à produção de fitomassa (De Moraes, 2009; Barbosa et al., 2012).

Tabela 1. Meses de amostragem, rendimento e média das condições meteorológicas.

Amostra/Estação do Ano	Número da coleta	Mês de coleta	Rendimento (%)	Chuva acumulada (mm) (Média anual: 968.0)
OEFPm/Inv	1	Fev	0,48	49
OEFPm/Inv	2	Mai	0,36	145
OEFPm/Ver	3	Ago	0,96	0
OEFPm/Ver	4	Nov	1,02	1,8

OEFPm: Óleo essencial das folhas de *Psidium myrtoides*, 1,2,3,4 coleta; Inv: inverno, Ver: verão.

A análise cromatográfica (CG-EM) dos óleos essenciais (OE) extraídos das folhas de *P. myrtooides* permitiu a identificação de 33 compostos, perfazendo em média, 93,64% da composição do óleo essencial (Tabela 2). Esses óleos são ricos em monoterpenos (β -pineno, α -terpineol) e sesquiterpenos (elemol, α -eudesmol, γ -eudesmol), em média observa-se uma predominância de monoterpenos oxigenados (49,7%), sesquiterpenos oxigenados (29,8%), monoterpeno hidrocarbonetos (5,03%) e sesquiterpeno hidrocarboneto (2,37%).

Um total de 33 compostos foram identificados no OE das folhas durante a estação chuvosa e 24 durante a estação seca. O composto 1,8-Cineol (27,85- 48,11 %), foi o composto majoritário em todas as amostras analisadas, seguido do α -eudesmol (11,7-18,2%), elemol (3,32-6,0%) e α -pineno (5,01-12,08%). Outros compostos encontrados na estação chuvosa foram o viridifloreno (0,89 - 1,02%), viridiflorol (0,64-0,67%), α -muroleno (0,24- 0,90%), β -cariofileno (0,25-0,43%) e δ -cadineno (0,22-1,20%), e na estação seca, α -pineno (6,08-18%), β -pineno (4,73-8,60%) e α -amorfenol (0,19-0,46%), entre outros. As concentrações dos componentes menores também variaram periodicamente.

Tabela 2. Composição química dos óleos voláteis obtidos das folhas de *Psidium myrtooides* por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (CG/EM) nas duas estações do ano.

Compostos	TR* (min)	OEFPm1 (Inv)	OEFPm2 (Inv)	OEFPm3 (Ver)	OEFPm 4 (Ver)	% (média)
1,8-Cineol	5,5	30,1	27,8	29,5	48,1	34,3
10-12- ácido Pentacosadiynoic acetato de mirtenilo	14,7	0,90	0,27	0,0	0,0	0,29
Copaeno	10,0	0,13	0,07	0,0	0,0	0,05
Elemol	13,7	6,00	6,72	4,09	3,32	8,45
Espatuleno	14,1	2,94	3,27	2,47	1,97	2,66
Germacreno D	12,1	0,17	0,23	0,18	0,0	0,14
Limoneno	5,4	1,34	1,24	1,68	1,84	1,52
Linalool	6,6	0,46	0,25	0,24	0,0	0,23
Mirtenal	8,4	0,38	0,19	0,37	0,36	0,32
Óxido de cariofileno	14,3	2,50	2,74	1,93	1,43	2,15
p-Cimeno	5,3	0,41	0,15	0,16	0,57	0,32
Pinocarveol	7,4	0,42	0,19	0,32	0,48	0,35
Pinocarvone	7,8	0,14	0,0	0,15	0,0	0,07
Terpineol	8,0	1,61	0,53	1,12	0,70	1,00
Viridifloreno	15,3	0,89	1,02	0,0	0,0	0,47
Viridiflorol	14,6	0,64	0,67	0,0	0,0	0,32

Compostos	TR* (min)	OEFPm1 (Inv)	OEFPm2 (Inv)	OEFPm3 (Ver)	OEFPm 4 (Ver)	% (média)
α -amorfenol	12,9	0,15	0,36	0,19	0,46	0,29
α -calacoreno	13,6	0,10	0,14	0,0	0,0	0,06
α -eudesmol	15,5	18,2	20,0	13,0	11,7	15,7
α -muroleno	13,1	0,24	0,90	0,0	0,0	0,28
α -pineno	3,8	8,14	5,01	6,08	12,8	8,0
α -terpineol	8,3	2,95	3,15	1,12	3,29	2,62
β -bourboneno	11,3	0,33	0,0	0,16	0,0	0,12
β -cariofileno	11,9	0,43	0,25	0,0	0,0	0,17
β -cubebeno	12,0	0,60	1,12	0,67	0,0	1,88
β -mirceno	4,6	0,22	0,15	0,18	0,0	0,13
β -pineno	4,5	5,75	4,15	4,73	8,60	5,80
γ -cadineno	11,2	0,11	0,22	0,88	0,0	0,30
γ -eudesmol	15,1	4,60	5,82	2,94	2,49	3,96
γ -muuroleno	13,1	0,23	0,26	0,0	0,0	0,12
δ -cadineno	13,2	1,20	0,22	0,0	0,0	0,35
δ -cadinol	15,2	2,93	2,65	1,08	0,0	1,66
Hidrocarbonetos monoterpeno		5,48	4,88	3,61	6,18	5,03
Hidrocarbonetos sesquiterpeno		7,35	7,01	3,13	0,0	4,37
Monoterpenos oxigenados		46,4	40,0	42,0	70,5	49,7
Sesquiterpenos oxigenados		35,1	39,0	24,4	21,0	29,8
Outros		1,28	0,84	0,19	0,46	0,69
Total		95,5	91,5	73,4	98,1	

*TR = Retenção de tempo, OEFPm: óleo essencial das folhas de *Psidium myrtilodes* 1ª coleta (fevereiro), 2ª coleta (maio), 3ª coleta (agosto) e 4ª coleta (novembro).

A variação na composição química pode estar relacionada à diferentes estágios de desenvolvimento da planta e aos fatores ambientais decorrentes de variações sazonais (Padalia et al., 2014). A estação do ano e até o número de horas de luz solar pode influenciar a variabilidade química da planta, e alguns compostos podem ser acumulados em um determinado período para responder às mudanças ambientais (Verma et al., 2010). Os compostos 1,8-Cineol, α -pineno e β -pineno componentes majoritário no presente artigo, também tiveram suas concentrações variando com a estação do ano para o óleo essencial das folhas de *Cymbopogon winterianus* Jowitt, onde observa-se que a estação afetou efetivamente sua composição química, mas o período da colheita teve apenas uma pequena influência sobre a composição do óleo essencial (Blank et al., 2007).

A maior concentração de 1,8-cineol foi observada no quarto período de coleta (período seco) ocorrendo um aumento significativo nos teores de monoterpenos oxigenados na amostra. Em estudos realizados com outras espécies de *Psidium*, observou-se a presença das mesmas classes de metabolitos secundários, em folhas de *Psidium guajava* (1,8-Cineol 13,31%), *Psidium guyanensis* (α -pineno 13,9%, 1,8-cineol 40,5%, β -pineno 8.6%), *Psidium pohlianum* (1,8-cineol 63,3%, α -eudesmol 8,8%, α -pineno 3,8%) e *Psidium cattleianum* (1,8-cineol 16,4%) (Pinho et al., 2014; Neto et al., 2011; Marques et al., 2011), corroborando com os achados no presente estudo. Embora não haja um padrão definido, é possível perceber que a ocorrência de terpenos é preferencial no gênero, visto que praticamente não são descritos fenilpropanoides.

3.2 Atividade antifúngica de *Psidium myrtooides*

Para os resultados da curva de viabilidade celular dos microrganismos em contato com diferentes concentrações de óleo essencial, observou-se efeito fungistático, exibindo acentuada redução na porcentagem de microorganismos viáveis com IC₅₀ (Capacidade de Inibir 50% das células) variando de 103,3 a 3564,5 μ g/mL (Tabela 3). Os menores valores registrados para *C. albicans* e *C. tropicalis* se deu no período seco com IC₅₀ 103,3 e 1333,5 μ g/mL, respectivamente, onde 70,5% da amostra estava composta por monoterpenos oxigenados como 1,8-cineol, α -pineno e β -pineno (Figura 1A e 1C), entretanto, para *C. krusei* o menor valor de IC₅₀ foi de 1235,9 μ g/mL, coincidindo com o período chuvoso, onde também há maiores concentrações de 1,8-cineol e α -eudesmol na amostra (Figura 1E e Tabela 3).

Tabela 3. Concentração Fungicida Mínima do óleo essencial de *Psidium myrtooides* sobre estirpes de *Candida* (μ g/mL) e IC₅₀ (μ g/mL).

Produtos Testados	Cepas					
	CA INCQS 40006		CT INCQS 40042		CK INCQS 40095	
	CFM μ g/mL	IC ₅₀ μ g/mL	CFM μ g/mL	IC ₅₀ μ g/mL	CFM μ g/mL	IC ₅₀ μ g/mL
Fluconazol (FCZ)	8,192	16,7	\geq 16,384	19,0	\geq 16,384	271,3
OEFPm 1	2,048	383,1 ^a	\geq 16,384	2535,1 ^c	8,192	1435,5 ^a
OEFPm 2	4,096	963,8 ^c	\geq 16,384	2233,6 ^c	\geq 16,384	1235,9 ^a
OEFPm 3	4,096	625,6 ^b	\geq 16,384	1333,5 ^a	8,192	1967,9 ^b
OEFPm 4	1,024	103,3 ^a	\geq 16,384	1671,1 ^a	\geq 16,384	3564,5 ^c

OEFPm: Óleo essencial das folhas de *Psidium myrtooides*, 1,2,3,4 coleta; CA: *Candida albicans*; CT: *Candida tropicalis*; CK: *Candida krusei*; INCQS: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. Os resultados são expressos como média de três determinações. Médias seguidas por letras diferentes diferem pelo teste de Tukey com $p < 0,05$ versus fluconazol.

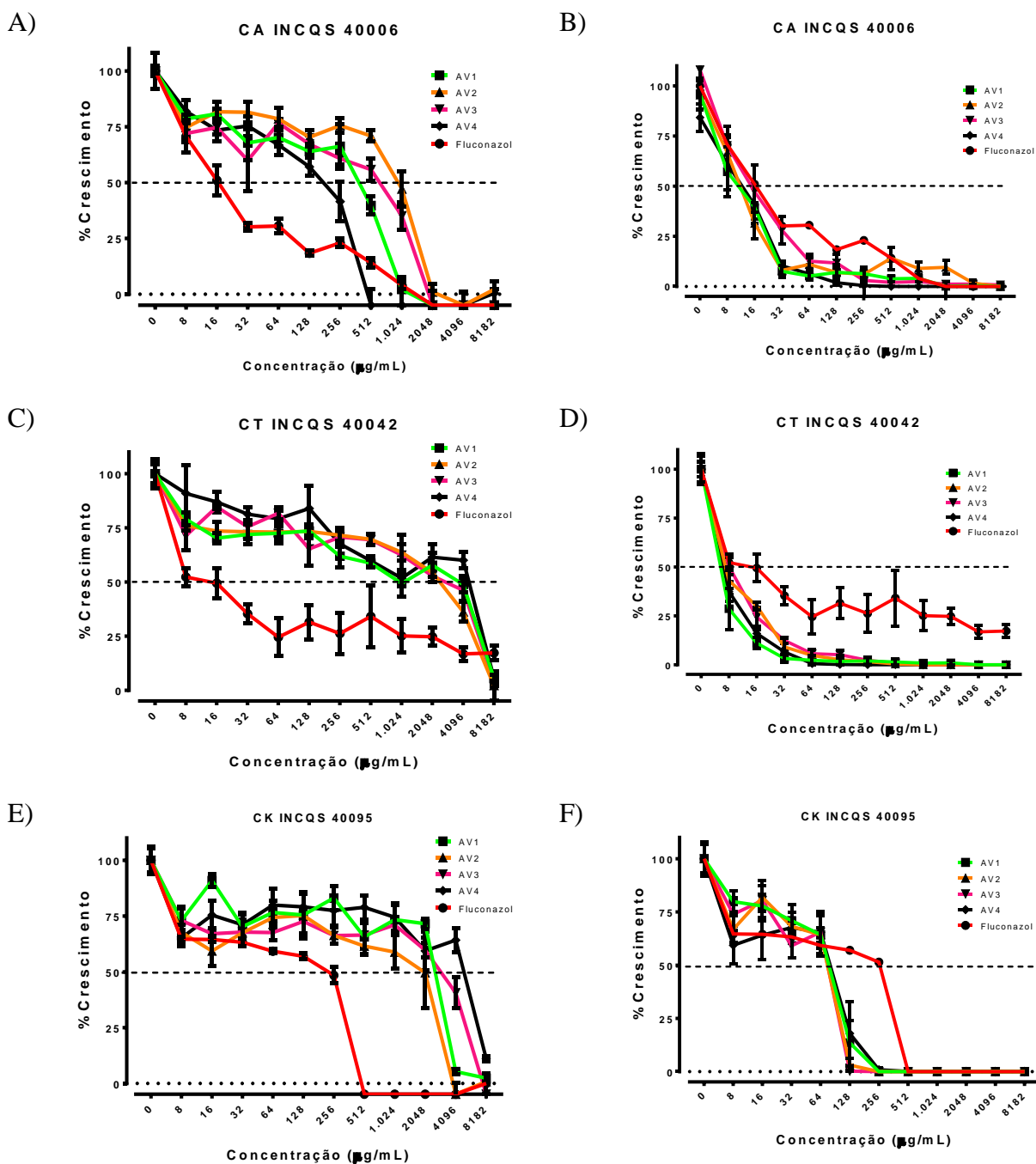
De acordo com a literatura já se tem estudos que relatam a ação deste composto na atividade antifúngica. O óleo essencial de *Romarinus officinallis*, rico em verbenona, cânfora e 1,8-cineol, exibiu atividade antifúngica sobre *Candida albicans* em concentrações a partir de 2,5µl/ml (Cleff et al., 2012). Na espécie *Ocimum gratissimum* (Linn.), o eugenol e o 1,8-cineol, foram os constituintes majoritário do seu óleo essencial e, o provável responsável, pela sua atividade antifúngica sobre cepas de *Candida*, sendo capaz de reduzir a taxa de crescimento das cepas de *Candida* a partir de quatro horas de exposição, além de ter modulado positivamente a atividade do cetoconazol para *C. tropicalis* ATCC 13803 (Oliveira et al., 2016).

A atividade antifúngica intrínseca do óleo essencial de *P.myrtoides* não apresentou atividade clinicamente relevante, com concentração fungicida mínima (CFM) de 1,024 a 8,192 µg/mL, com exceção de *C. albicans* na quarta coleta onde o produto natural apresentou uma forte atividade (Sartoratto et al., 2004) com CFM de 512 µg /mL. Quando em associação, a droga antifúngica apresentou uma interação sinérgica, para *C. albicans* e *C. tropicalis* com ponto de corte de 32 e 64 µg/mL quando comparado ao ponto de corte do fluconazol de 64 µg/mL (NCCLS, 2002), alterando o fenótipo da levedura de resistente a sensível ao fluconazol.

Na Concentração Fungicida Mínima intrínseca (CFM) os resultados demonstraram que houve uma variação química na composição dos óleos essenciais entre períodos seco e chuvoso, influenciando a concentração (tabela 3) para *C.albicans* e *C. krusei*, no entanto para *C. Tropicalis* as concentrações mantiveram-se constante. Observa-se que o período de transição entre a coleta 1 e 4, houve uma maior sensibilidade para CA INCQS 40006 com CFM $\geq 1,024$ µg/mL corroborando com as maiores concentrações do composto 1,8 cineol. E para CK INCQS 40095, as concentrações variaram de 8,192 a $\geq 16,384$ µg/mL. Diante das concentrações testadas, o produto natural não apresentou efeito fungicida, mas reduziu a população de microrganismos de *Candida*. Pimentel et al. (2018) também encontraram variação sazonal nos componentes do óleo de *Aniba rosaeodo*, onde o período de coleta afetou a atividade antifúngica dos óleos essenciais coletados durante a estação chuvosa, apresentando maior atividade do que quando coletados durante o período seco.

De acordo com Pereira et al., (2011) os óleos essenciais inibem ou reduzem o crescimento micelial devido à ação das substâncias presentes em sua composição. Essa atividade é atribuída à presença dos compostos fenólicos e terpenóides que compoem sua estrutura (Gilles et al., 2010). Essas substâncias podem afetar a integridade das membranas celulares e conseqüentemente suas estruturas.

Figura 1. Curva de viabilidade celular e IC₅₀ do óleo essencial de *Psidium myrtiloides* (A, C e E) e óleo em associação com fluconazol a (B, D e F) frente a diferentes estirpes de *Candida* spp., em diferentes períodos de coleta



No intuito de avaliar os possíveis efeitos de sinergismo, ensaios de modulação foram realizados. Os valores de IC₅₀ (Tabela 4) evidenciaram que todos os óleos combinados de *P. myrtiloides* apresentaram concentrações inibitórias menores em comparação com o obtido para o fluconazol isolado, indicando que o produto testado potencializa a ação antifúngica do fármaco contra as leveduras CA INCQS 40006, CT INCQS 40042 e CK INCQS 40095. O óleo

essencial exibiu efeito modulador em todos os períodos de coleta para *C. albicans* (IC₅₀: 11,8 a 16,3 µg/mL), *C. tropicalis* (IC₅₀: 6,4 a 7,7 µg/mL) e *C. krusei* (IC₅₀: 61,5 a 82,9 µg/mL) confirmando um efeito sinérgico.

Há um interesse clínico no uso de combinações de produtos naturais e agentes antimicrobianos para melhorar o espectro da atividade do medicamento (Kumar et al., 2012). No entanto, a seleção de uma combinação adequada requer uma compreensão do potencial da interação entre os agentes antimicrobianos, podendo representar um benefício terapêutico com a redução da dosagem do antifúngico (Jackson et al., 2009).

Na CFM, não foi observada atividade significativa para as linhagens de *Candida*, o produto natural quando associado se mostrou indiferente, exibindo efeito apenas em elevadas concentrações para CA INCQS 40006 (4,096 a 16,384 µg/mL), não apresentando alteração do efeito para CT INCQS 40042 (≥16,384 µg/mL) e somente para CK INCQS 40095 (2,048 µg/mL) a combinação com o fármaco produziu um menor valor de CFM (tabela 4). O óleo essencial apresentou melhor atividade quando utilizado sozinho, do que quando associado exibindo sinergia principalmente para *C. albicans*.

Diferentes mecanismos bioquímicos contribuem para a resistência a drogas nos fungos, o mais comum deles envolve a modificação na membrana plasmática diminuindo a permeabilidade ou a captação da droga, alterações estruturais no sítio alvo e um aumento no efluxo das drogas ou modificação nos níveis intracelulares dos alvos (Deising et al., 2008). Estes mecanismos, geralmente não atuam isoladamente e sim em conjunto (Nazzaro et al., 2013).

Tabela 4. Modulação do óleo essencial de *Psidium myrtooides* sobre estirpes de *Candida* (µg/mL) e IC₅₀ (µg/mL).

Produtos Testados	Cepas					
	CA INCQS 40006		CT INCQS 40042		CK INCQS 40095	
	CFM µg/mL	IC ₅₀ µg/mL	CFM µg/mL	IC ₅₀ µg/mL	CFM µg/mL	IC ₅₀ µg/mL
Fluconazol (FCZ)	8,192	16,7	≥16,384	19,8	≥16,384	283,8
OEFPm 1+FCZ	≥16,384	11,8 ^a	≥16,384	6,4 ^a	2,048	82,9 ^a
OEFPm 2+FCZ	4,096	16,3 ^a	≥16,384	7,5 ^a	4,096	75,2 ^a
OEFPm 3+FCZ	4,096	15,0 ^a	≥16,384	7,7 ^a	8,192	67,6 ^a
OEFPm 4+FCZ	8,192	13,5 ^a	≥16,384	6,8 ^a	4,096	61,5 ^a

OEFPm: Óleo essencial das folhas de *Psidium myrtooides*, 1,2,3,4 coleta; CA: *Candida albicans*; CT: *Candida tropicalis*; CK: *Candida krusei*; INCQS: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. Os resultados são expressos como média de três determinações. Médias seguidas por letras diferentes diferem pelo teste de Tukey com p <0,05 versus fluconazol.

Atualmente diversos estudos têm evidenciado o efeito dos óleos essenciais de plantas em teste antifúngicos. O óleo essencial obtido das folhas de *Lippia sidoides* Cham., bem como o seu composto majoritário timol, apresentou potencial antiúngico expressivo com relevância clínica para todas as cepas de *Candida*, causando inclusive efeito fungicida, causando também alterações morfológicas nas células fúngicas (Brito et al., 2015). O óleo essencial das folhas de *Psidium cattleianum* Sabine é biologicamente ativo de maneira dose dependente contra *Candidas* spp., testadas em estado planctônico, controlando também a progressão do biofilme e causando sua desestruturação (Buso-Ramos, 2017). O óleo essencial de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) também apresenta capacidade de interferir na eficácia anti-*Candida* de alguns antifúngicos clinicamente utilizados, principalmente itraconazol e cetoconazol (Oliveira et al., 2007). A utilização de plantas medicinais e/ou derivados em associação com drogas industrializadas ainda é um amplo campo de pesquisa que precisa ser explorado com o intuito de se descobrir a ocorrência e as formas pelas quais os produtos vegetais podem interferir no tratamento de doenças antimicrobianas.

3.3 Avaliação da alteração micromorfológica de *Candida albicans*

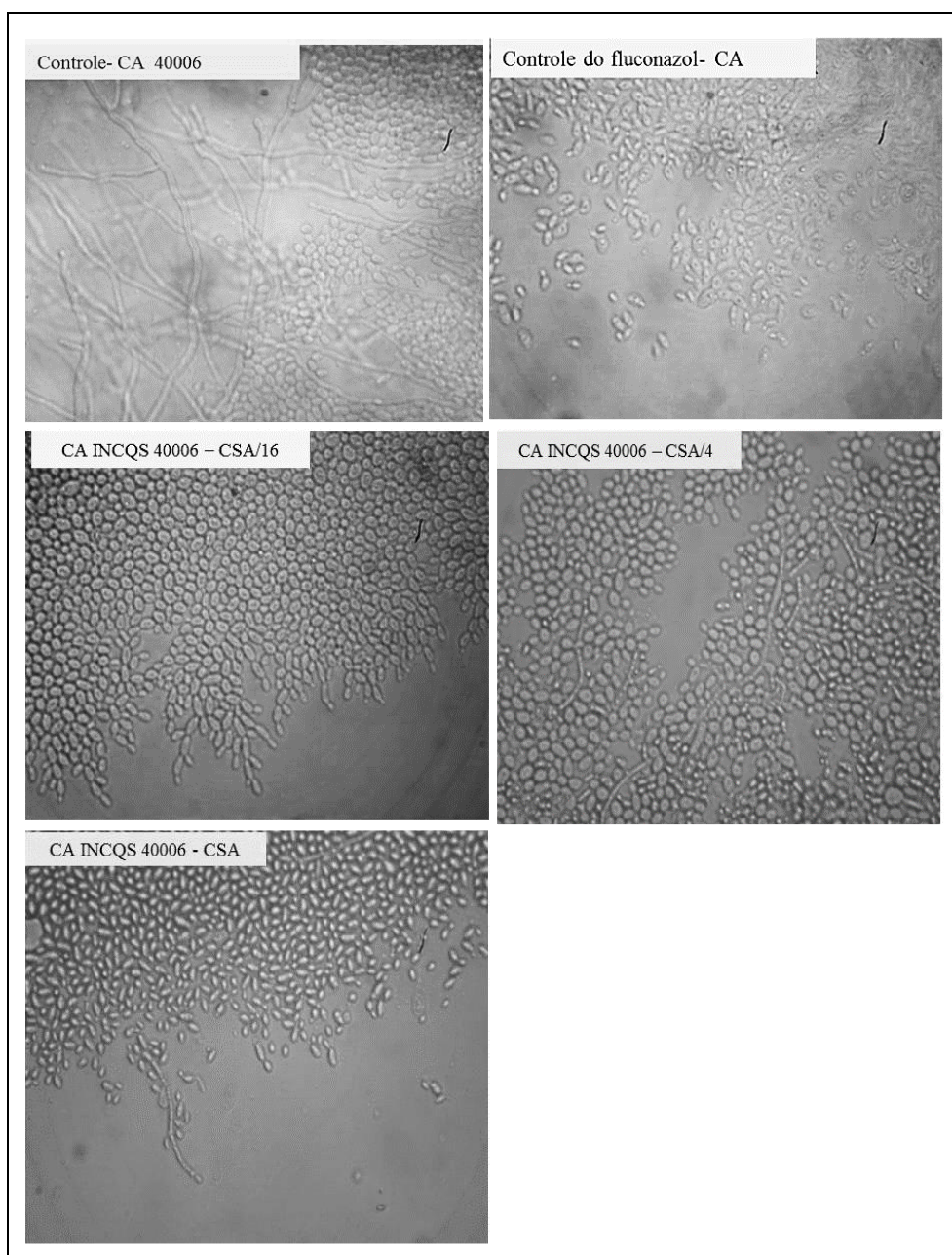
Em relação á interferência do óleo essencial sobre a micromorfologia fúngica, a cepa *C. albicans* (INCQS 40006) foi selecionada para o teste por ser o principal agente identificado nas infecções superficiais ou invasivas, e a mais prevalente dentro do gênero (Badiee e Alborzi, 2011). Podemos observar que *Candida albicans* é um fungo dimórfico, com capacidade de se adaptar e se proliferar com facilidade ao ambiente, possuindo uma série de fatores de virulência que permite a sobrevivência desse microrganismo no ambiente em que ele se encontra (Tsang et al., 2012). Nesse caso, quando cultivadas em meio de cultura acrescido do óleo essencial das folhas de *Psidium myrtoides* nas concentrações 512, 2,048 e 8,192 µg/mL observa-se uma redução significativa da formação das estruturas filamentosas, influenciando assim na progressão da transição morfológica. Por esta razão, as alterações foram bastante semelhantes em todas as concentrações, entretanto, pode se observar que há uma tendência do efeito diretamente proporcional à concentração (Figura 2).

Os mecanismos de ação do óleo essencial permitem interação com estruturas lipídicas, aumentando a permeabilidade celular e provocando danos irreversíveis à célula (Nascimento et al., 2007). Monoterpenos e terpenoides são substâncias que possuem efeito antifúngico comprovado. Devido à alta hidrofobicidade dos monoterpenos, seus efeitos tóxicos na

membrana celular fúngica resultam em sua expansão, fluidez e permeabilidade, além de causar inibição da respiração e mudanças no processo de transporte de íons (Turina et al., 2006).

Considerando os resultados obtidos ao longo do estudo, pode-se mencionar que embora a espécie *P.myrtoides* não tenha sido amplamente estudada, tem potencial para ser usado como agente modulador e pode interferir na diminuição dos fatores de virulência de *C. albicans*. Desta forma, podemos ressaltar a importância de estudos iniciais para determinar as atividades biológicas presentes em compostos químicos para que possam ser úteis como base para novos estudos, como o isolamento de compostos possivelmente responsáveis por atividades biológicas.

Figura 2. Controle utilizado no teste micromorfológico e efeito do óleo de *Psidium myrtoides* sobre o dimorfismo de *Candida albicans*.



Cultura em meio *Potato Dextrose Agar* empobrecido, com visualização em objetiva de 40x. efeito do fluconazol (2,048 µg/mL); CA: *Candida albicans*; INCQS: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. Concentrações CSA/16, CSA/4, CSA (512, 2,048 e 8,192 µg/mL, respectivamente).

4. Conclusão

Dos 33 compostos identificados, o 1,8-Cineol foi o componente majoritário nas amostras em todos os períodos coletados. Os teores de óleo essencial de *Psidium myrtoides*, apresentaram os maiores rendimentos no período do verão decaindo no inverno, sugerindo que existe um ótimo momento para a colheita. Na atividade antifúngica, os óleos essenciais das folhas de *P. myrtoides* mostrou fraca atividade em relação às cepas testadas, no entanto na associação com o antifúngico comercial houve uma potencialização do efeito do fluconazol para a cepa *C. albicans* durante todos os períodos analisados, exibindo uma alteração fenotípica da levedura tornando-se sensível ao fluconazol. Na análise da morfologia fúngica, *P. myrtoides* apresenta capacidade de interferir na transição morfológica relacionada aos processos infecciosos invasivos e de resistência relacionado à *C. albicans*. Desta forma, considerando a importância medicinal e a ausência de estudos com *Psidium myrtoides*, os resultados apresentados podem ser um ponto de partida para novos ensaios *in vivo* para o possível desenvolvimento de novas terapias complementares.

Referências

Adams, R.P. (2001). *Identification of Essential Oils Components by Gas Chromatography/Quadruple Mass Spectroscopy*. Allured Publishing Corporation, Carol Stream. 455 p.

Badiee, P., Alborzi, A. (2011). Susceptibility of clinical *Candida* species isolates to antifungal agents by E-test, Southern Iran: a five year study. *Iranian Journal of Microbiology*, 3, 183-8.

Barbosa, P., Medeiros, R. S., Sampaio, P. T., Vieira, G., Wiedemann, L. S., Veiga-Junior, V. F., 2012. Influence of abiotic factors on the chemical composition of copaiba oil (*Copaifera multijuga* Hayne): soil composition, seasonality and diameter at breast height. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 23, 1823-1833.

Blank, A. F., Costa, A. G., Arrigoni-Blank, M. F., Cavalcanti, S. C. H., Alves, P. B.; Innecco, R., Ehlert, P. A. D., Sousa, I. F. (2007). Influence of season, harvest time and drying on Java citronella (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) volatile oil. *Revista brasileira de farmacognosia*, 17, 557-564.

Brito, D.I.V., Morais-Braga, M.F.B., Cunha, F.A.B., Albuquerque, R.S., Carneiro, J.N.P., Lima, M.S.F., Leite, N.F., Souza, C.E.S., Andrade, J.C., Alencar, L.B.B., Lavor, A.K.L.S., Figueredo, F.G., Lima, L.F., Coutinho, H.D.M. (2015). Análise fitoquímica e atividade

antifúngica do óleo essencial de folhas de *Lippia sidoides* Cham. e do Timol contra cepas de *Candida* spp. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*.17, 836-844.

Buso-Ramos, M. M. F., S. N. B., Boni, G. C., Höfling, J. F. (2017). *Psidium cattleianum* (Myrtaceae) as a Natural Antimicrobial Source Against oral bacteria. *Adv Dent & Oral Health*, 4, 555-650.

Castelo, A.V.M., Del Menezzi, C.H.S., Resck, I.S. (2012). Seasonal Variation in the Yield and the Chemical Composition of Essential Oils from Two Brazilian Native Arbustive Species. *Journal of Applied Sciences*, 12: 753-760.

Camacho-Hernandez, L., Cisneros-Rodríguez, C., Uribé Beltran, M.J., Ríos-Morgan, A., Delgado-Vargas, F., 2004. Antifungal activity of fruit pulp extract from *Psidium sartorianum*. *Fitoterapia*. 75, 401-404.

Cleff, M. B., Meinerz, A.R.M., Madrid, I., Fonseca, A.O., Alves, G.H., Meireles, M.C.A., Rodrigues, M.R.A. (2012). Perfil de suscetibilidade de leveduras do gênero *Candida* isoladas de animais ao óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. *Revista brasileira de plantas mediciniais*, 14, 43- 49.

Coutinho, H.D.M., Costa, J.G.M., Lima, E.O., Falcão-Silva, V.S., Siqueira-Júnior, J.P. (2008). Enhancement of the Antibiotic Activity against a Multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and Chlorpromazine. *Chemotherapy*, 54, 328–330.

De Moraes, L. A. S. (2009). Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. *Horticultura Brasileira*, 27, 4050-4063.

Deising H. B., Reimann S., Pascholati S. F. (2008). Mechanisms and significance of fungicide resistance. *Brazilian Journal of Microbiologia*, 39, 286–295.

Ellof, J.N. A. 1998. Sensitive and quick microplate method to determined the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta Medica*, v. 64, p. 711-3.

Ernst, E.J., Klepser, M.E., Ernst, M.E., Messer, S.A., Pfaller, M.A. (1999). In vitro pharmacodynamic properties of MK-0991 determined by time-kill methods. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 33, 75–80.

Frazon, R. C., Campos, L. Z. O., Proença, C. E. B., Sousa-Silva, J. C. (2009). *Araçás do gênero Psidium: principais espécies, ocorrência, descrição e usos*. Planaltina: Embrapa Cerrados. 48.

Gouyon, P. H., Vernet, Ph., Guillerm, J. L., Valdeyron, G. (1986). Polymorphisms and environment: the adaptive value of the oil polymorphisms in *Thymus vulgaris* L. *Heredity*, 57, 59-66.

Gilles, M.; Zhao, J.; AN, M.; Agboola, S. Chemical composition and antimicrobial properties of essential oils of three Australian Eucalyptus species. *Food Chemistry*, v. 119, p.731-737, 2010

Houël, E., Nardella, F., Jullian, V., Valentin, A., Vonthron-Sénécheau, C., Villa, P., Obrecht, A., Kaiser, M., Bourreau, E., Odonne, G., Fleury, M., Bourdy, G., Parvier, V., Deharo, E., Stien, D. (2016). Wayanin guaijaverin, two active metabolites found in a *Psidium acutangulum* Mart. exDC (syn.*P. peroonii* McVaugh) (Myrtaceae) antimalarial decoction from the Wayana Amerindians. *Journal of Ethnopharmacology*. 187, 241–248.

- Jackson, C., Agboke, A., Victor Nwoke, V. (2009). In vitro evaluation of antimicrobial activity of combinations of nystatin and *Euphorbia hirta* leaf extract against *Candida albicans* by the checkerboard method. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3, 666-669.
- Javadpour, M.M., Juban, M.M., Lo, W.C., Bishop, S.M., Alberty, J.B., Cowell, S.M., Becker, C.L., Mclaughlin, M.L. (1996). De novo antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity. *Journal of Medicinal Chemistry*, 39, 3107 – 3113.
- Kalana, L., Wrigh, G.D. (2011). Antibiotic adjuvants: multicomponent anti-infective 645 strategies. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 23, 13:5.
- Kumar, S. N., Siji, J. V., Nambisan, B., Mohandas, C. (2012). Activity and synergistic interactions of stilbenes and antibiotic combinations against bacteria *in vitro*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(11): 3143-50.
- Khadhri, A., El Mokni, R., Almeida, C., Nogueira, J. M. F. Araujo, M. E. M. (2014). Chemical Composition of Essential Oil of *Psidium guajava* L. Growing in Tunisia. *Industrial Crops and Products*. 52, 29–31.
- Laxminarayan R., Duse A., Wattal C., Zaidi A.K., Wertheim H.F., Sumpradit N. Vlieghe E., Hara G.L., Gould I.M., Goossens H., Greko C., SO A.D., Bigdeli M., Tomson G., Woodhouse W., Ombaka E., Peralta A.Q., Qamar F.N., Mir F., Kariuki S., Bhutta Z.A., Coates A., Bergstrom R., Wright G.D., Brown, E.D. C. O. (2013). Antibiotic resistance - the need for global solutions. *The Lancet Infectious Diseases*, v.13, p.1057- 1098.
- Marques, F.A., Edison, P., Wendler, E.P., Beatriz, H.L.N., Sales Maia, B. H.L. N., Coffani-Nunes, J.V., Campana, J., Guerrero, Jr. P.G. Volatile Oil of *Psidium cattleianum* Sabine from the Brazilian Atlantic Forest. *Journal Essential Oil Res.* 20, 519-520, 2008.
- Medina, A. L., Haas, L. I. R. F., Chaves, C. Salvador, M., Zambiasi, R.C, Silva, W.P., Cesar, L.N., Rombaldi, V. (2011). “Araçá (*Psidium cattleianum* Sabine) fruit extracts with antioxidant and antimicrobial activities and antiproliferative effect on human cancer cells,” *Food Chemistry*. 128, 916–922.
- Morais-Braga, M.F.B., Carneiro, J.N.P., Machado, A.J.T., Sales, D. L., Santos, A.T.L., Boligon, A.A., Athayde, M. L., Menezes, I.R.A., Souza, D.S.L., Costa, J.G.M., Coutinho, H.D.M. (2017). Phenolic composition and medicinal usage of *Psidium guajava* Linn.: Antifungal activity or inhibition of virulence? *Saudi Journal of Biological Sciences*, 24, 302-313.
- Nascimento, P.F.F., Nascimento, A.I.C. Rodrigues, C.S., Antonioli, A. R., Santos, P. O., Júnior, A. M. B., Trindade, R. C. (2007). Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. *Revista brasileira de farmacognosia*, 17, 108-13.
- Nazzaro, F., Fratianni, F., Martino, L., Coppola, R., Feo, V. (2013). Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals, Basel*, 6, 1451-1474.
- NCCLS. (2002). *Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras*; Norma Aprovada—Segunda Edição. Norma M27-A2 do NCCLS (ISBN 1-56238-469-4).
- Neto, M. A., Alencar, J. W., Cunha, A. N., Silveira, E. R., Batista, T. G. (2011). Volatile Constituents of *Psidium pohlianum* Berg, and *Psidium guyanensis* Pers. *Journal of Essential Oil Research*, 6, 299 -300.

- Oliveira, L.B.S., Batista, A.H.M., Fernandes, F.C., Sales G.W.P., Nogueira, N.A.P. (2016). Antifungal activity and potential action mechanisms of essential oil of *Ocimum gratissimum* (Linn.) leaves against *Candida* species. *Revista brasileira de plantas medicinais*, 18, 511-523.
- Oliveira, R. A. G., Lima, E. O., Souza, E. L., Vieira, W. L., Freire, K. R. L., Trajano, V. N., Lima, I. O., Silva-Filho, R. N. (2007). Interference of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng essential oil on the anti-*Candida* activity of some clinically used antifungals. *Revista brasileira de farmacognosia*, 17, 186-190.
- Padália, R.C., Verma, R.S., Chauhan, A., Chanotiya, C.S. (2014). Seasonal variation in essential oil composition of *Artemisia nilagirica* var. septentrionalis from Foot Hills of Western Himalaya. *Records of Natural Products*, 8, 281–285.
- Padrón-Márquez, B., Viveros-Valdez, E., Oranday-Cárdenas, A., Carranza-Rosales, P., 2012. Antifungal activity of *Psidium guajava* organic extracts against dermatophytic fungi. *Journal Medicinal Plant Reserch*. 6, 5435–5438.
- Pereira, R. B.; LUCAS, G. C.; Perina, F. J.; Resende, M. L. V.; Alves, E. Potential of essential oils for the control of brown eye spot in coffee plants. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 35, n. 1, p. 115-123, 2011.
- Pfaller, M.A., Diekema, D.J. (2007). Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clinical Microbiology Reviews*, 20, 133 – 63.
- Pimentel, R. B. Q., Souza, D. P., Albuquerque, P. M., Fernandes, A. V., Santos, A. S., Duvoisin, S., & Gonçalves, J. F. C. (2018). Variability and antifungal activity of volatile compounds from *Aniba rosaeodora* Ducke, harvested from Central Amazonia in two different seasons. *Industrial Crops and Products*, 123, 1–9.
- Pinho, A. I., Wallau, G. L., Nunes, M. E. M., Leite, N. F., Tintino, S. R., Cruz, L. C., Cunha, F. A. B., Costa, J. G. M., Coutinho, H. D. M., Posser, T., Franco, J. L. (2014). Fumigant Activity of the *Psidium guajava* Var. Pomifera (Myrtaceae) Essential Oil in *Drosophila melanogaster* by Means of Oxidative Stress. *Oxidative medicine and Cellular Longevity*, 8.
- Sardi, J.C.O.L., Scorzoni, T., Bernardi, A. M.F., Giannini, M.J.S.M. (2013). *Candida* species: Current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *Journal of Medical Microbiology*, 62, 10–24.
- Sartoratto, A., Machado, A. L. M., Delarmelina, C., Figueira, G. M., Duarte, M. C. T., Rehder, V. L. G. (2004). Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiologia*, 35, 275-280.
- Sidrim, J. J. C., Rocha M. F. G. (2010). *Micologia médica à luz de autores contemporâneos*, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 388.
- Silva, F., Santos, R.H.S., Diniz, E.R., Barbosa, L.C.A., Casali, V.W.D., Lima, R.R. (2003). Teor e composição do óleo essencial de manjeriço (*Ocimum basilicum* L.) em dois horários e duas épocas de colheita. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, 6, 33 -38.
- Souza, C. D., Felfili, J. M. (2006). The utilization of medicinal plants in the region of Alto Paraíso of Goiás, GO, Brazil. *Acta Botanica Brasilica*. 20, 135-142.
- Taylor, P.W. (2013). Alternative natural sources for a new generation of antibacterial 642 agents. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 42, 195-201.

The Plant List. (2016). A working list of all plant species, version 1.1. Royal Botanic Gardens, Kew and Missouri Botanical Garden. [Http://www.theplantlist.org/](http://www.theplantlist.org/)

Tsang, P.W.K., Bandara, H.M., Fong, W.P. (2012). Purpurin suppresses *Candida albicans* biofilm formation and hyphal development. *Plos One*, 7, 11–8.

Turina, A.V., Nolan, M.V., Zygadlo, J.A., Perillo, M.A. (2006). Natural terpenes: self-assembly and membrane partitioning. *Biophysical Chemistry*, 122,101-113.

Verma, R.K., Chauhan, A., Yadav, A., 2010. Changes in the essential oil composition of *Majorana hortensis* Moench. cultivated in India during plant ontogeny. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 75, 441–447

DISCUSSÃO GERAL

A sazonalidade é um fator importante para a biossíntese dos compostos metabólicos, induzindo na sua produção e acumulação. Neste estudo o rendimento dos óleos essenciais de *P. myrtoides* e *P. salutare*, durante os dois anos de estudo, apresentou as maiores quantidades no período reprodutivo associada a estação chuvosa, com rendimentos variando de 0,15 a 0,75% para *P. salutare* e de 0,35 a 1,17% para *P. myrtoides*. O aumento observado no teor de óleo essencial durante a floração e sua diminuição no estágio de queda foliar refletem uma regulação do desenvolvimento da biossíntese de óleo essencial.

Na análise do óleo essencial por Cromatografia Gasosa (CG/EM), a predominância de componentes principais para *P. myrtoides* e *P. salutare*, foi de monoterpenos (1,8-cineol, γ -terpineno, α -pineno e p-cimeno), diferindo dos resultados encontrados em outros estudos com espécies de *Psidium*, onde a predominância foi de compostos sesquiterpênicos. A presença de monoterpenos e terpenoides podem ter influenciado a atividade biológica das espécies.

Considerando a influência da sazonalidade (estações seca e chuvosa) na atividade antifúngica do óleo essencial das espécies em estudo, a atividade clínica não foi significativa para as espécies em estudo com CFM $\geq 1024 \mu\text{g/mL}$, no entanto os testes de avaliação do potencial modulador, potencializam a ação antifúngica do fármaco contra as leveduras de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei*, a concentrações bem menores do quando utilizado sozinho. A atividade do óleo essencial pode estar relacionada, em parte, à sua hidrofobicidade, responsável pela sua partição da bicamada lipídica da membrana celular, levando a uma alteração na permeabilidade e danos na membrana celular, como também pode estar associado a princípios ativos agindo em conjunto ou isoladamente.

Quando analisado a interferência dos óleos essenciais das espécies sobre a micromorfologia fúngica da cepa *C. albicans* (INCQS 40006), podemos observar um efeito já na menor concentração avaliada $512 \mu\text{g/mL}$, havendo uma tendência do efeito diretamente proporcional à concentração. Desta forma, mais estudos são necessários para entender os processos genéticos e bioquímicos envolvidos na dinâmica fungistática.

Os dados coletados estabelecem as bases para novos estudos voltados para investigar as mudanças no conteúdo de compostos químicos por um período de tempo, a fim de definir condições para obter quantidades mais elevadas de compostos bioativos com propriedades antifúngicas.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando o conjunto dos resultados obtidos no presente trabalho, espera-se que possam contribuir ao conhecimento sobre o perfil químico de *Psidium myrtoides* O. Berg e *Psidium salutare* (Kunth) que mostraram em sua composição níveis consideráveis de compostos químicos, com predominância de 1,8-Cineol e γ -terpineno (respectivamente) no óleo extraído de suas folhas. A fenologia parece influenciar no rendimento de *P. salutare* com maiores valores na floração e frutificação, no entanto para *P. myrtoides* as fases fenológicas parecem não ter influenciado o rendimento.

Do ponto de vista microbiológico, os óleos essenciais ensaiados não apresentaram efeito fungicida. Contudo, pode ser observado que os óleos de *P. myrtoides* e *P. salutare* afetaram o dimorfismo fúngico, inibindo esse que é um dos principais fatores de virulência dos fungos do gênero *Candida*. As espécies em estudo representam uma potencial fonte de metabólitos que podem ser utilizados em novas formulações farmacêuticas que visem a inibição da virulência *Candida*, principalmente em indivíduos com imunodepressão, que constituem o principal grupo susceptível à candidíase.

Portanto, esses dados podem contribuir não só ao conhecimento sobre a espécie, mas servir como base para posteriores estudos buscando aliar informações do conhecimento local e o entendimento da distribuição de metabólitos destinados ao uso medicinal. Além disso, estudos com objetivo de entender como esses fatores ambientais e fisiológicos estão associados à biossíntese de compostos químicos responsáveis por atividades antimicrobiana importantes e seus mecanismos de ação, bem como os períodos mais apropriados para a obtenção dos maiores teores destes constituintes que são destinados ao uso terapêutico.

ANEXOS

ANEXO A- Comprovante SISBIO



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Comprovante de registro para coleta de material botânico, fúngico e microbiológico

Número: 50362-2	Data da Emissão: 04/08/2015 13:21
Dados do titular	
Nome: Delmacia Gonçalves de Macedo	CPF: 020.716.793-18

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	A autorização não eximirá o pesquisador da necessidade de obter outras anuências, como: I) do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador quando as atividades forem realizadas em área de domínio privado ou dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso; II) da comunidade indígena envolvida, ouvido o órgão indigenista oficial, quando as atividades de pesquisa forem executadas em terra indígena; III) do Conselho de Defesa Nacional, quando as atividades de pesquisa forem executadas em área indispensável à segurança nacional; IV) da autoridade marítima, quando as atividades de pesquisa forem executadas em águas jurisdicionais brasileiras; V) do Departamento Nacional da Produção Mineral, quando a pesquisa visar a exploração de depósitos fossilíferos ou a extração de espécimes fósseis; VI) do órgão gestor da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, dentre outras.
3	O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	É necessário a obtenção de anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como de consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade.
5	Este documento não abrange a coleta de vegetais hidróbios, tendo em vista que o Decreto-Lei nº 221/1967 e o Art. 36 da Lei nº 9.605/1998 estabelecem a necessidade de obtenção de autorização para coleta de vegetais hidróbios para fins científicos.
6	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
7	Este documento não é válido para: a) coleta ou transporte de espécies que constem nas listas oficiais de espécies ameaçadas de extinção; b) recebimento ou envio de material biológico ao exterior; e c) realização de pesquisa em unidade de conservação federal ou em caverna.
8	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospeção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .
9	Esse documento não eximirá o pesquisador da necessidade de obter outras anuências, como: I) da comunidade indígena envolvida, ouvido o órgão indigenista oficial, quando as atividades de pesquisa forem executadas em terra indígena; II) do Conselho de Defesa Nacional, quando as atividades de pesquisa forem executadas em área indispensável à segurança nacional; III) da autoridade marítima, quando as atividades de pesquisa forem executadas em águas jurisdicionais brasileiras; IV) do Departamento Nacional da Produção Mineral, quando a pesquisa visar a exploração de depósitos fossilíferos ou a extração de espécimes fósseis; V) do órgão gestor da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, dentre outras.

Táxons autorizados

#	Nível taxonômico	Táxon(s)
1	REINO	Plantae

Este documento (Comprovante de registro para coleta de material botânico, fúngico e microbiológico) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 89923957



Página 1/1

ANEXO B- Comprovante de publicação no periódico European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases

