

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BACTERICIDA E LEISHMANICIDA DO ÓLEO ESSENCIAL DA RESINA DA PROTIMUM CALENDULINUM DALY**

 <https://doi.org/10.56238/arev7n5-443>

**Data de submissão:** 30/04/2025

**Data de publicação:** 30/05/2025

**Hélida Soleane Mendonça Ferreira Nobre**

Doutoranda em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente-PGDRA  
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Rondônia (IFRO)

E-mail: helida.ferreira@ifro.edu.br

ORCID: 0000-0002-2529-504X

LATTES: <http://lattes.cnpq.br/5490537834056278>

**Mariangela Soares de Azevedo**

Doutora em Química

Departamento de Química, Laboratório de Fitoquímica da Universidade Federal de Rondônia  
(LABFITO-UNIR)

E-mail: mari@unir.br

ORCID: 0000-0002-2739-0390

LATTES: <http://lattes.cnpq.br/0649221010306606>

**Luis Fernando Lira Souto**

Doutor em Química de Produtos Naturais

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Rondônia (IFRO)

E-mail: luis.lira@ifro.edu.br

ORCID: 0000-0001-9760-8642

LATTES: <http://lattes.cnpq.br/5947454694669895>

**Geisa Paulino Caprini Evaristo**

Doutora em Biotecnologia Analítica

Centro de Estudos de Biomoléculas Aplicadas à Saúde (CEBio), Fundação Oswaldo Cruz de  
Rondônia (Fiocruz/RO)

E-mail: geisa.evaristo@fiocruz.br

ORCID: 0000-0001-7790-8832

LATTES: <http://lattes.cnpq.br/8805105993816935>

**Bruna Fonseca Tavares**

Graduanda em Ciências Biológicas

Centro de Estudos de Biomoléculas Aplicadas à Saúde (CEBio), Fundação Oswaldo Cruz de  
Rondônia (Fiocruz/RO)

E-mail: brunatavares13@outlook.com

ORCID: 0009-0009-8945-9494

LATTES: <http://lattes.cnpq.br/2291385236299416>

**Márcio Vinícius da Silva Gomes**  
Mestre em Ciências Farmacêuticas  
Laboratório Brasileiro de Controle de Dopagem - LBCD, LADETEC, Universidade Federal do Rio de Janeiro-UFRJ  
E-mail: marcio.gomes@iq.ufrj.br  
ORCID: 0000-0002-6076-1616  
LATTES: <http://lattes.cnpq.br/1937240315148451>

**Mônica Costa Padilha**  
Doutora em Química Orgânica  
Laboratório Brasileiro de Controle de Dopagem - LBCD, LADETEC, Universidade Federal do Rio de Janeiro-UFRJ  
E-mail: monicapadilha@iq.ufrj.br  
ORCID: 0000-0003-3760-8231  
LATTES: <http://lattes.cnpq.br/3535979177615701>

**Henrique Marcelo Gualberto Pereira**  
Doutor em Química Orgânica  
Laboratório Brasileiro de Controle de Dopagem - LBCD, LADETEC, Universidade Federal do Rio de Janeiro-UFRJ  
E-mail: henriquemarcelo@iq.ufrj.br  
ORCID: 0000-0001-8597-416X  
LATTES: <http://lattes.cnpq.br/2027607828812634>

**Carolina Bioni Garcia Teles**  
Doutora em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro  
Laboratório da Plataforma de Bioensaios em Malária e Leishmaniose da Fiocruz/RO, Fundação Oswaldo Cruz de Rondônia (Fiocruz/RO)  
E-mail: carbioni2004@gmail.com  
ORCID: 0000-0002-4529-2137  
LATTES: <http://lattes.cnpq.br/8279471785523666>

**Aurileya de Jesus Gouveia**  
Mestranda em Propriedade Intelectual e Transferência de Tecnologia para a Inovação – PROFNIT  
Laboratório da Plataforma de Bioensaios em Malária e Leishmaniose da Fiocruz/RO, Fundação Oswaldo Cruz de Rondônia (Fiocruz/RO)  
E-mail: aurileya.gouveiaivonei@gmail.com  
ORCID: 0000-0001-6360-3026  
LATTES: <http://lattes.cnpq.br/1549225537806975>

**Najla Benevides Matos**  
Doutora em Microbiologia e Virologia  
Laboratório de Microbiologia da Fiocruz/RO, Fundação Oswaldo Cruz de Rondônia (Fiocruz/RO)  
E-mail: najla.matos@fiocruz.br  
ORCID: 0000-0002-7271-5764  
LATTES: <http://lattes.cnpq.br/4963470094090382>

**Rosimar Pires Esquerdo**

Laboratório de Microbiologia da Fiocruz/RO, Fundação Oswaldo Cruz de Rondônia (Fiocruz/RO)

E-mail: esquerdodireto@hotmail.com

ORCID: 0009-0007-3227-4662

LATTES: <http://lattes.cnpq.br/8747418814745039>

**Luccas Manoel de Melo Suica**

Graduado em Biomedicina

Laboratório de Microbiologia da Fiocruz/RO, Fundação Oswaldo Cruz de Rondônia (Fiocruz/RO)

E-mail: luccassuika@gmail.com

ORCID: 0009-0004-2135-1368

LATTES: <http://lattes.cnpq.br/3525143742895222>

**Nayara Magalhães Aguiar da Silva**

Graduado em Biomedicina

Laboratório de Microbiologia da Fiocruz/RO, Fundação Oswaldo Cruz de Rondônia (Fiocruz/RO)

Nayara Magalhães Aguiar da Silva

ORCID: 0009-0008-4474-1560

LATTES: <http://lattes.cnpq.br/0866834772207552>

**Núcia Cristiane da Silva Lima**

Graduada em Ciência Biológicas

Laboratório de Microbiologia da Fiocruz/RO, Fundação Oswaldo Cruz de Rondônia (Fiocruz/RO)

E-mail: nucialima@gmail.com

ORCID: 0000-0001-8588-3188

LATTES: <http://lattes.cnpq.br/5165566854457922>

**Ingrid Ferreira Chagas Soneguete**

Mestranda em Conservação e Uso de Recursos Naturais

Programa de Pós-graduação em Conservação e Uso de Recursos Naturais da Universidade Federal

de Rondônia (PPGReN/UNIR)

E-mail: ingridferreirachagas@gmail.com

ORCID: 0009-0009-6224-9569

LATTES: <http://lattes.cnpq.br/4540936333466040>

**Wilson Sacchi Peterella**

Doutor em Ciência do Solo e Nutrição de Plantas

Departamento de Química da UNIR, Laboratório Central Analítica, Universidade Federal de

Rondônia (UNIR)

E-mail: wspeterella@unir.br

ORCID: 0000-0003-3931-515X

LATTES: <http://lattes.cnpq.br/9350794843721516>

---

**RESUMO**

A resina aromática das espécies do gênero *Protium* é utilizada na medicina popular como vermífugo, antiparasitário, ansiolítico, cicatrizante e como matéria-prima para o tratamento de problemas respiratórios, dentários e digestivos. A espécie *Protium calendulinum* Daly produz resina em forma de gotas que cristalizam quando em contato com o ambiente, sendo também rica em óleo essencial. Os estudos para avaliar a composição química do óleo essencial da resina e potenciais atividades

biológicas da *P. calendulinum* frente à microrganismo, ainda são incipientes. Portanto, o presente trabalho teve por objetivo analisar a composição química de seu óleo essencial, bem como avaliar suas possíveis atividades bactericida e leishmanicida. A análise da composição química do óleo demonstrou a presença de monoterpenos (82,64%) e sesquiterpenos (2,07%). Os compostos majoritários foram o *orto*-cimeno (27,52 %),  $\alpha$ -felandreno (17,73 %),  $\alpha$ -pineno (13,77 %), eucaliptol (6,47 %) e  $\alpha$ -terpineno (5,97 %). O óleo essencial usado *in natura* demonstrou atividade bactericida em teste de difusão em disco para as espécies *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* Resistente a Meticilina (MRSA), *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*, com zonas de inibição de crescimento bacteriano entre 7,7 e 14,0 mm, porém, não indicou atividade frente às espécies *Escherichia coli* e *Acinetobacter baumannii*. Atividade leishmanicida frente à forma promastigota da *Leishmania amazonensis* foi observada nas concentrações de 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (Índice de Inibição de Crescimento de 93%) e 200  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (Índice de Inibição de Crescimento de 100%). A CIM observada foi de 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e  $\text{CI}_{50}$  de 96,08  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

**Palavras-chave:** *Protium calendulinum*. Óleo essencial. Resina. Atividade bactericida. Atividade leishmanicida.

## 1 INTRODUÇÃO

Patologias, tais como as doenças infecciosas, são geradas por uma série de microrganismos, incluindo bactérias e protozoários, causando danos sistêmicos e dos tecidos em seus hospedeiros que, por sua vez, manifestam sintomas característicos dessa infecção (CASADEVALL e PIROFSKI, 2000).

A depender da espécie, as infecções geradas por bactérias podem ser agudas, crônicas, recorrentes ou persistentes, desencadeando enfermidades tais como: osteomielite, artrite séptica, pneumonia, endocardite, bacteremia, septicemia, cistite, pielonefrite, pneumonia nosocomial, meningite bacteriana neonatal, celulites, periodontites, infecções endodônticas, peri-implantites, entre muitas outras (LOWY, 1998; OLIVEIRA et al., 2007; WIESER et al., 2010; RAINERI et al., 2022; BIESDORF et al., 2022; TORRES et al., 2023).

As infecções bacterianas, incluindo as comuns, têm demonstrado ao longo dos anos, resistência a tratamentos com medicamentos já consolidados, o que foi observado em dados relatados por 87 países no ano de 2020. Altos níveis de resistência, acima de 50%, em bactérias que são causas de infecções hospitalares também foram pontuados, como por exemplo, em *Klebsiella pneumoniae* e *Acinetobacter spp.* (WHO, 2022).

Com uma média de mortalidade de aproximadamente 700 mil pessoas por ano e com previsão de aumento nos anos seguintes, as doenças provocadas por bactérias multirresistentes, tornaram-se um problema de extrema importância de saúde a nível mundial, apontando o uso indiscriminado e excessivo de antibióticos como uma das principais causas e fator importante discutido entre a comunidade científica (PADIYARA et al., 2018; LANGFORD et al., 2020). Em virtude disso, as opções terapêuticas vêm se tornando cada vez mais escassas, gerando, além de impactos econômicos, falhas na terapia adotada e, consequente, comprometimento no tratamento de pacientes acometidos por essas infecções (LOUREIRO et al., 2016).

Outra questão de saúde em destaque e debatida na medicina moderna tem sido a leishmaniose, que é considerada uma das mais importantes entre as dez doenças infecciosas negligenciadas mundialmente, com cerca de 12 milhões de pessoas infectadas, destacando-se quatro regiões ecoepidemiológicas: Américas, Norte da África, África Oriental, Oeste e Sudeste Asiático (OMS/OPAS, 2016).

Representada por diferentes espécies de protozoários intracelulares do gênero *Leishmania* e apresentando-se em duas formas principais, amastigota e promastigota (VASCONCELOS et al., 2018), as leishmanioses são responsáveis por cerca de 1,5 milhão de pessoas contaminadas todos os anos em 98 países, gerando entre 20 e 40 mil óbitos. A contaminação acontece quando o flebotomíneo

fêmea infectada realiza seu repasto sanguíneo sobre o tecido do hospedeiro, transmitindo a ele sua forma infectante (promastigota) (UENO e WILSON, 2012).

As leishmanioses podem se apresentar nas formas clínicas cutânea, mucosa, mucocutânea e visceral (OMS/OPAS, 2016). Quando apresentada nas formas cutânea, mucosa e mucocutânea, formam o complexo *Leishmania* Tegumentar Americana (LTA), cujas espécies *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *L. (Viannia) braziliensis* e *L. (V.) guyanensis*, são as três mais comuns no Brasil (BRASIL/MS, 2017). As Américas, em destaque o Brasil, Peru e Colômbia, foram responsáveis por uma média de 52 mil casos de leishmaniose tegumentar nos últimos vinte anos (OMS/OPAS, 2016).

Diante da ameaça de agravamento no quadro de infecções provocadas por esses agentes, a comunidade científica tem buscado desenvolver pesquisas voltadas para auxiliar no combate a esses microrganismos, investigando o perfil fitoquímico e avaliando possíveis atividades medicinais de plantas conhecidamente utilizadas de forma terapêutica pela população em geral (UKUHOR, 2021; BRAZ FILHO, 2010). Podendo, inclusive, ser implementadas como metodologias alternativas no combate a essas infecções, possibilitando a diminuição nos custos de tratamentos e de chances de óbito de pacientes infectados (SILVA e NOGUEIRA, 2022).

A família Burseraceae, sendo composta por cerca de 700 espécies, possui distribuição pantropical, inicialmente por toda a parte sul do continente americano e da Europa e, posteriormente, África, Ásia e Oceania; subordinadas a 18 gêneros, sendo o gênero *Protium* seu principal representante no Brasil (WEEKS et al., 2005; ROCHA et al., 2022).

Devido a capacidade de produzir resina aromática, as espécies do gênero *Protium* são popularmente conhecidas por uma série de nomes ligados à essa característica, tais como: breu, breu branco, breu vermelho, breu jauaricica, breu preto, breu sucurúba, almécegueira, almíscar, copal, goma-limão, incenso de Cayenna, bálsamo de Caraná, entre outros (SILVA et al, 1977; CORRÊA, 1926). Segundo Corrêa (1926), o nome “almécegueira” foi dado a algumas espécies da família Burseracea e este termo poderia se estender às demais espécies brasileiras do gênero *Protium* produtoras de resinas, o que, de fato, vem ocorrendo ao longo da popularização de seu uso no decorrer dos anos.

A resina é obtida através de incisões realizadas no caule da árvore e por ser muito perfumada é utilizada em algumas localidades como incenso e repelente de insetos, além de seu uso na calafetagem e fabricação de vernizes. Na medicina popular existem relatos do uso como vermífugo, antiparasitário, ansiolítico, cicatrizante e como matéria-prima para o tratamento de problemas

respiratórios, dentários e digestivos (ROCHA et al., 2022; MORS e RIZZINI, 1966; LANGENHEIM, 2003).

Pesquisa sobre a *Protium calendulinum* Daly, conhecida como breu de leite (SiBBr, 2020), ainda são incipientes, considerando-se o fato de que há poucos estudos reportados, até o presente momento para a espécie.

A exemplo, temos a descrição morfológica da vegetação produtora de resina localizada na Reserva de Desenvolvimento Sustentável de Tupé, no município de Manaus, Amazonas, onde Fernandez e Scudeller (2011) descrevem a *P. calendulinum* como uma espécie com folhas compostas por seis ou mais pares de folíolos, gema apical com pilosidade densa, pulvínulo apical inconsúpicio, peciólulo com pilosidade densa. Quanto à produção do breu, a espécie é produtora de resina em forma de gotas, sofrendo cristalização quando em contato com o ambiente (LANGENHEIM, 2003).

Barata et al. (2020) realizaram a análise fitoquímica e potencial alelopático do extrato etanólico das folhas da *P. calendulinum*, também colhida no município de Manaus, descrevendo a presença de compostos, possivelmente responsáveis pelo elevado potencial alelopático, impeditivos da germinação e crescimento inicial da *Lactuca sativa*, uma espécie de alface, indicando bioatividade da espécie.

Considerando o uso tradicional, possíveis indicações medicinais e a contribuição farmacológica das espécies do gênero *Protium*, se faz necessário estudos mais contundentes sobre a composição química do óleo essencial de suas resinas. Assim, o presente trabalho, teve por objetivo analisar a composição química do óleo essencial da resina da *P. calendulinum* Daly, bem como avaliar suas possíveis atividades bactericida e leishmanicida, a fim de embasar futuras pesquisas com a espécie.

## 2 METODOLOGIA

A coleta da *P. calendulinum* foi realizada na Estação Ecológica do Cuniã (ESEC Cuniã), localizada no município de Porto Velho/RO, no sítio de amostragem do Programa de Pesquisa em Biodiversidade (PPBio/Núcleo Regional RO). A resina foi extraída no período da manhã e acondicionada em sacos plásticos escuros e levada ao LABFITO-UNIR (Laboratório de Fitoquímica do Campus José Ribeiro Filho da Universidade Federal de Rondônia) para o prosseguimento da pesquisa. A espécie vegetal foi identificada e um exemplar foi depositado no Herbário da Universidade Federal de Rondônia, sob o voucher RON00009917.

Cerca de 153 g de resina foi submetida ao processo de hidrodestilação em extrator de Clevenger, produzindo, aproximadamente, 2 mL de óleo essencial que foi recolhido em frasco de vidro

transparente, sendo separado o óleo essencial da fase aquosa. Na sequência, o óleo foi retirado com o auxílio de pipeta Pasteur descartável e transferido para frasco *vial* incolor envolto em papel alumínio e vedado com tampa de rosca e acondicionado em geladeira para evitar a perda do material por volatilização. Posteriormente o óleo essencial da resina foi submetido a avaliações biológicas.

O perfil químico do óleo essencial da resina da *P. calendulinum* foi caracterizado através da cromatografia em fase gasosa associada à espectrometria de massas (CG-EM/EM), no Laboratório Brasileiro de Controle de Dopagem - LBCD, localizado no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro (IQ-UFRJ). O CG-EM/EM, modelo Trace 1310 Gas Chromatograph - TSQ 8000 Evo Triple Quadrupole (marca ThermoScientific, EUA), equipado com auto-injetor Triplus RSH (ThermoScientific, USA) e coluna HP5-MS 5% fenil, com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno, 0,25 µm de espessura do filme interno fundida com sílica e espectrômetro de massas com detector por ionização por impacto eletrônico (70 eV), com software TraceFinder 3.2.512.0 (ThermoScientific). A temperatura da coluna foi programada para iniciar em 50 °C e permanecer por 2 minutos, após, um incremento de 5 °C por minuto até atingir 300 °C, e mantida por mais 3 minutos. A temperatura do injetor foi de 250 °C. As análises foram realizadas com a utilização de gás hélio com fluxo de 1,5 mL·min<sup>-1</sup>, razão de Split de 50:1, faixa de detecção do espectrômetro de massas de 35 a 500 m/z, em intervalos de 0,2 segundos, início de aquisição dos dados após 2 min. As amostras foram diluídas 100 vezes em metanol e injetados 1 µL de cada amostra.

Na identificação dos componentes constituintes das amostras analisadas, foram considerados os índices de retenção linear (Índice de Kovats – IK), calculado com relação ao tempo de retenção da série homóloga da mistura de hidrocarbonetos (C7 a C30) (Sigma-Aldrich) e observado o padrão de fragmentação dos espectros de massas, por comparação destes com a literatura (ADAMS, 2007) e Banco de Dados NIST (Programa de Pesquisa Espectral de Massa) Versão 2.0 incluído no software do computador.

O teste de difusão em disco para a observação de atividade bactericida foi realizado no Laboratório de Microbiologia da Fiocruz/Rondônia, adaptado de Nobre e al. (2019).

O óleo essencial da resina da *P. calendulinum* (PCOE – Resina) foi retirado da geladeira 30 min antes de seu uso, para se encontrar em temperatura ambiente no momento da aplicação e utilizado in natura e como inóculos foram utilizadas as seguintes cepas padrão: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Acinetobacter baumannii* (ATCC 19606) e *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212). O crescimento bacteriano foi realizado em tubos de ensaio com vedação por algodão em meio Luria-Bertani (LB) em incubadora

microbiológica do tipo Shaker (marca New Brunswick Classic C24 Incubator) à 37°C em 100 RPM de agitação constante por um período de 24 horas. Com o auxílio de um densitômetro foi realizada a diluição em solução salina para se chegar a uma turvação comparada ao padrão 0,5 McFarland ( $1,5 \times 10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>).

Como controle positivo (C+) utilizou-se o antibiótico cloranfenicol, diluído em água para injeção à concentração de 5 µg.mL<sup>-1</sup> e filtrado em filtro microbiológico com poros de 0,22µm com auxílio de uma seringa. Ressalta-se que, para o presente teste, não foi utilizado controle negativo, uma vez que o óleo essencial foi utilizado in natura.

Os antibiogramas, realizados em placas de Petri de 90 mm para os testes de difusão em disco (difusão em ágar), em duplicata, com três repetições, foram confeccionados com camada de 25 mL de ágar Mueller-Hinton (MH).

Após o preparo e a solidificação do ágar, as placas de Petri foram deixadas em estufa bacteriológica (FANEM LTDA) a 37 °C por 30 min para sua total secagem, em seguida, embaladas em papel filme e guardadas em geladeira para posterior utilização nos testes.

Com um swab estéril, o inóculo foi aplicado na placa na metade da superfície do ágar em quatro direções, com um giro de 90° por vez, assegurando uma distribuição uniforme por toda a placa de Petri. Para finalizar, o swab foi passado três vezes nas bordas da placa e, em seguida, deixadas entreabertas por 15 min à temperatura ambiente para que o inóculo fosse absorvido pelo meio.

Com o auxílio de uma micropipeta, 20 µL do PCOE – Resina e do controle, foram aplicados em discos de 6 mm de diâmetro, confeccionados em papel de filtro de 2,5 µm de espessura, e alocados em seus respectivos quadrantes na placa de Petri.

Após a aplicação, as placas foram incubadas em estufa bacteriológica (marca FANEM) a 37°C por 24 horas. Os halos formados foram medidos com halômetro e a categorização dos resultados obtidos foi embasada no trabalho de Ponce et al. (2003), cujos critérios são: halo ≤ 8 mm → não sensível, halo entre 9 e 14 mm → sensível, halo entre 15 e 19 mm → muito sensível e halo ≥ 20 mm → extremamente sensível.

O teste leishmanicida foi realizado no Laboratório da Plataforma de Bioensaios em Malária e Leishmaniose da Fiocruz/RO (PBML-FIOCRUZ-RO). Inicialmente o óleo essencial da resina foi preparado com uma diluição em DMSO 0,5%, e em seguida levado para banho de ultrassom com aquecimento (LGI-LUC-180), a temperaturas variando entre 25 e 29 °C por um período de 8 e 15 minutos, até que se observasse a completa diluição da amostra. Na sequência, a amostra foi diluída em meio de cultura Roswell Park Memorial Institute (RPMI), a fim de se chegar à concentração inicial

de 200 µg.mL<sup>-1</sup> no primeiro poço da placa de 96 poços. As microdiluições seriadas da amostra produziram oito concentrações, em intervalos de 200 a 1,5625 µg.mL<sup>-1</sup>.

Para o teste leishmanicida, adaptado de Lima et al. (2011), foi utilizada a forma promastigota da espécie *L. amazonensis* em meio RPMI, sendo esta mistura alocada em tubos Falcon e centrifugada por 15 min em 1500 RPM à temperatura de 4 °C. Uma vez centrifugada, o sobrenadante foi extraído, restando, portanto, o inóculo ao fundo dos tubos. Ao inóculo acrescentou-se cerca de 1 mL de meio RPMI completo (RPMI a 10% de soro fetal bovino e bicarbonato de sódio) de onde se extraiu uma pequena quantidade dessa mistura, cerca de 10 µL e acrescentou-se eritrosina 0,4% em PBS, para uma proporção 1:400 µL (mistura *Leishmania*:eritrosina) e, em seguida, realizada leitura e contagem da *L. amazonensis* em Câmara de Neubauer espelhada em microscópio com aumento de 400 vezes com apoio de contador de célula manual. Após a contagem foi realizada diluição do inóculo com meio RPMI completo para se chegar a uma concentração de 1,0 x 10<sup>6</sup> parasita/poço.

Como controle positivo utilizou-se a pentamidina diluída em meio RPMI na concentração de 3 µg.mL<sup>-1</sup> por poço e inóculo na concentração de 1,0 x 10<sup>6</sup> parasita/poço. Para o controle negativo (controle de viabilidade celular) utilizou-se o inóculo diluído em meio RPMI à concentração de 1,0 x 10<sup>6</sup> parasita/poço. Como branco (controle de esterilidade do meio) usou-se apenas meio RPMI.

Como corante indicador de metabolismo parasitário, para leitura colorimétrica quanti e qualitativa no teste leishmanicida, utilizou-se 20 µL de resazurina (7-hidróxi-3H-fenoxazina-3-ona-10-óxido) em todos os poços, cuja solução foi preparada em meio PBS

para se chegar a uma concentração de 2 mM em cada poço.

O teste de microdiluição seriada foi realizado em triplicata com duas repetições independentes em placa de 96 poços, para a observação da atividade leishmanicida para o óleo essencial da resina da *P. calendulinum* (Figura 1).

**Figura 1:** Organização da placa de 96 poços para o teste leishmanicida de microdiluição seriada para o PCOE-Resina.

Amostras	Amostra			Amostra			Amostra			Controles		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Amostras	A	200	200	200	200	200	200	200	200	C-	Meio	C+
	B	100	100	100	100	100	100	100	100	C-	Meio	C+
	C	50	50	50	50	50	50	50	50	C-	Meio	C+
	D	25	25	25	25	25	25	25	25	C-	Meio	C+

H	G	F	E
1,5625	3,125	6,25	12,5
1,5625	3,125	6,25	12,5
1,5625	3,125	6,25	12,5
1,5625	3,125	6,25	12,5
1,5625	3,125	6,25	12,5
1,5625	3,125	6,25	12,5
1,5625	3,125	6,25	12,5
C-	C-	C-	C-
Meio	Meio	Meio	Meio
C+	C+	C+	C+

Os poços das colunas 1-A até 1-H, 2-A até 2-H, 3-A até 3-H (amarelo), contém amostra do PCOE - Resina após microdiluição seriada, nas concentrações 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125 e 1,5625 $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>; outra duas amostras foram inseridas: poços 4-A até 4-H, 5-A até 5-H e 6-A até 6-H (azul); poços 7-A até 7-H, 8-A até 8-H e 9-A até 9-H (verde), nas mesmas concentrações; os poços da coluna 10-A até 10-H (laranja) contém formas promastigotas da *L. amazonensis* na concentração de 1,0 x 10<sup>6</sup> parasita/poço e meio RPMI como controle negativo, realizado para observar o desenvolvimento parasitário e o surgimento da cor rosa na presença da resazurina, indicando a viabilidade celular do microrganismo utilizado no respectivo teste; Coluna 11-A até 11-H (verde claro), contém apenas meio RPMI, possibilitando a observação da esterilidade do meio nutritivo e a permanência da cor original da resazurina; Coluna 12-A até 12-H (cinza) contém pentamidina na concentração de 3,0  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>, meio RPMI e inóculo na concentração de 1,0 x 10<sup>6</sup> parasita/poço, como controle positivo.

As placas foram incubadas por 72 horas à 24 °C em incubadora de Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) de marca TE-371 BOD Tecnal. Após esse período, foi adicionada a resazurina em todos os poços e novamene incubadas por 5 h à 24 °C, adaptado de Rolón et al. (2006). Foi realizada leitura de fluorescência determinada por espectrofotômetro (Synergy HT – BioTek), programado com emissão de 590/35 e excitação 530/25, sendo os valores obtidos em URL (Unidade Relativa de Luz) que, por sua vez, tiveram seus dados processados através do Programa Gen5® 5.11 e representados em porcentagem de inibição de crescimento do parasita.

A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi realizada de forma visual, sendo definida como a menor concentração na qual não houve mudança de coloração do corante indicador rezasurina, da cor violeta (cor original) para o rosa (desenvolvimento parasitário).

Na sequência foi realizada análise de regressão linear através do Programa Estatístico Origin® 9.1 com significância  $p < 0,05$  e, Teste Tukey com nível de confiança de 95% com o uso do software Sisvar 5.6 (Build 86), para a observação da concentração capaz de inibir o crescimento no mínimo de 50% das formas promastigotas ( $CI_{50}$ ).

A categorização dos resultados obtidos foi embasado no trabalho de Veiga et al. (2021) e Mota et al. (2016), cujos critérios são:  $CI_{50} \leq 100 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$  → amostra ativa,  $CI_{50}$  entre 101 e 199  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  → amostra moderadamente ativa e  $CI_{50} \geq 200 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$  → amostra inativa.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O óleo essencial da resina da *Protium calendulinum*, foi analisado por CG-EM/EM para determinação de sua composição química. Em paralelo foram realizados ensaios biológicos para avaliação de atividade bactericida e leishmanicida.

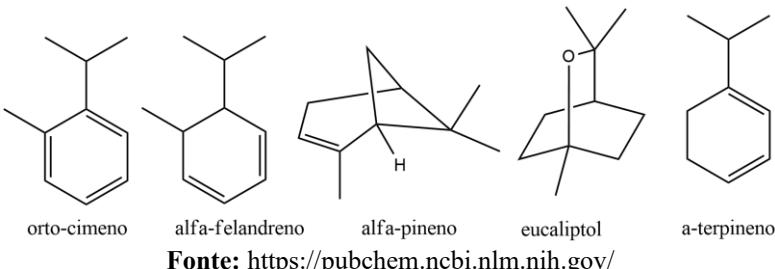
Na análise cromatográfica, dezesseis compostos foram detectados e 14 identificados (Tabela 1), correspondendo a 84,71% da composição total do óleo. O valor de 15,29% corresponde a compostos detectados, porém, não identificados pelos meios utilizados. Segundo o padrão de Margalho et al. (2020), observa-se como constituintes majoritários aqueles cuja abundância está acima de 5,0% (abundância > 5,0%), neste caso, *orto*-cimeno (27,52 %),  $\alpha$ -felandreno (17,73 %),  $\alpha$ -pineno (13,77 %), eucaliptol (6,47 %) e  $\alpha$ -terpineno (5,97 %) (Figuras 2 e 3). Todos os compostos identificados são terpenos e pode-se observar que estão divididos em duas categorias: monoterpenos (82,64%) e sesquiterpenos (2,07%) (Tabela 1) Os sesquiterpenos identificados foram o  $\alpha$ -cubebeno e  $\alpha$ -copaeno.

**Tabela 1:** Composição química do óleo essencial da resina de *P. calendulinum*.

Composto	<sup>1</sup> RI	<sup>2</sup> KI	<sup>3</sup> Teor (%)
<b>Monoterpenos hidrocarbonetos</b>			
$\alpha$ -pineno	6,56	938	13,77
Canfeno	6,95	953	0,40
$\beta$ -pineno	7,72	979	1,38
$\rho$ -ment-2-eno	8,35	985	1,75
$\alpha$ -felandreno	8,52	1004	17,73
$\alpha$ -terpineno	8,87	1018	5,97
<i>o</i> -cimeno	9,14	1029	27,52
$\alpha$ -terpinoleno	10,88	1087	1,59
<b>Monoterpenos oxigenados</b>			
Eucaliptol	9,29	1034	6,47
$\rho$ -mentan-8-ol	12,57	1162	4,89
Terpinen-4-ol	13,53	1178	0,52
$\alpha$ -terpineol	13,92	1191	0,65
<b>Sesquiterpenos hidrocarbonetos</b>			
$\alpha$ -cubebeno	18,31	1352	0,41
$\alpha$ -copaeno	19,01	1378	1,66
<b>Monoterpenos</b>			<b>82,64</b>
<b>Sesquiterpenos</b>			<b>2,07</b>
<b>TOTAL %</b>			<b>84,71</b>

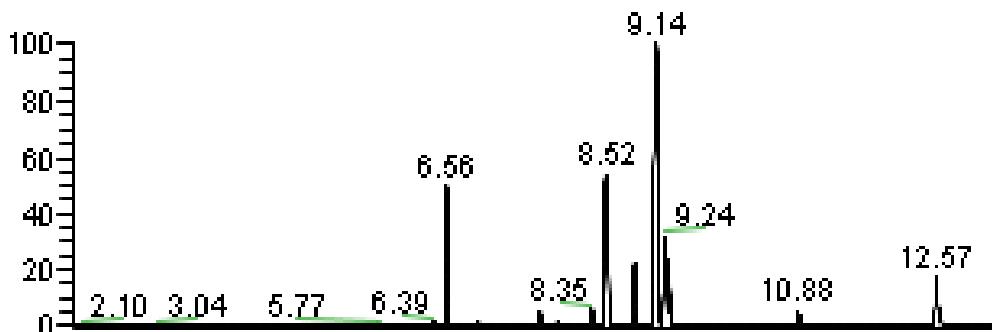
<sup>1</sup>RI: Retention Indices; <sup>2</sup>KI: Kovats Indices; <sup>3</sup>Porcentagem relativa do composto identificado

**Figura 2:** Estruturas químicas dos compostos majoritários (abundância > 5,0%) do óleo essencial da resina da *P. calendulinum*.



**Fonte:** <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

**Figura 3:** Cromatograma do óleo essencial da resina da *P. calendulinum*



**Fonte:** Compostos identificados de acordo com o Banco de Dados NIST 2.0

Levantamento prévio de resultados a nível de gênero pôde ser realizado, a fim de fazer comparações entre diferentes espécies de mesmo gênero. O trabalho de Mobin et al. (2017), que identificou os constituintes do óleo essencial da resina da *Protium heptaphyllum*, em sua maioria monoterpenos, tais como,  $\alpha$ -terpineol, eucaliptol, limoneno,  $\alpha$ -felandreno,  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno, entre outros, corrobora com a identificação dos compostos do óleo essencial da *P. calendulinum*. Mendes et al. (2019), ao analisarem os constituintes da mesma espécie, *P. heptaphyllum*, cita o  $\beta$ -felandreno,  $\rho$ -cimeno,  $\alpha$ -terpineol e  $\alpha$ -felandreno, como compostos de maior concentração em seu óleo.

Seguindo na mesma linha de pesquisa, a avaliação cromatográfica dos óleos essenciais da resina de duas espécies de *Protium* coletadas em Manaus-AM, *P. altsonii* e *P. hebetatum*, indicou os terpenos  $\alpha$ -pineno e  $\rho$ -cimeno, como compostos em maior quantidade. A análise da *Protium altsonii* apontou a presença de 42,9% de  $\alpha$ -pineno, 33,3% de  $\rho$ -cimeno, 7,3% de  $\beta$ -felandreno, 5,4% de  $\alpha$ -felandreno e 4,8% de eucaliptol (1,8-cineol). A *P. hebetatum* apresentou 8,6% para o  $\alpha$ -pineno, 74,6% de  $\rho$ -cimeno e 10,7% de  $\beta$ -felandreno, não pontuando a presença do eucaliptol.

Satyal et al. (2017) observaram o  $\delta$ -3-careno em alta concentração no óleo essencial da resina da espécie *Protium amazonicum* e, em menores quantidades, outros terpenos, tais como,  $\alpha$ -pineno,  $\alpha$ -terpineol,  $\rho$ -cimeno, limoneno, entre outros, destoando, em parte, da análise cromatográfica da *P.*

*calendulinum*, quando comparados seus constituintes majoritários. Silva et al. (2021) identificaram  $\alpha$ -felandreno,  $\alpha$ -pineno e  $\rho$ -cimeno, como monoterpenos majoritários na composição do óleo essencial da resina de *Protium hebetatum*, coletada no município de Mâncio Lima, no Acre. Ramos et al. (2000), estudando a mesma espécie, *P. hebetatum*, coletada em Manaus-AM, identificaram os compostos,  $\rho$ -cimeno e *orto*-pineno, como majoritários, em um total de cinco compostos identificados no óleo essencial de sua resina.

A *Protium rubrum*, coletada na Comunidade de São Pedro, na região da Amazônia Central, demonstrou a presença de dois monoterpenos majoritários, responsáveis por constituir cerca de 86% do óleo essencial de sua resina (MATTOSO et al., 2022). Siani et al. (2004), estudando a composição do óleo essencial da *P. icicariba*, identificaram o  $\rho$ -cimeno,  $\alpha$ -terpineno e  $\gamma$ -terpineno como compostos majoritários.

Em revisão bibliográfica, Rocha et al. (2022), avaliou a variabilidade na composição dos óleos essenciais obtidos de diferentes partes da *P. heptaphyllum*, descrevendo que, de 28 análises químicas diferentes, 21 foram realizadas de óleos essenciais extraídos da resina, e sete de outras partes da planta, perfazendo um total de 145 substâncias identificadas, o que demonstra o interesse em identificar e registrar a composição química do óleo essencial da resina produzida por plantas do gênero *Protium*. A classe dos monoterpenos foi a de maior destaque, sendo os terpenos, limoneno,  $\alpha$ -terpineol, eucaliptol,  $\rho$ -cimeno,  $\alpha$ -felandreno e  $\beta$ -felandreno, encontrados em maior porcentagem.

Em estudos realizados para impressões digitais ('fingerprints') de monoterpenos voláteis da resina em troncos de árvores danificadas do gênero *Protium*, Piva et al. (2019), observou o  $\alpha$ -pineno como o monoterpeno dominante mais comum (44,2% dos indivíduos) entre as 15 espécies estudadas de 77 indivíduos, seguidas por  $\alpha$ -felandreno, d-limoneno e  $\alpha$ -terpinoleno. Entre as espécies analisadas, a *P. calendulinum* demonstrou um único padrão de impressão digital, o  $\alpha$ -pineno, que esteve presente como padrão de monoterpeno dominante nos cinco indivíduos pesquisados desta espécie. Concluiu ainda que suas impressões digitais de monoterpenos são determinadas essencialmente de forma genotípica e não variam de modo substancial com o tempo, quando avaliadas em intervalo de dois anos.

O presente estudo para a *P. calendulinum* corrobora em parte com os achados de Piva et al. (2019), uma vez que,  $\alpha$ -pineno,  $\alpha$ -felandreno e  $\alpha$ -terpinoleno, marcam presença na composição monoterpênica do óleo de sua resina, porém, não houve indicação da presença do composto d-limoneno.

O interesse em pesquisar os óleos essenciais abrange ainda áreas diversificadas como a farmacêutica, alimentícia e cosmética. Diante disso é comumente importante avaliar o potencial

terapêutico desses óleos, cujos estudos, conforme já mencionados, vêm demonstrando resultados promissores (OLIVEIRA e MORAES, 2019; SANTANA et al., 2020; SILVA et al., 2021; SOARES et al., 2023; PINHEIRO et al., 2023; SCAPINELLO et al., 2024). Diante do interesse em avaliar potenciais atividades biológicas para plantas do gênero *Protium*, foram realizados teste bactericida e leishmanicida para o óleo essencial da resina da *Protium calendulinum*, vislumbrando, assim, uma possível fonte de novos fármacos ou à indicação de seu óleo como objeto de estudos futuros na busca por terapias alternativas no tratamento de doenças de importância clínica.

Analisando a Tabela 2, onde estão demonstrados os valores dos diâmetros dos halos de inibição formados para o óleo essencial da resina da *P. calendulinum* no teste de difusão em disco, utilizado in natura (20 µL), observam-se resultados sugestivos de atividade bactericida com a formação de halos de inibição entre 7,7 e 14,0 mm.

**Tabela 2:** Teste antimicrobiano de difusão em disco para o PCOE – Resina

Amostras	Halos de inibição (mm) <sup>1</sup>						
	Microrganismos						
	S.a.	MRSA	E.c.	P.a.	K.p.	A.b.	E. f.
PCOE-Resina	10±0,0	7,7±0,8	S/A	7,7±0,8	8,3±1,6	S/A	14,0±0,0
C+	20,7±1,0	22,3±1,5	25,3±3,3	8,7±1,0	21,0±1,7	9,3±1,0	19,7±3,0

PCOE – Resina (*Protium calendulinum* óleo essencial da resina); S.a.= *Staphylococcus aureus*; MRSA= *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina; E.c. = *Escherichia coli*; P.a. = *Pseudomonas aeruginosa*; K.p. = *Klebsiella pneumoniae*; A.b. = *Acinetobacter baumanii*; E.f. = *Enterococcus faecalis*; C + = Controle positivo (cloranfenicol à 5 µg.mL<sup>-1</sup>); S/A = Sem atividade (ausência de halos). Nota: <sup>1</sup> = Média aritmética de seis poços, incluindo 6mm de cada disco ± desvio padrão.

O teste de difusão em disco, realizado para sete espécies de bactérias, demonstrou a formação de halos de inibição do óleo essencial da resina da *P. calendulinum* frente à *S. aureus* (halo = 10 mm), MRSA (halo = 7,7 mm), *P. aeruginosa* (halo = 7,7 mm), *K. pneumoniae* (halo = 8,3 mm) e *E. faecalis* (halo = 14 mm), não havendo formação de halos na presença das espécies *E. coli* e *A. baumannii*. A média de formação dos halos do controle positivo variou entre 8,7 a 25,3 mm. Diante dos resultados e de acordo com a categorização adotada por Ponce et al. (2003), as espécies *S. aureus*, *K. pneumoniae* e *E. faecalis*, podem ser apontadas como sensíveis (halos entre 9 e 14 mm), enquanto as espécies MRSA e *P. aeruginosa*, são consideradas não sensíveis (halo ≤ 8 mm) à presença do óleo do PCOE-Resina.

Estudos de composição química e atividade bacteriana realizados por Silva et al. (2021) para o óleo essencial da *Protium hebetatum*, identificaram os compostos α-felandreno (17,36%), *E*-cariofileno (11,16%), germacreno-D (10,24%), α-pineno (9,16%), γ-cadineno (7,58%) e β-cimeno (7,24%), como majoritários, apresentando atividade bactericida especificamente contra bactérias

gram-negativas, tais como *E. coli* e *K. pneumoniae*, com formação de halos de inibição de 7,67 e 8,50 mm, respectivamente. A *Protium neglectum* demonstrou os monoterpenos oxigenados como o grupo mais representativo (78,4%), como compostos majoritários a piperitenona (25,4%), timol (17,5%), durenol (15,6%), metil eugenol (9,2%),  $\alpha$ -terpineol (6,9%) e  $\rho$ -cimeno (5,2%), apresentando atividade microbicida frente à espécie *Bacillus subtilis* (SUÁREZ et al., 2013).

Bandeira et al. (2005) relata que para o óleo essencial da resina da *P. heptaphyllum*, rico em  $\alpha$ -pineno (10,5%),  $\alpha$ -felandreno (16,7%), limoneno (16,9%) e terpinoleno (28,5%), indicaram halos de inibição para *S. aureus* (20 mm), *K. pneumoniae* (19 mm), *E. coli* (18 mm), não apresentando atividade para *P. aeruginosa*. Lima et al. (2016), avaliando o óleo essencial da resina para a mesma espécie, *P. heptaphyllum*, em teste de microdiluição seriada, não observou atividade frente às cepas *S. aureus*, *E. coli* e *E. faecallis*, considerando amostras ativas aquelas cujas CIM's apresentam valores menores ou iguais a 0,5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  ( $\text{CIM} \leq 0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ).

Lima et al. (2016) ainda avaliou a composição do óleo essencial da resina extraído em anos diferentes, com intervalo de dois anos entre as coletas, listando o 3-careno (15,0%), limoneno (22,0%) e terpinoleno (32,70%), como compostos majoritários na primeira coleta;  $\rho$ -cimeno-8-ol (10,12%),  $\alpha$ -tujeno (11,05%),  $\rho$ -cimeno (26,66%) e terpinoleno (35,81%), na segunda coleta;  $\rho$ -cimeno-8-ol (6,6%), terpinoleno (37,78%) e  $\rho$ -cimeno (38,08%), na terceira coleta, pontuando que a composição do óleo essencial da resina da espécie, assim como as demais espécies vegetais, podem produzir compostos iguais em teores diferentes ou compostos distintos, quando estes estão sob a influência de fatores externos, tais como, região de cultivo, período, parte da planta coletada, índice de radiação solar, sazonalidade, temperatura, ciclo circadiano, disponibilidade hídrica e de nutrientes, método de extração utilizado, método de análise, forma de preparo da matéria prima, entre outros (BOTREL et al., 2010; AIZZO et al., 2024). Neste caso, tornam-se viáveis a realização de estudos futuros sobre a variabilidade química sazonal do óleo essencial a *P. calendulinum*, a fim de se verificar diferenças relevantes em sua composição química.

O potencial terapêutico dos óleos essenciais pode estar relacionado aos seus compostos majoritários constituintes e seriam os responsáveis pelas ações biológicas acentuadas desse óleo (BASSOLÉ e JULIANI, 2012). Sendo assim, no presente trabalho a atividade bactericida demonstrada no teste de difusão em disco para a *P. calendulinum* pode estar associada ao teor elevado de *orto*-cimeno (27,52 %). Ou ainda, segundo Silva et al. (2012), a ação conjunta de suas substâncias constituintes podem ser as responsáveis por essas atividades, uma vez que aos terpenos são atribuídas atividades bactericida (GOULART et al, 2018; SANTOS et al., 2019; SANTOS et al., 2022; SOUZA et al., 2022; SILVA et al., 2023; PINHO et al., 2024), antiaderente (SILVA et al., 2023), anti-

inflamatória (PACÍFICO et al., 2018; SANTOS et al., 2022; PINHO et al., 2024), antiproliferativa (PACÍFICO et al., 2018), antifúngica (SANTOS et al., 2022), antioxidante (PINHO et al., 2024), antisséptica (SANTOS et al., 2022), antiparasitária (SANTANA et al., 2020), entre outras.

Silva et al. (2012), avaliando a composição química e atividade antimicrobiana para os óleos essenciais de breu branco e breu preto em espécies de *Protium*, comercializadas em mercados populares no Brasil observou que, das dez amostras coletadas, nove apresentaram o  $\rho$ -cimeno como composto principal, com teores entre 21,9 e 51,9% e apenas uma amostra apontou o  $\alpha$ -pineno (22,7%) como majoritário. Os monoterpenos foram os compostos mais comuns encontrados nessas amostras tais como  $\beta$ -pineno,  $\alpha$ -terpineol,  $\beta$ -felandreno,  $\alpha$ -felandreno, trans-dihidro- $\alpha$ -terpineol,  $\alpha$ -terpineno. Das amostras testadas, apenas uma demonstrou atividade bactericida classificada como discreta, sendo esta amostra rica em  $\gamma$ -cadineno (10,3%) e  $\alpha$ -pineno (19,9%), sesquiterpeno e monoterpeno, respectivamente.

Silva et al. (2012) defende ainda que ambos os compostos ( $\gamma$ -cadineno e  $\alpha$ -pineno) podem agir de maneira conjunta para uma atividade bactericida. O que nos leva a acreditar que, diante dos resultados obtidos para a *Protium calendulinum*, com resultados bactericidas promissores, frente a cinco espécies bacterianas, alguns compostos podem estar agindo de forma conjunta, gerando estes resultados.

Em comparação ao trabalho de Silva et al. (2012), a presente pesquisa para a *P. calendulinum* não demonstrou a presença do  $\gamma$ -cadineno, porém, apresentou em teores consideráveis, conforme mencionado anteriormente, outros compostos também conhecidos por suas propriedades biológicas, como o próprio  $\alpha$ -pineno, que é um composto frequente na constituição de óleos essenciais de diversas espécies e é centro de discussões sobre seu possível efeito sinérgico, possuindo notáveis atividades farmacológicas frente a bactérias e fungos, além de atividades anti-inflamatória, antioxidante e antiparasitária (KIM et al., 2015; BARON et al., 2018; UTEGENOVA et al., 2018; KARTHIKEYAN et al., 2018; SANTANA et al., 2020; FENG et al., 2020; ESTEVES e ECKER, 2020).

O *orto*-cimeno, por sua vez, é conhecido por suas propriedades inseticida, repelente, aromatizante e antioxidante (WOJTUNIK-KUZESZA et al., 2018; FENG et al., 2020; ESTEVES e ECKER, 2020). O  $\alpha$ -felandreno, apresenta atividades biológicas contra bactérias, fungos e leveduras, e tem demonstrado atividade anti-inflamatória, antinociceptiva e antioxidante (SIQUEIRA et al., 2016; WOJTUNIK-KUZESZA et al., 2018). O  $\alpha$ -terpineno comprovou ser um potente antioxidante e possui atividade antifúngica e antimicrobiana (CONSENTINO et al., 1999; SIBANDA et al., 2004; WOJTUNIK-KUZESZA et al., 2018). O eucaliptol tem seu uso difundido na fitoterapia e aromaterapia, possuindo atividade redutora de muco, descongestionante nasal, anti-inflamatória, anti-

hipertensiva, anti-viral, anti-parasitária, antioxidante e bactericida (SOUTO et al., 2016; ANDRADE et al., 2017; WOJTUNIK-KUZESZA et al., 2018; SANTANA et al., 2020; JUERGENS et al., 2020; PINHEIRO et al., 2023).

Diante do exposto, observam-se inúmeras propriedades terapêuticas comuns atribuídas a seus constituintes majoritários, podendo indicar ação conjunta nos resultados obtidos para o teste de difusão em disco frente às espécies bacterianas (BASSOLÉ e JULIANI, 2012; SILVA et al., 2012).

Segundo Valeriano et al. (2012), devido à natureza lipídica dos compostos terpênicos, constituintes majoritários dos óleos essenciais, ocorre a entrada destes na célula bacteriana através da camada de lipopolissacarídeos da parede celular, ocorrendo o rompimento da célula, resultando na atividade bactericida desses óleos.

Nos grupos de bactérias gram-positivas e gram-negativas há uma diferença significativa quanto à sensibilidade a esses compostos terpênicos. Devido às diferenças na estrutura da parede celular bacteriana, em ambos os grupos de bactérias, atribui-se às gram-negativas maior resistência à ação de substâncias potencialmente bactericidas. Essa alusão à resistência maior em gram-negativas se deve à estrutura de sua parede celular, constituída por uma membrana externa formada por lipopolissacáideos, fosfolipídeos e proteínas (porinas), conferindo-lhe certa impermeabilidade aos agentes antibióticos. Já as bactérias gram-positivas são formadas por uma parede celular que geralmente não cerceia a entrada de substâncias tóxicas (LAMBERT, 2002).

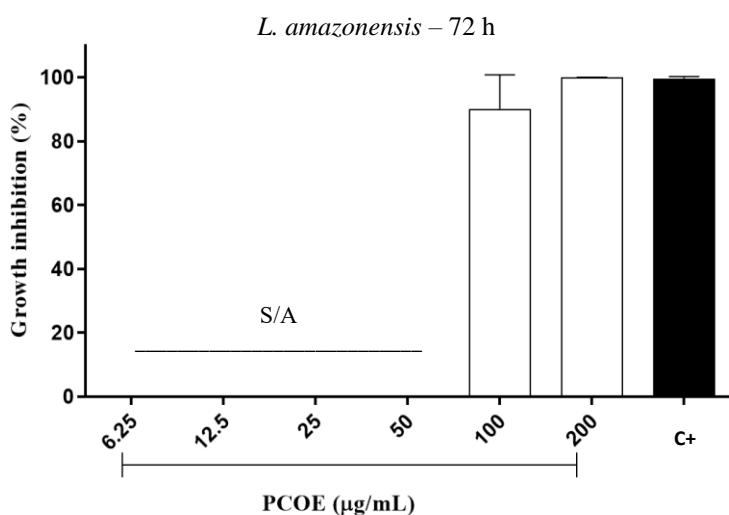
Entretanto, o óleo essencial da resina da *Protium calendulinum*, no presente estudo, demonstrou resultados frente a espécies gram-positivas (*S. aureus*, MRSA e *E. faecalis*) e gram-negativas (*P. aeruginosa* e *K. pneumoniae*), divergindo do esperado, o que pode ser atribuído ao fato de os constituintes majoritários do óleo da resina da *P. calendulinum* serem compostos terpênicos de natureza lipídica, permitindo, assim, um melhor fluxo para dentro da célula bacteriana, o que alteraria a permeabilidade da membrana citoplasmática do microrganismo (HARRIS, 2002).

Em paralelo, realizou-se teste para avaliar a atividade leishmanicida do óleo essencial da resina de *P. calendulinum*, contra as formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*, demonstrado na Figura 4 e Tabela 3.

A Figura 4, cujo gráfico demonstra o Índice de Inibição de Crescimento (IIC %) do óleo essencial da resina em diferentes concentrações frente ao parasita, em comparação ao controle positivo, não demonstrou atividade leishmanicida nas seis primeiras concentrações, no intervalo de 1,5625 a 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Porém, nas concentrações de 100 e 200  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , o óleo essencial da resina da *P. calendulinum* demonstrou Índices de Inibição de Crescimento médios de 93 e 100%,

respectivamente, valores próximo e igual ao IIC do controle positivo (pentamidina), também correspondente a 100%.

**Figura 4:** Índice de Inibição de Crescimento do óleo essencial da resina da *P. calendulinum* sobre as formas promastigotas de *L. amazonensis* após 72 horas de incubação.



PCOE = *Protium calendulinum* óleo essencial da resina; S/A Sem atividade leishmanicida na faixa de concentração de 1,5625 a 50  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ; C + = Controle positivo (pentamidina à 3,0  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ). Notas: O  $\text{CI}_{50}$  (média) do controle positivo resultou em 0,3  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  (demonstrado em testes prévios). Os dados apresentados são representativos de dois experimentos independentes. Todas as curvas dose-resposta mostram  $R^2$  (média) acima de 0,95.

**Tabela 3:** Valores de CIM e  $\text{CI}_{50}$  do óleo essencial da resina da *P. calendulinum* frente a formas promastigotas de *L. amazonensis* após 72 horas de incubação.

Amostras	CIM ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) <sup>1</sup>	$\text{CI}_{50}$ ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) <sup>1</sup>
PCOE-Resina	100 $\pm$ 0,02	96,08 $\pm$ 0,37
C+	*	0,3 $\pm$ 0,0

PCOE-Resina = *Protium calendulinum* do óleo essencial da resina; C+ = Controle positivo (pentamidina à 3,0  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ); \*: Não foram observados valores de CIM para o controle positivo no presente teste. Nota: <sup>1</sup> = Resultados expressos como média aritmética dos valores  $\pm$  desvio padrão.

O teste leishmanicida para o óleo essencial da resina da *P. calendulinum* ainda demonstrou CIM de 100  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  e  $\text{CI}_{50}$  de 96,08  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ . Segundo os critérios utilizados por Veiga et al. (2021) e Mota et al. (2015), avalia-se o resultado de  $\text{CI}_{50}$  de 96,08  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  como biologicamente ativo frente às formas promastigotas de *L. amazonensis*, pois encontra-se com valores  $\leq$  100  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ .

Os óleos essenciais da resina de *Protium altonii* e *Protium hebetatum*, demonstraram atividade leishmanicida frente a formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*, com  $\text{CI}_{50}$  de 14,8  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  e 0,46  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , respectivamente. Seus compostos majoritários, eucaliptol,  $\alpha$ -pineno e  $\rho$ -cimeno, testados de forma isolada, demonstraram atividade leishmanicida dose-dependente frente às

formas amastigotas de *L. amazonensis* (SANTANA et al., 2020). Diante dos resultados obtidos, os próprios autores sugerem que as propriedades leishmanicidas desses compostos podem ser exploradas em testes de sinergismo, com a finalidade de se desenvolver novos medicamentos.

O  $\alpha$ -pineno apresentou atividade leishmanicida frente às formas promastigotas de *L. amazonensis* com  $CI_{50}$  de 19,7  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  nos estudos de Franca et al. (2015); eucaliptol  $CI_{50}$  de 568,1  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (SILVA et al., 2017) e  $CI_{50}$  72,4  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (CAMARGOS et al., 2014).

Santana et al. (2020) avaliou os compostos majoritários dos óleos essenciais do gênero *Protium*, como o eucaliptol,  $\alpha$ -pineno e  $\beta$ -cimeno, e observou que tais substâncias apresentam atividade contra a forma amastigota da *L. amazonensis* sendo, inclusive, capazes de modificar a estrutura lipídica da forma promastigota dessa espécie de parasita, além de não demonstrarem toxicidade à célula hospedeira em nenhuma das concentrações testadas (50-200  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Além disso, não demonstraram ser empecilho para a capacidade fagocítica de macrófagos, cuja função é crucial na eliminação de patógenos. Quanto às alterações ocorridas no perfil lipídico das formas promastigotas de *L. amazonensis*, o eucaliptol reduziu o triacilglicerol em 46%, o  $\alpha$ -pineno produziu um aumento de 45% e o  $\beta$ -cimeno foi responsável por um aumento de 26% desse lipídeo, indicando a permeabilidade dos terpenos e influência nas funções básicas da célula.

Allmann et al. (2014) defende que os triacilgliceróis (lipídeo neutro), sejam reservatórios de ácidos graxos nesses parasitas, sob a forma de corpos lipídicos, para serem usados como fontes de energia quando necessário. Por conseguinte, Santana et al. (2020) pontuou que a aplicação do eucaliptol, como um dos componentes comuns no gênero *Protium*, causaria estresse sobre o parasita, forçando-o ao consumo de reservas lipídicas para sua sobrevivência. Camargos et al. (2014) corroboram com a possível ação dos terpenos sobre as partes lipídicas da membrana plasmática da *Leishmania*, já que não foram observadas em seus estudos alterações na dinâmica das proteínas na membrana do parasita, fortalecendo a ideia de que a ação dos terpenos é restrita ao componente lipídico desta.

Do mesmo modo, atividade leishmanicida demonstrada pelo óleo essencial extraído de outras partes aéreas de espécies do gênero *Protium* tem sido reportada. Estevam et al. (2017), analisando atividades biológicas frente às formas promastigotas de *L. amazonensis* do óleo essencial das folhas de *Protium ovatum*, rico em mono e sesquiterpenos majoritários, tais como, espatulenol (17,6%), óxido de cariofileno (16,4%),  $\beta$ -cariofileno (14,0%) e mirceno (8,4%), observou  $CI_{50}$  de 2,28  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . O óleo essencial de folhas jovens de *Protium heptaphyllum* apontou  $CI_{50}$  de 9,02  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e de folhas adultas  $CI_{50}$  de 28,88  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , frente a formas promastigotas de *L. amazonensis* (CABRAL et ak., 2021). Ressalta-se que os compostos majoritários encontrados nas folhas jovens foram o  $\beta$ -cariofileno

(15,1%),  $\alpha$ -amorfeno (9,4%),  $\alpha$ -cpaeno (8,1%) e nas folhas adultas foram o  $\beta$ -cariofileno (15,0%),  $\alpha$ -amorfeno (9,1%),  $\alpha$ -cpaeno (8,0%). O óleo essencial dos frutos verdes da *Protium heptaphyllum*, rico em limoneno (82%), demonstrou  $CI_{50}$  34,9  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  quando avaliado frente à *L. amazonensis* em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c (HOUËL, et al., 2015).

Diante das avaliações observadas para o óleo essencial da resina da *P. calendulinum*, acredita-se em possíveis pesquisas futuras com grandes chances de se obter resultados ainda mais promissores para a espécie. Outras possibilidades para uma sequência de ações em busca de mais resultados para o óleo essencial da resina da *P. calendulinum* reside em realizar análises químicas de variabilidade sazonal da composição deste óleo; teste de sinergismo/antagonismo; teste modulador de resistência bacteriana; teste bactericida de microdiluição seriada com as mesmas espécies bacterianas e/ou demais espécies; teste leishmanicida para outras formas do parasita, como forma amastigota, por exemplo; teste de citotoxicidade; testes larvicidas e de repelência para espécies endêmicas de mosquitos; testes antitumorais; teste antioxidant, entre outros.

#### 4 CONCLUSÃO

A análise da composição química do óleo essencial da resina da *Protium calendulinum*, extraída de espécime localizada na ESEC- Cuniã, no município de Porto Velho/RO, indicaram a presença dos grupos terpênicos: monoterpenos hidrocarbonetos, monoterpenos oxigenados e sesquiterpenos.

Os compostos majoritários foram o *o*-cimeno (27,52 %),  $\alpha$ -felandreno (17,73 %),  $\alpha$ -pineno (13,77 %), eucaliptol (6,47 %) e  $\alpha$ -terpineno (5,97 %). Os monoterpenos foram responsáveis por 82,64% e os sesquiterpenos por 2,07% da composição total do óleo essencial da resina.

O óleo essencial demonstrou atividade bactericida, quando usado in natura (20  $\mu\text{L}$ ), frente às espécies gram-positivas *S. aureus*, MRSA e *E. facecalis* e gram-negativas *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae*, com formação de halos de inibição de crescimento bacteriano entre 7,7 e 14,0 mm e não indicando atividade frente às espécies *E. coli* e *A. baumannii*. Apontou atividade leishmanicida frente à forma promastigota da *L. amazonensis* nas concentrações de 100  $\mu\text{g/mL}$ , com Índice de Inibição de Crescimento de 93% e 200  $\mu\text{g/mL}$ , com Índice de Inibição de Crescimento de 100%. A CIM observada foi de 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e  $CI_{50}$  de 96,08  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

Diante dos resultados observados acredita-se na continuidade dos estudos com a *Protium calendulinum* a fim de se obter uma possível fonte de novo(s) fármaco(s) ou à indicação de seu óleo como objeto de estudos futuros no combate a microrganismos de outras espécies.

## AGRADECIMENTOS

Laboratório de Fitoquímica da Universidade Federal de Rondônia (LABFITO – UNIR); Centro de Estudos de Biomoléculas Aplicadas à Saúde (CEBio FIOCRUZ-RO); Programa de Pós-graduação em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente (PGDRA – UNIR); Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Rondônia (IFRO); Laboratório de Apoio ao Desenvolvimento Tecnológico (LADETEC) do Instituto de Química Universidade Federal de Rio de Janeiro (IQ-UFRJ); Laboratório da Plataforma de Bioensaios em Malária e Leishmaniose da Fiocruz/RO (PBML-FIOCRUZ-RO); Laboratório de Microbiologia da Fiocruz/RO (FIOCRUZ-RO).

## REFERÊNCIAS

ADAMS, R.P. Identification of essential oil components by gas Cromatography/Mass Spectrometry. 4. ed. Chicago (IL): Allured Publishing Corporation, 2007.

AIZZO, J.R., S., MANZATTO, A.G., SAMPAIO, A.F., AZEVEDO, M.S. Variabilidade química do óleo essencial da *Piper obliquum* Ruiz & Pav. da Estação Ecológica Cuniã, Porto Velho-RO. Sci. Plena. 2024 Nov; 20(1):017201, doi:10.14808/sci.plena.2024.017201

ALLMANN, S., MAZET, M., ZIEBART, N., BOUYSSOU, G., FOUILLEN, L., DUPUY, J. W., et al. Triacylglycerol storage in lipid droplets in procyclic *Trypanosoma brucei*. PLoS One. 2014 Dez;9(12): e114628, doi:10.1371/journal.pone.0114628

ANDRADE, T.A., FREITAS, T.S., ARAÚJO, F.O., MENEZES, P.P., DÓRIA, G.A.A., RABELO, A.S., et al. Caracterização físico-química e atividade antibacteriana de complexos de inclusão do óleo essencial de *Hyptis martiusii* Benth em β-ciclodextrina. Biomed Pharmacother. 2017 Jan;89:201-207, doi: 10.1016/j.biopharm.2017.01.158

BANDEIRA, P.N., FONSECA, A.M., COSTA, S.M.O., LINSA, M.U.D.S., PESSOA, O.D.L., MONTEA, F.J.Q., et al. Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil of resin of *Protium heptaphyllum*. Nat Prod Comunic. 2005 Nov;1(2):117-120, doi:10.1177/1934578X0600100207

BARATA, A.C., ANTUNES, N.T.B., PAIVA, R.C., NOGUEIRA, S.R.P., NUNES, J.S., FREITAS, O.S.P. Análise fitoquímica e potencial alelopático do extrato etanólico das folhas de *Protium calendulinum* (Burseraceae) na germinação de *Lactuca sativa*. Diversitas J. 2020 Out;5(4):2660-2675, doi: 10.17648/diversitas-journal-v5i4-1092

BARON, E.P., LUCAS, P., EADES, J., HOGUE, O. Patterns of medicinal cannabis use, strain analysis, and substitution effect among patients with migraine, headache, arthritis, and chronic pain in a medicinal cannabis cohort. J Headache Pain. 2018 Mai;24(1):37:1-28, doi: 10.1186/s10194-018-0862-2

BASSOLÉ, I.H.N., JULIANI, H.R. Essential oils in combination and their antimicrobial properties. Mol. 2012 Abr;17(4):3989-4006, doi: 10.3390/molecules17043989

BIESDORF, V.L.N., ZILOTTI, L.T., FARIA, G.N., LINARTEVICHI, V.F. Perfil de resistência da *Escherichia coli* em uroculturas em 2020 em Cascavel/PR. Res, Soc Dev. 2022 Fev;11(3):e32611326643, doi: 10.33448/rsd-v11i3.26643

BOTREL, P.P., PINTO, J.E.B.P., ARAÚJO, A.C.C., BERTOLUCCI, S.K.V., FIGUEIREDO, P.H., FERRI, D.P.C. Variações no teor e na composição volátil de *Hyptis marruboides* Epl. cultivada no campo e em casa de vegetação. Quím Nova [Internet]. 2010 [citado em 15 out 2024];33(1):33-7. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422010000100007>

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar [Internet]. Brasília (DF): MS; 2017. [citado em 22 nov 2024]. Disponível em: [https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual\\_vigilancia\\_leishmaniose\\_tegumentar.pdf](https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar.pdf).

BRAZ FILHO, R. Contribuição da Fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. Quím Nova [Internet]. 2010 [citado em 30 nov 2024];33(1):229-39. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422010000100040>

CABRAL, R.S.C., FERNANDES, C.C., DIAS, A.L.B., BATISTA, H.R.F., MAGALHÃES, L.G., PAGOTTI, M.C., et al. Essential oils from *Protium heptaphyllum* fresh young and adult leaves (Burseraceae): chemical composition, in vitro leishmanicidal and cytotoxic effects. J Essent Oil Res. 2021 Jan;33(3):276-82, doi: 10.1080/10412905.2020.1848651

CAMARGOS, H.S., MOREIRA, R.A., MENDANHA, S.A., FERNANDES, K.S., DORTA, M.L., ALONSO, A. Terpenes increase the lipid dynamics in the *Leishmania* plasma membrane at concentrations similar to their IC<sub>50</sub> values. PLoS One. 2014 Ago;9(8):e104429, doi: 10.1371/journal.pone.0104429

CASADEVALL, A., PIROFSKI, L.A. Host-pathogen interactions: Basic concepts of microbial commensalism, colonization, infection, and disease. Infect Immun. 2000 Dez;68(12):6511-8, doi: 10.1128/IAI.68.12.6511-6518.2000

CONSENTINO, S., TUBEROSO, C.I., PISANO, B., SATTA, M., MASCIA, V., ARZEDI, E., et al. In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. Lett Appl Microbiol. 1999 Ago;29(2):130-5, doi: 10.1046/j.1472-765x.1999.00605.x

CORRÊA, M.P. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Volume I. 1. ed. Rio de Janeiro (RJ): Imprensa Nacional; 1926.

ESTEVAM, E.B.B., DEUS, I.P.B., SILVA, V.P., SILVA, E.A.J., ALVES, C.C.F., ALVES, J.M., et al. In vitro antiparasitic activity and chemical composition of the essential oil from *Protium ovatum* leaves (Burceraceae). An Acad Bras Ciênc [Internet]. 2017 [citado em 28 Nov 2024];89:3005-13. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0001-3765201720170310>

ESTEVES, F.M., ECKER, A.B.S. Avaliação da atividade antimicrobiana in vitro do óleo essencial de *Eucalyptus urograndis* em cepas padrão de bacilos gram-negativos. Rev. Uningá [Internet]. 2020 [citado em 20 nov 2024];57(1):11-23. Disponível em: <https://revista.uninga.br/uninga/article/view/3330>

FENG, Y., ZHANG, X., WANG, Y., CHEN, Z., LU, X., DU, Y., et al. The potential contribution of cymene isomers to insecticidal and repellent activities of the essential oil from *Alpinia zerumbet*, Int Biodeterior Biodegradation. 2020 Nov;157:105138, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2020.105138>

FERNANDEZ, M.H., SCUDELLER, V.V. Identificação morfológica dos breus (*Protium burm. f. e Tetragastris* Gaertn.) da Reserva de Desenvolvimento Sustentável do Tupé, Manaus-AM. In: Santos-Silva EM, Scudeller VV, Cavalcanti MJ, organizators. BioTupé: Meio Físico, Diversidade Biológica e Sociocultural do Baixo Rio Negro, Amazônia Central, v. 03, Manaus (AM):Rizoma Editorial; 2011. p.169-85.

FRANCA, R.K.A., AMORIM, L.V., DIA, S C.N., MORAES, D.F.C., CARNEIRO, S.M.P., AMORIM, C.F.A. *Syzygium cumini* (L.) skeels essential oil and its major constituent  $\alpha$ -pinene exhibit anti-leishmania activity through immunomodulation in vitro. J Ethnopharmacol. 2015 Fev;160:32-40, doi: 10.1016/j.jep.2014.11.024

GOULART, A.L.R.M., VIEIRA, H.G., MAGALHÃES, J.C., LIMA, M.I.P., CRETON, J.R.G. Atividade antibacteriana do óleo essencial extraído da casca da laranja pêra frente às bactérias da família *Enterobactereacea*. *Acta Biomed Bras.* 2018 Dez;9(2):117-23, doi: 10.18571/acbm.178

HARRIS, R. Sinergism in the essential oil world. *Int J Aromather.* 2002 Dez;12(4): 179-86, doi: 10.1016/S0962-4562(02)00083-8

HOUËL, E., GONZALES, G., BESSIÈRE, J.M., ODONNE, G., EPARVIER, V., DEHARO, E., et al. Therapeutic switching: from antidermatophytic essential oils to new leishmanicidal products. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2015 Fev;110(1):106-13, doi: 10.1590/0074-02760140332.

JUERGENS, L.J., WORTH, H., JUERGENS, U.R. New perspectives for mucolytic, anti-inflammatory and adjunctive therapy with 1,8-cineole in COPD and asthma: review on the new therapeutic approach. *Adv Ther.* 2020 Mai;37(5):1737-1753. doi: 10.1007/s12325-020-01279-0

KARTHIKEYAN, R., KANIMozhi, G., PRASAD, G.K., AGILAN, B., GANESAN, M., SRITHAR, G. Alpha pinene modulates UVA-induced oxidative stress, DNA damage and apoptosis in human skin epidermal keratinocytes. *Life Sci.* 2018 Nov;212:150-8, doi: 10.1016/j.lfs.2018.10.004

KIM, D.S., LEE, H.J., JEON, Y.D., HAN, Y.H., KEE, J.Y., KIM, H.J., et al. Alpha-pinene exhibits anti-inflammatory activity through the suppression of MAPKs and the NF-κB pathway in mouse peritoneal macrophages. *Am J Chin Med.* 2015;43(4):731-42, doi: 10.1142/S0192415X15500457

LAMBERT, P.A. Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in Gram-positive bacteria and mycobacteria. *J Appl Microbiol.* 2002 Mai;92 Suppl 1:46S-54S, doi: 10.1046/j.1365-2672.92.5s1.7.x

LANGENHEIM, J.H. Plant resins: chemistry, evolution, ecology, and ethnobotany. 1. Ed. Portland(OR): Timber Press; 2003.

LANGFORD, B.J., SO, M., RAYBARDHAN, S., LEUNG, V., WESTWOOD, D., MACFADDEN, D.R., et al. Bacterial co-infection and secondary infection in patients with COVID-19: a living rapid review and meta-analysis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2020 Jul;26(12):1622-29, doi: 10.1016/j.cmi.2020.07.016

LIMA, E.M., CAZELLI, D.S.P., PINTO, F.E., MAZUCO, R.A., KALIL, I.C., LENZ, D., et al. Essential oil from the resin of *Protium heptaphyllum*: chemical composition, cytotoxicity, antimicrobial activity, and antimutagenicity, *Pharmacogn Mag*, 2016 Jan;12(45):42-6, doi: 10.4103/0973-1296

LIMA, E.R., MOREIRA, L.S., FACUNDO, V.A., SILVA-JARDIM, I., TELES, C.B.G. Avaliação da bioatividade do extrato etanólico e triterpeno lupano obtidos de *Cobretum leprosum* contra microorganismos. *Saber Cient [Internet].* 2011 [citado em 13 jan 2025];3(1):53-69. Disponível em: <https://periodicos.saolucas.edu.br/index.php/resc/article/view/1156/1008>

LOUREIRO, R.J., ROQUE, F., RODRIGUES, A.T., HERDEIRO, M.T., RAMALHEIRA, E. O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. *Port J Public Health.* 2016 Jan;34(1):77-84, doi: 10.1016/j.rpsp.2015.11.003

LOWY, F.D. *Staphylococcus aureus* infections. N Engl J Med. 1998 Ago;339(8):520-32, doi: 10.1056/nejm199808203390806

MARGALHO, J.F., FERREIRA, G.K.S., VASCONCELOS, F.M., SILVA JÚNIOR, O.S. da, CASCAES, M.M., NASCIMENTO, L.D., et al. Avaliação dos óleos essenciais das folhas, ramos e frutos de *Nectandra cuspidata* (Lauraceae). Braz J Dev. 2020 Jun;6(6):41346-55, doi: 10.34117/bjdv6n6-611

MATTOSO, E., ANJOS, C. dos, BARATA, L., MARSAIOLI, A. Two Woody scented oils from the Amazonian Forest. J. Braz. Chem. Soc. 2022 Fev; 33(2):191- 5, doi: 10.21577/0103-5053.20210136

MENDES, J.L., ARAÚJO, T.F. de, CARVALHO, M.G. de, CATUNDA JÚNIOR, F.E.A., COSTA, R.A. Chemical composition and mechanism of vibriocidal action of essential oil from resin of *Protium heptaphyllum*. The Scientific World Journal. 2019 Out;2019:1-6, doi: 10.1155/2019/9563213

MOBIN, M., LIMA, S.G.D., ALMEIDA, L.T.G., SILVA FILHO, J.C., ROCHA, M.S., OLIVEIRA, A.P., et al. Gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry analysis and vasorelaxant effect of essential oil from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March.. Biomed Res Int. 2017 Ago;2017:1-6, doi: 10.1155/2017/1928171

MORS, W.B., RIZZINI, C.I. Useful Plants of Brazil. 1. ed. São Francisco (CA): Holden Day; 1966.

MOTA, E.F., ROSARIO, D.M., VEIGA, A.S.S., BRASIL, D.S.B., SILVEIRA, F.T., DOLABELA, M.F. Biological activities of *Croton palanostigma*. Klotzsch. Pharmacogn Mag. 2016 Fev;12 Suppl 1:S96-S101, doi: 10.4103/0973-1296.176109

NOBRE, H.S.M.F., AZEVEDO, M.S. de, MATOS, N.B., MANZATTO, A.G., ROMÃO, N.F., AIZZO, J.R., et al. Avaliação da atividade antimicrobiana de extrato, frações e óleo essencial da *P. calendulinum* Ruiz e Pavon – ESEC Cuniã, Porto Velho, Rondônia. South Am J Basic Educ., Tech Technol [Internet]. 2019 [citado em 29 nov de 2024];6(1):48-66. Disponível em: <https://periodicos.ufac.br/index.php/SAJEBTT/article/view/2450/1565>

OLIVEIRA, L.C.B.S.D. de, CARNEIRO, P.P.M., FISCHER, R.G., TINOCO, E.M.B.A. Presença de patógenos respiratórios no biofilme bucal de pacientes com pneumonia nosocomial. Rev. Bras. Ter. Intensiva [Internet]. 2007 [citado em 28 nov 2024];19(4):428-33. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0103-507X2007000400004>

OLIVEIRA, S. de, MORAES, C.A.P. Desenvolvimento de uma emulsão o/a associada ao óleo essencial de gerânio (*Pelargonium graveolens*) e ao óleo essencial de palmarosa (*Cymbopogon martinii*). Braz J Nat Sci [Internet]. 2019 [citado em jul 2024];2(3):127-38. Disponível em: <https://doi.org/10.31415/bjns.v2i3.64>

OMS/OPAS: ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE. 55º Conselho Diretor /68º Sessão do Comitê Regional da OMS para as Américas. Cd. 55/15 – Plano de ação para a eliminação de doenças infecciosas negligenciadas e ações pós-eliminação 2016-2022 [Internet]. 30 set 2016 [citado em 22 nov 2024]. Disponível em: <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2016/CD55-15-p.pdf>

PACÍFICO, D.M., ARAÚJO, T.S.L., SOUSA, N.A. de, COSTA, D. S. da, SOUZA, L.K.M. de, PEREIRA JÚNIOR, J. L., et al. Prospecção científica e tecnológica de *Matricaria recutita* L.(camomila). Rev GEINTEC. 2018 Abr;8(2):4339-56, doi: 10.7198/geintec.v8i2.773

PADIYARA, P., INOUE, H., SPRENGER, M. Global governance mechanisms to address antimicrobial resistance. Res. J. Infect. Dis. 2018 Mar;11:1-4, doi: 10.1177/1178633718767887

PINHEIRO, L.N., ORNELAS, P.H.C.P., TAVARES, J.P.C., SANTOS, T.F.C. dos, SILVA, A.B.F. da, SOUZA, P. H. A. de, et al. Análise farmacocinética e farmacodinâmica in sílico do eucaliptol. Rev. Foco [Internet]. 2023 [citado em 19 janeiro 2025];16(6):e2402. Disponível em: <https://ojs.focopublicacoes.com.br/foco/article/view/2402>

PINHO, B.L.S., SOUSA, B.M. de, TAVARES, J.V.M., SOUZA, W.F.S., ALMEIDA, S.V.S., SILVEIRA, S.S., et al. Atividade citotóxica do extrato etanólico das folhas secas de *Turnera subulata* (Charles Plumier) em hemácias e *Artemia salina*. Conex Interdisc [Internet]. 2024 [citado 2 jan 2025];1(3):144-52. Disponível em: <https://www.conexoesinterdisciplinares.com/rqi/index.php/ojs/article/view/29/29>

PIVA, L.R.O., JARDINE, K.J., GIMENEZ, B.O., PERDIZ, R.O., MENEZES, V.S., DURGANTE, F.M., et al. Volatile monoterpene ‘fingerprints’ of resinous *Protium* tree species in the Amazon rainforest. Phytochemistry. 2019 Fev;160:61-70, doi: 10.1016/j.phytochem.2019.01.014

PONCE, A.H., FRITZ, R., DEL VALLE, C.E., ROURA ,S.I. Antimicrobial activity of essential oils on native microbial population of organic Swiss chard. Food Sci Technol Res. 2003 Mar;36(7): 679 - 84, doi: 10.1016/S0023-6438(03)00088-4

RAINERI, E.J.M., ALTULEA, A.D., VAN, DIJL, J.M. STAPHYLOCOCCAL TRAFICKING AND INFECTION-FROM ‘NOSE TO GUT’ AND BACK. FEMS Microbiol Rev. 2022 Jul 18;46(1):1-22 doi: 10.1093/femsre/fuab041

RAMOS, M.F.S., SIANI, A.C., TAPPIN, M.R..R, GUIMARÃES, A.C., RIBEIRO, J.E.L.S. Essential oils from oleoresins of *Protium spp.* of the Amazon region. Flavour and Fragrance Journal. 2000 15(6):383-7, doi: 10.1002/1099-1026(200011/12)15:6<383::AID-FFJ927>3.0.CO;2-X

ROCHA, T.S., SANTANA, A.L.C.M., MÜLLER, T.S., MACHADO, M., OLIVEIRA, G.L. de. Variabilidade química de óleos essenciais de *Protium heptaphyllum*. Res Soc Dev [Internet]. 2022 [citado em 18 Dez 2024];11(10): e288111032835. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i10.32835>

ROLÓN, M., VEJA, C., ESCARIO, J.A, GÓMEZ-BARRIO, A. Development of resazurina microtiter assay for drug sensibility testing of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. Parasitol Res. 2006 Fev;99(2):103-7. doi: 10.1007/s00436-006-0126-y

SANTANA, R.C., ROSA, A.S., MATEUS, M.H.S., SOARES, D.C, ATELLA, G., GUIMARÃES, A.C., et al. In vitro leishmanicidal activity of monoterpenes present in two species of *Protium* (Burseraceae) on *Leishmania amazonensis*. J Ethnopharmacol. 2020 Set;259:112981-1, doi: 10.1016/j.jep.2020.112981

SANTOS CTC, DE AZEVEDO MMR, DA SILVA CB, ROCHA TJM, DOS SANTOS AF, PIRES LLS. Comparação da atividade entre óleos essenciais de frutos verdes e maduros de *Schinus terebinthifolius* Raddi sobre isolados de *Acinetobacter baumannii* multirresistentes. *Diversitas J.* 2019 Jan;4(1):285-91, doi: 10.17648/diversitas-journal-v4i1.638

SANTOS, V.L.P. dos, SILVA, D.S. da, ALBERINI, R.C., BERTÉ, R.A. A utilização de óleos essenciais extraídos de *Melaleuca alternifolia* na podologia para tratamento de onicomicoses: uma revisão: The use of essential oils extracted from *Melaleuca alternifolia* in podology for the treatment of onychomycosis: a review. *Braz J Dev.* 2022 Jul;8(7):54120-9, doi: 10.34117/bjdv8n7-334

SATYAL, P., POWERS, C., PARDUCCI, V.R., MCFEETERS, R., SETZER, W. Chemical composition, enantiomeric distribution, and antifungal activity of the oleoresin essential oil of *Protium amazonicum* from Ecuador. *Medicines (Basel).* 2017 Set;70(4):1-11, doi: 10.3390/medicines4040070

SCAPINELLO, J., SOUZA, M.A., PARIS, A., MORGAN, L.V., SIRENA, J.T. Aplicação de óleos essenciais em alimentos: Uma revisão sobre desafios e perspectivas. *Acta Ambient Catarin.* 2024 Dez;21(1):1-20, doi: 10.24021/raac.v21i1.7740

SIANI, A.C., GARRIDO, I.S., MONTEIRO, S.S., CARVALHO, E.S., RAMOS, M.F.S. *Protium icicariba* as a source of volatile essences. *Biochem Syst Ecol.* 2004 Mai;32(5):477-89, doi: 10.1016/j.bse.2003.11.003

SIBANDA, S., CHIGWANDA, G., POOLE, M., GWEBU, E.T., NOLETT, J.A., SCHIMMIDT, J.M., et al. Composition and bioactivity of the leaf essential oil of *Heteropyxis dehniae* from Zimbabwe. *J Ethnopharmacol.* 2004 Mai;92(1):107-11, doi: 10.1016/j.jep.2004.02.010

SiBBr, SISTEMA DE INFORMAÇÃO SOBRE A BIODIVERSIDADE BRASILEIRA [Internet]. 2020 [citado em 22 abril 2024]. Disponível em: <https://ala-bie.sibbr.gov.br/ala-bie/search?q=protium+calendulinum>

SILVA, A.R., SCHER, R., SANTOS, F.V., FERREIRA, S.R., CAVALCANTI, S.C., SILVA, E.R. da, et al. Essential oils of *Protium spp.* samples from Amazonian popular markets: Chemical composition, physicochemical parameters and antimicrobial activity. *J Essent Oil Res.* 2012 Dez;25(3):171-8, doi: 10.1080/10412905.2012.751055

SILVA, A.R.S.T., SCHER, R., SANTOS, F.V., FERREIRA, S.R., CAVALCANTI, S.C.H., CORREA, C.B., et al. Leishmanicidal activity and structure-activity relationships of essential oil constituents. *Molecules.* 2017 Mai;22(5):815, doi: 10.3390/molecules22050815

SILVA, K.L. da, CEZAROTTO, G.S., SOUZA, R. R de, CARVALHO, C.E.G. de, OLIVEIRA, J.P.R., CARVALHO, C.M., et al. Composição química e atividade antimicrobiana do óleo essencial da resina de *Protium hebetatum* Daly (Burseraceae). *South Am J Basic Educ, Tech Technol* [Internet]. 2021 [citado em 20 nov 2024];8(2):245-53. Disponível em: <https://periodicos.ufac.br/index.php/SAJEBTT/article/view/4469>

SILVA, L.O.P. da, NOGUEIRA, J.M.R. Uso de bacteriófagos como alternativa no controle de infecções bacterianas. *Res Soc Dev* [Internet]. 2022 [citado em 10 out 2024];11(11):e200111133619. Disponível em: <https://rsdjurnal.org/index.php/rsd/article/view/33619>

SILVA, M..F da, LISBOA, P.L.B., LISBOA, R.C.L. Nomes vulgares de plantas amazônicas. Manaus(AM):INPA; 1977.

SILVA, P.O.A., SILVA, E.V.A. da, ARAÚJO, F.S.M. de, MEDEIROS, M.A.A., OLIVERIA FILHO, A.A. de. Potencial antimicrobiano e antiaderente do óleo essencial de *Origanum vulgare* contra *Enterobacter cloacae*. Rev Multidiscip Nordeste Min [Internet]. 2023 [citado em 15 dez 2024];11(1):1-11. Disponível em: <https://revista.unipacto.com.br/index.php/multidisciplinar/article/view/1575>

SIQUEIRA, H.D., NETO, B.S., SOUSA, D.P., GOMES, B.S., SILVA, F.V. da, CUNHA, F.V., et al.  $\alpha$ -Phellandrene, a cyclic monoterpenene, attenuates inflammatory response through neutrophil migration inhibition and mast cell degranulation. Life Sci. 2016 Set;160:27-33, doi: 10.1016/j.lfs.2016.07.008

SOARES, M.L.R.R., VERA, B.O. de, ANDRADE, F.M. de. Avaliação da composição química e atividade antidiabética in vitro dos óleos essenciais de *Algrizea minor* (Myrtaceae) e *Eugenia brejoensis* (Myrtaceae). Evid [Internet]. 2023 [citado em 10 jan 2025];23(1):33-46. Disponível em: <https://periodicos.unoesc.edu.br/evidencia/article/view/32564>

SOUTO, I.C.C., FERREIRA, J.L.S., OLIVEIRA, H.M.B.F. de, ALVES, M.A.S.G., OLIVEIRA FILHO, A.A. de. Atividades farmacológicas do monoterpeno 1,8-cineol: um estudo in silico. Rev Bra de Edu e Saude [Internet]. 2016 [citado em 25 out 2024];6(3):26-8. Disponível em: <https://gvaa.com.br/revista/index.php/REBES/article/view/4442>

SOUZA, L.D.G. de, ARIAS, J.H.A. de, RODRIGUES, A.C., ALENCAR, A.A., MEDEIROS, J.P., ALENCAR, J.A.S., et al. Botanical, phytochemical and antimicrobial aspects of *Matricaria chamomilla* L. (Asteraceae): a brief review. Res Soc Dev [Internet]. 2022 [citado em 12 dez 2024];11(5):e53211528093. Disponível em: <https://rsdjurnal.org/index.php/rsd/article/view/28093>

SUÁREZ, A.I., COMPAGNONE, R.S., ACOSTA, D., VÁSQUEZ, L., DIZ, B., CANELÓN, D.J. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil from oleoresin of *Protium neglectum* S. J Essent Oil-Bear Plants. 2013;10(1):70-5, doi: 10.1080/0972060X.2007.10643521

TORRES, J.L.M., GUÉNES, G.T., GUÉNES, G.M.T. Aplicabilidade da fitoterapia no tratamento de infecções orais causadas por *Escherichia coli* e *Enterococcus faecalis*. Rev Multidiscip Nordeste Min. 2023 Nov;13(1), doi: 10.61164/rmm.v13i1.1865

UENO, N., WILSON, M.E. Receptor-mediated phagocytosis of Leishmania: Implications for intracellular survival. Trends Parasitol. 2012 Ago;28(8):335-44, doi: 10.1016/j.pt.2012.05.002

UKUHOR, H.O. The interrelationships between antimicrobial resistance, COVID-19, past, and future pandemics. J Infec Public Health. 2021 Jan;14(1):53-60, doi: 10.1016/j.jiph.2020.10.018

UTEGENOVA, G.A., PALLISTER, K.B., KUSHNARENKO, S.V., ÖZEK, G., ÖZEK, T., ABIDKULOVA, K.T., et al. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from *ferula* L. species against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. Molecules. 2018 Jul; 23(7):1679, doi: 10.3390/molecules23071679.

VALERIANO, C., PICCOLI, R.H., CARDOSO, M.G., ALVES, E. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais em bactérias patogênicas de origem alimentar. Rev. Bras. Pl. Med [Internet]. 2012 [citado em 12 set 2024];14(1):57-67. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1516-05722012000100009>

VASCONCELOS, J.M., GOMES, C.G., SOUSA, A., TEIXEIRA, A.B., LIMA, J.M. Leishmaniose tegumentar americana: perfil epidemiológico, diagnóstico e tratamento. Rev bras anal clin. 2018 Nov;50(3):221-7, doi: 10.21877/2448-3877.201800722

VEIGA, A.S.S., SILVEIRA, F.T., MARINHO, A.M.R., TRINDADE, R.C.S. da, CAMPOS, M.B., DOLABELA, M.F. Atividade leishmanicida de *Aspidosperma nitidum* Benth. Ex Müll. Arg. Res Soc Dev [Internet]. 2021 [citado em 19 Dez 2024];10(2):e50210212646. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/12646>

WEEKS, A., DALY, D.C., SYMPSON, B.B. The phylogenetic history and biogeography of the frankincense and myrrh family (Burseraceae) based on nuclear and chloroplast sequence data. Mol Phylogenet Evol. 2005 Abr;35(1):85 - 101, doi: 10.1016/j.ympev.2004.12.021

WHO: World Health Organization. Global antimicrobial resistance and use surveillance system (GLASS) report [Internet]. 2022 [citado em 26 nov 2024]. Disponível em: <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/364996/9789240062702-eng.pdf?sequence=1>

WIESER, A., ROMANN, E., MAGISTRO, G., HOFFMANN, C., NÖRENBERG, D., WEINERT, K., et al. A multiepitope subunit vaccine conveys protection against extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in mice. Infect Immun. 2010 Ago;78(8):3432-42, doi: 10.1128/IAI.00174-10

WOJTUNIK-KUZESZA, K.A., CIESLAB, L.M., WAKSMUNDZKA-HAINOS, M. Approach to determination a structure – antioxidant activity relationship of selected common terpenoids evaluated by ABTS<sup>+</sup> radical cation assay. Nat Prod Commun. 2018 Mar;13(3):295-8, doi: 10.1177/1934578X1801300308