

## Composición química y actividad antifúngica del aceite esencial de hojas de *Eugenia uniflora* L (Myrtaceae)

Chemical Composition and Antifungal Activity of *Eugenia Uniflora* L (Myrtaceae) Leaf Essential Oil

Yndra Elena Cordero de Rojas<sup>1,3</sup> <https://orcid.org/0000-0001-7015-2796>

María Eugenia Lucena de Ustáriz<sup>2\*</sup> <https://orcid.org/0000-0001-9120-345X>

Meybi Yurasca García Bustamante<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0002-5639-6740>

Keiri Yulith Rojas Guerrero<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0002-1501-0389>

Rosa Lisbeth Aparicio Zambrano<sup>3</sup> <https://orcid.org/0000-0002-5020-0954>

Clara Díaz de González<sup>4</sup> <https://orcid.org/0000-0002-1287-8326>

Francisco Javier Ustáriz Fajardo<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0002-6423-9067>

Liliana Margarita Araujo Baptista<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0001-8762-1413>

Marylenlid Rossana Isla Chacón<sup>5</sup> <https://orcid.org/0000-0003-1154-3038>

<sup>1</sup>Universidad de Los Andes, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Departamento de Bioanálisis Clínico. Mérida, República Bolivariana de Venezuela.

<sup>2</sup>Universidad Nacional de Chimborazo, Facultad de Ciencias de la Salud. Carrera de Laboratorio Clínico. Riobamba, Ecuador.

<sup>3</sup>Universidad de Los Andes, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Instituto de Investigaciones “Dr. Alfredo Nicolás Usubillaga del Hierro”, Sección Productos Naturales. Mérida, República Bolivariana de Venezuela.

<sup>4</sup>Universidad de Los Andes, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Departamento de Microbiología y Parasitología, Catedra de Micología. Mérida, República Bolivariana de Venezuela.

<sup>5</sup>Universidad de Los Andes, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Departamento de Farmacia Galénica. Catedra de Galénica. Mérida, República Bolivariana de Venezuela.

\*Autor para la correspondencia: [mlucena@unach.edu.ec](mailto:mlucena@unach.edu.ec)

## RESUMEN

**Introducción:** La familia Myrtaceae está compuesta por alrededor de 175 géneros con cerca de 5970 especies, ampliamente distribuidas, pero con mayor diversidad en las regiones tropicales y subtropicales del mundo. En Venezuela existen 20 géneros nativos con más de 130 especies en las que se incluye *Eugenia uniflora* L.

**Objetivo:** Determinar la composición química del aceite esencial, de las hojas frescas, de la especie *Eugenia uniflora* L., y su actividad antifúngica sobre *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* y *Candida tropicalis*.

**Métodos:** Las hojas frescas de *Eugenia uniflora* L., se recolectaron en abril de 2016 en el Jardín de Plantas Medicinales “Dr. Luis Ruiz Terán” de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, municipio Libertador del estado Mérida, República Bolivariana de Venezuela. Las hojas frescas se licuaron y se sometieron a destilación por arrastre con vapor de agua (3 h), con empleo de una trampa de Clevenger. El aceite se conservó entre 4-6 °C hasta su uso para ensayos biológicos. Los componentes del aceite fueron analizados por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. La actividad antibacteriana se evaluó de acuerdo al método de difusión en agar con discos de papel.

**Resultados:** El rendimiento del aceite obtenido por hidrodestilación fue de un 0,13 %. Se identificaron 24 compuestos que representan el 96,81 % de la composición total del aceite y los componentes mayoritarios fueron biciclogermacreno (22,38 %), trans- $\beta$ -ocimeno (15,72 %), mirceno (9,60 %) y atractilona (7,60 %). El aceite mostró actividad antifúngica sobre las cuatro cepas de *Candida* estudiadas.

**Conclusiones:** La composición química del aceite esencial de *Eugenia uniflora* L. está constituida en su mayoría por sesquiterpenos hidrocarburos, monoterpenos hidrocarburos, componentes que se correlacionan con su actividad antifúngica sobre *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* y *Candida tropicalis*. Por tanto, el aceite esencial *Eugenia uniflora* L. muestra potencial antifúngico frente a cepas de importancia clínica.

**Palabras clave:** Myrtaceae; *Eugenia uniflora* L.; sesquiterpenos; biciclogermacreno; trans- $\beta$ -ocimeno; actividad antifúngica.

## ABSTRACT

**Introduction:** The Myrtaceae family is composed of about 175 genera with about 5970 species, widely distributed, but with greater diversity in the tropical and subtropical regions

of the world. In Venezuela there are 20 native genera with more than 130 species in which *Eugenia uniflora* L is included.

**Objective:** To determine the chemical composition of the essential oil, of the fresh leaves of the species *Eugenia uniflora* L., and its antifungal activity on *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*.

**Methods:** The fresh leaves of *Eugenia uniflora* L. were collected in April 2016 in "Dr. Luis Ruiz Terán" Garden of Medicinal Plants of the Faculty of Pharmacy and Bioanalysis, University of Los Andes, Libertador municipality of the state of Mérida, Bolivarian Republic of Venezuela. The fresh leaves were liquefied and subjected to distillation by dragging with water vapor (3 h), using a Clevenger trap. The oil was preserved at 4-6 °C until it was used for biological tests. The oil components were analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometry. The antibacterial activity was evaluated according to the diffusion method in agar with paper discs.

**Results:** The oil yield obtained by hydrodistillation was 0.13 %. 24 compounds representing 96.81% of the total composition of the oil were identified and the majority of the components were bicyclogermacrene (22.38%), trans- $\beta$ -ocimene (15.72%), myrcene (9.60%) and atractylone (7.60%). The oil showed antifungal activity on the four *Candida* strains studied.

**Conclusions:** The chemical composition of *Eugenia uniflora* L. essential oil mostly contain hydrocarbon sesquiterpenes, hydrocarbon monoterpenes, components that correlate with its antifungal activity on *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*. Therefore, *Eugenia uniflora* L. essential oil shows antifungal potential against strains of clinical importance.

**Keywords:** Myrtaceae; *Eugenia uniflora* L; sesquiterpenes; bicyclogermacrene; trans- $\beta$ -ocimene; antifungal activity.

Recibido: 14/03/2022

Aceptado: 10/06/2022

## Introducción

La familia Myrtaceae está compuesta por alrededor de 175 géneros con cerca de 5970 especies, ampliamente distribuida, pero con mayor diversidad en las regiones tropicales y subtropicales.<sup>(1)</sup> En Venezuela existen 20 géneros nativos con más de 130 especies.<sup>(2)</sup> Una de estas especies es *Eugenia uniflora* L., también conocida como (ñangapirí, pitanga, cereza

de Cayena). Es un arbusto o árbol pequeño de 3 a 6 m de alto, muy ramificado desde la base con ramas delgadas. Las hojas son simples, opuestas, aovadas o aovadas-lanceoladas, acuminadas en el ápice, redondeadas en la base, verde oscuras y brillantes en la cara superior, con la nervadura central visible. Las flores son blancas algo fragantes solitarias o fasciculadas; sépalos oblongos, ciliados; pétalos obovados, estambres numerosos y frutos comestibles.<sup>(3)</sup>

Estudios realizados y análisis fitoquímicos muestran que las especies de *Eugenia* son una fuente rica de flavonoides, taninos, triterpenos y sesquiterpenos son constituyentes que juegan un papel relevante y refuerzan el potencial antimicrobiano conocido del género *Eugenia*.<sup>(4)</sup> Extractos y aceites esenciales de diversas especies de *Eugenia* han mostrado una variada actividad biológica entre las cuales se tiene *Eugenia luschnathiana* que presenta propiedades antioxidantes y actividad antimicrobiana contra bacterias gramnegativas y grampositivas<sup>(5)</sup> y la actividad antifúngica de *Eugenia florida*.<sup>(6)</sup>

En cuanto a los aceites esenciales de *Eugenia uniflora*, algunos estudios han mostrado también actividades antimicrobianas, antifúngicas y antidepresivas.<sup>(7,8)</sup> Se considera buen antioxidante con un sólido potencial terapéutico ya que presenta actividades antioxidantes, citotóxica, antiinflamatoria, analgésica, antidiabéticas y hepatoprotectora,<sup>(9,10)</sup> acción leishmanicida citotóxica y actividad antibacteriana.<sup>(11)</sup> La variada actividad biológica de las diferentes especies de este género botánico se correlaciona con los compuestos presentes en sus extractos y aceites esenciales.

El uso ancestral de sustancias de origen vegetal con fines terapéuticos y antimicrobianos ha llevado a investigar nuevas sustancias a partir de plantas consideradas popularmente medicinales.<sup>(12)</sup> Las infecciones por levaduras del género *Candida* sp., prevalecen cada vez más en pacientes hospitalizados, especialmente en grupos de mayor riesgo, como pacientes con neoplasia hematológica bajo tratamiento de quimioterapia y en cuidados intensivos. De todas las infecciones micóticas sistémicas, la candidiasis es la que cobra mayor importancia por su frecuencia y hacia la cual se dirigen grandes esfuerzos en los programas de vigilancia.<sup>(13)</sup>

La candidemia y la candidiasis invasiva son las principales causas de morbilidad y mortalidad, y su incidencia está aumentando debido a la creciente complejidad de los pacientes. Cinco especies de *Candida* (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. krusei*) representan más del 90 % de todos los casos diagnosticados, pero su frecuencia relativa varía según la población involucrada, la región geográfica, la exposición antifúngica previa y la edad del paciente.<sup>(14)</sup>

En la actualidad cambia de manera constante y continua el panorama epidemiológico debido a las variaciones en la susceptibilidad de las levaduras del género *Candida* a los antifúngicos; hecho que está relacionado con el tipo de huésped, la etiología de la enfermedad, el microorganismo involucrado y sus mecanismos de resistencia. Esta tendencia microbiana se vincula directamente con la actual y creciente resistencia de hongos de importancia clínica a los antifúngicos disponibles.<sup>(15)</sup> De ahí que sea necesario investigar nuevos principios activos que sirvan como alternativa para el tratamiento de estas micosis.

El objetivo del presente estudio fue determinar la composición química del aceite esencial, de las hojas frescas, de la especie *Eugenia uniflora* L., y su actividad antifúngica sobre *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* y *Candida tropicalis*. El propósito es contribuir al conocimiento de esta especie vegetal como fuente de compuestos químicos que pudieran servir como base para estudios farmacológicos y la síntesis de nuevos fármacos antifúngicos.

## Métodos

*Material vegetal:* las hojas frescas de *Eugenia uniflora* L., se recolectaron en abril de 2016 en el Jardín de Plantas Medicinales “Dr. Luis Ruiz Terán” de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de los Andes, municipio Libertador del Estado Mérida, República Bolivariana de Venezuela. Este se encuentra situado en la parte central del Estado Mérida, en las coordenadas geográficas: 8° 49' 16" y 8° 15' 13" de latitud norte y 70° 50' 40" y 71° 13' 30" de longitud oeste. Está ubicado en la cuenca del río Chama, surcado además por las subcuencas de los ríos Milla, Albarregas y Mucujún.<sup>(16)</sup>

El municipio cubre una superficie de 907,00 km<sup>2</sup>, el 8,3 % del territorio del Estado. El área metropolitana de Mérida se halla enclaustrada entre dos bloques montañosos: La Sierra del Norte o de la Culata y La Sierra Nevada con alturas medias de 1330 m s.n.m. El clima se caracteriza por un régimen bimodal, porque tiene temporada lluviosa y temporada de sequía, con precipitaciones promedios anuales de 1500 mm. Las temperaturas promedio municipal son de 19 °C.<sup>(16)</sup>

Una muestra de la planta se depositó en el herbario MERF “Luis Ruiz Terán” de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, bajo el Voucher N° 1. La planta fue identificada por el ingeniero forestal Juan Carmona Arzola.

*Obtención del aceite esencial:* las hojas frescas (761 g) de *Eugenia uniflora* L., se licuaron y sometieron a destilación por arrastre con vapor de agua (3 h), con el empleo de una trampa

de Clevenger. Posteriormente para eliminar el exceso de agua, se agregó sulfato de sodio anhidro el cual no altera la composición del aceite. Se obtuvo 1 mL de aceite esencial. El aceite se conservó entre 4 - 6 °C hasta su uso para ensayos biológicos.

## Análisis de la composición química

### Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-SM)

Los componentes volátiles del aceite esencial de *Eugenia uniflora* L. se analizaron por GC-MS con un cromatógrafo Hewlett Packard Modelo 6890 serie II (USA), acoplado a un detector de masa Hewlett Packard 5973. El cual estaba equipado con un inyector automático HP y una columna capilar de fenilmetil-polixilosano (HP-5) de 30 m de largo x 0,25 mm de diámetro x 0,25 µm de grosor de la película.

El programa de temperatura que se utilizó se fijó inicialmente a 60 °C, luego se calentó a razón de 4 °C por min a 260 °C. La temperatura del inyector a 230 °C, la temperatura del cuádruplo a 150 °C, el gas transportador fue helio a una velocidad lineal de 34 m/s; energía de ionización 70 eV; rango de scan de 40-50 amu; 3.9 scan/s. El volumen de inyección 1 µL de una solución diluida al 2 % en n-heptano con una partición de 100:1. La identificación de los componentes del aceite se realizó por comparación computarizada de los espectros obtenidos de cada compuesto con los espectros de la base de datos Wiley MS Data Library (4th.Edition) y NIST 05.<sup>(17)</sup> Todos los reactivos utilizados fueron grado analítico de la marca Merck (Alemania).

*Cálculo de los índices de Kovats:* el cálculo de los índices de Kovats se realizó por medio de un cromatógrafo de gases marca Hewlett Packard (equipo empleado en la cromatografía de gases). Se compararon los tiempos de retención de una serie de *n*-parafinas (C7-C22) con los del aceite esencial, a su vez, los valores se compararon con los valores publicados en la literatura.<sup>(18)</sup>

*Actividad antifúngica:* la actividad antifúngica se evaluó de acuerdo al método de difusión en agar con discos.<sup>(19)</sup> Se utilizaron cuatro cepas del género *Candida* de la colección Tipo Americano (ATCC) y del Centro de Control de Enfermedades (CDC) (*Candida albicans* CDC 385, *Candida krusei* ATCC 6258, *Candida parapsilosis* ATCC 22019 y *Candida tropicalis* ATCC 30658) pertenecientes al cepario del Laboratorio de Micología “Dr. Corrado Capretti” de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.

Se utilizaron 25 mL de agar Mueller Hinton suplementado (38 g/L de agar Mueller Hinton, 20 g de glucosa y 0,25 mL de azul de metileno) y se esterilizó por 10 min. El agar fundido a

45 °C fue aseptícamente mezclado con 1 ml de la suspensión fúngica con turbidez equivalente a 0,5 del patrón McFarland y correspondiente a  $1 \times 10^8$  unidades formadoras de colonias-UFC/mL, en placas Petri de 90 mm x 15 mm. Una vez solidificado el agar, los discos de papel de 6 mm impregnados (10 $\mu$ L) con el aceite puro fueron colocados en el centro de la superficie del medio de cultivo.

El proceso se repitió para cada una de las cuatro especies de *Candida*. Se realizaron los controles de calidad positivos, para lo cual se empleó como antifúngicos de referencia discos con Fluconazol 25  $\mu$ g de la marca Bio-Rad (Francia) para las especies *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* y *Candida tropicalis* y discos de Voriconazol 1  $\mu$ g de la marca Bio-Rad (Francia) para *Candida krusei*. Como control negativo discos impregnados con Dimetilsulfóxido (DMSO) de Merck Millipore (Alemania). Las placas fueron preincubadas en refrigeración a 4 °C durante 30 min y luego se incubaron a 37 °C durante 24 h. Posteriormente se realizó la lectura, registrando el diámetro (mm) de los halos de inhibición en cada caso.

*Determinación de la concentración mínima inhibitoria:* a las cepas de *Candida* que mostraron halos de inhibición frente al aceite volátil puro se les determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI). A partir de una solución madre de concentración  $2 \times 10^6$   $\mu$ g/mL (2 g de aceite puro y 1 mL de DMSO se prepararon diluciones a concentraciones de (9,5; 9;8; 7,0; 6,0; 5,0; 4,0; 3,0; 2,0; 1,0; 0,5; 0,4; 0,3)  $\times 10^2$   $\mu$ g/mL.

Los discos de papel impregnados (10  $\mu$ L) con cada una de las diluciones del aceite volátil fueron colocados en la superficie del agar Mueller Hinton suplementado e inoculado con 1 ml de la suspensión fúngica con turbidez equivalente a 0,5 del patrón McFarland y correspondiente a  $1 \times 10^8$  unidades formadoras de colonias-UFC/mL, contenido en placas Petri de 90 mm x 15 mm. Las placas fueron preincubadas en refrigeración a 4 °C durante 30 min y luego se incubaron a 37 °C durante 24 h. Posteriormente se realizó la lectura, registrando el diámetro de los halos de inhibición. Las pruebas se realizaron por triplicado para cada cepa en estudio.

*Recolección de la información y análisis estadístico:* a los resultados de la actividad antifúngica y de la CMI (halos de inhibición) se le realizó un análisis de varianza (ANOVA) la significancia estadística se consideró para valores de  $p < 0,05$  y comparación de media por el método de Tukey, una confianza del 95 %, con la utilización del software estadístico Minitab® (MiniTab Inc. State College, PA, EEUU, 2016).

## Resultados

*Composición química del aceite:* del proceso de hidrodestilación de las hojas frescas de *Eugenia uniflora* L., se obtuvo 1,5 mL de aceite esencial lo que corresponde a un rendimiento del 0,13 %. El análisis cromatográfico del aceite esencial de las hojas de *Eugenia uniflora* L., realizado por CG-EM, permitió la identificación de 24 compuestos que representan el 96,81 % de la composición total del aceite (tabla 1). Entre los componentes mayoritarios están: biciclogermacreno (22,38 %), trans- $\beta$ -ocimeno (15,72 %), mirceno (9,60 %) y atractilona (7,60 %).

**Tabla 1** - Compuestos identificados en el aceite esencial de *Eugenia uniflora* L.

#PK	Nombre del compuesto	TR	%	IKcal	IKtab
1	cis-3-hexenol	3,90	0,47	856	850
2	Mirceno	6,70	9,60	974	988
3	$\alpha$ -felandreno	7,09	0,45	986	1002
4	Limoneno	7,77	6,91	1009	1024
5	cis- $\beta$ -ocimeno	7,96	6,64	1018	1032
6	trans- $\beta$ -ocimeno	8,28	15,72	1032	1044
7	$\gamma$ -terpineno	8,60	0,30	1045	1050
8	$\alpha$ -terpinoleno	9,47	0,46	1080	1086
9	Linalool	9,80	0,28	1093	1095
10	$\delta$ -elemeno	17,46	0,38	1340	1335
11	$\beta$ -elemeno	19,19	1,48	1391	1389
12	$\beta$ -cariofileno	20,07	2,57	1421	1417
13	Aromadendreno	20,66	0,24	1442	1439
14	Allo-aromadendreno	21,33	0,75	1465	1458
15	$\alpha$ -selineno	21,76	0,28	1480	1498
16	germacreno D	21,96	5,07	1486	1484
17	$\beta$ -selineno	22,11	0,26	1491	1489
18	Biciclogermacreno	22,45	22,38	1502	1500
19	germacreno A	22,70	2,95	1510	1508
20	$\beta$ -cadineno	23,19	0,63	1525	1520
21	germacreno B	24,22	7,50	1557	1559
22	Viridiflorol	25,21	1,05	1586	1592
23	Atractilona	28,09	7,60	1696	1657
24	Germacrona	28,18	2,84	1700	1693
Total		---	96,81	---	---

*Nota:* Los compuestos están listados según su orden de elución en columna capilar HP-5; TR: tiempo de retención; %: porcentaje en la mezcla; IK Cal: Índice de Kovats calculado; IK Tab: Índice de Kovats tabulado; \* corresponde a los compuestos mayoritarios, #PK picos arrojados en el cromatograma.

La clasificación del total de compuestos identificados del aceite esencial de *Eugenia uniflora* L. (96,81 %) permitió determinar que los sesquiterpenos hidrocarburos fueron los componentes más abundantes en el aceite esencial (57,7 %), seguidos de los monoterpenos



hidrocarburos (27,27 %), monoterpenos oxigenados (6,06 %), sesquiterpenos oxigenados (4,8 %) y alcohol (4,17 %).

Los resultados de la inhibición para las diferentes diluciones del aceite esencial de *Eugenia uniflora* L., frente a las cepas de *Candida* y los respectivos controles, permitieron observar que el aceite esencial puro presentó el mayor nivel de inhibición frente a las cuatro especies de *Candida* estudiadas, en relación con las demás diluciones ensayadas (tabla 2).

**Tabla 2** - Actividad antifúngica del aceite esencial de *Eugenia uniflora* L., frente a especies del género *Candida* mediante halos de inhibición

Concentraciones (x 10 <sup>2</sup> µg/mL)	<i>Candida</i> (especies)			
	<i>C. albicans</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
Promedio Halos de inhibición (mm) ± D.E.				
Aceite puro	10,00 ± 0,13	13,00 ± 0,10	11,00 ± 0,08	10,00 ± 0,09
9,5	7,00 ± 0,09	11,00 ± 0,09	10,00 ± 0,08	7,00 ± 0,06
9,0	7,00 ± 0,08	11,00 ± 0,10	9,00 ± 0,07	7,00 ± 0,06
8,0	6,50 ± 0,07	11,00 ± 0,08	9,00 ± 0,08	7,00 ± 0,07
7,0	6,50 ± 0,08	10,00 ± 0,09	8,50 ± 0,07	7,00 ± 0,10
6,0	6,50 ± 0,06	10,00 ± 0,08	8,00 ± 0,9	6,50 ± 0,06
5,0	6,50 ± 0,08	9,50 ± 0,10	8,00 ± 0,06	6,50 ± 0,06
4,0	6,50 ± 0,09	9,00 ± 0,09	7,00 ± 0,07	6,50 ± 0,07
3,0	6,50 ± 0,06	9,00 ± 0,08	7,00 ± 0,06	7,00 ± 0,08
2,0	6,50 ± 0,06	9,00 ± 0,08	7,00 ± 0,06	7,00 ± 0,07
1,5	6,50 ± 0,07	8,00 ± 0,06	6,80 ± 0,07	6,80 ± 0,08
1,0	0,00	8,00 ± 0,07	6,60 ± 0,07	6,50 ± 0,07
0,5	0,00	8,00 ± 0,07	0,00	0,00
0,4	0,00	8,00 ± 0,09	0,00	0,00
0,3	0,00	0,00	0,00	0,00
Control positivo Fluconazol 25µg	30,00 ± 0,11	---	28,00 ± 0,12	28,00 ± 0,11
Control positivo Voriconazol 1µg	---	19,00 ± 0,10	---	---
Control negativo DMSO	0,00	0,00	0,00	0,00

El análisis de varianza y comparación de media de la actividad antifúngica del aceite esencial puro de *Eugenia uniflora* L. frente a diferentes cepas de *Candida* permitió observar que existe diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre *C. krusei* y *C. tropicalis*. Sin embargo, *C. albicans* y *C. parapsilosis* no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre sí ( $p > 0,05$ ), pero sí mostraron diferencias significativas individuales con *C. krusei* y *C. tropicalis*, respectivamente. Mientras que, con las diluciones del aceite esencial de  $8,0 \times 10^2 \mu\text{g/mL}$  y  $7,0 \times 10^2 \mu\text{g/mL}$  se observó diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre todas las especies de *Candida* estudiadas.

## Discusión

La naturaleza es fuente de una amplia variedad de moléculas bioactivas, que podrían ser utilizadas como base para el diseño y la formulación de nuevas generaciones de medicamentos. El notable aumento de las infecciones micóticas y el incremento en la resistencia farmacológica ha llevado a la búsqueda de nuevas opciones terapéuticas de origen natural en recursos como las plantas, identificándose una serie de moléculas con actividad contra hongos y otros microorganismos de importancia clínica para los humanos.

El análisis cromatográfico del aceite esencial de las hojas de *Eugenia uniflora* L. permitió identificar 24 constituyentes, que representan el 96,81 % de los componentes volátiles, de los cuales el 62,5 % corresponde a sesquiterpenos con predominio de sesquiterpenos hidrocarburos (57,7 %). Esta tendencia en la composición mayoritaria se ha descrito en trabajos previos realizados en Brasil por varios autores,<sup>(7,20,21)</sup> en los que se identificaron los sesquiterpenos como constituyentes del aceite esencial de las hojas de *Eugenia uniflora* (78-93 %). Sin embargo, en estos casos y a diferencia de los resultados del presente estudio, la clase que predomina son los sesquiterpenos oxigenados.

A pesar de la variación en las composiciones químicas de los aceites esenciales de *E. uniflora*, se ha confirmado el predominio de los sesquiterpenos. No obstante, los compuestos mayoritarios varían de un estudio a otro. En este estudio los componentes mayoritarios determinados fueron biciclogermacreno (22,38 %), trans- $\beta$ -ocimeno (15,72 %), mirceno (9,60 %) y atractilona (7,60 %), mezcla de sesquiterpenos y monoterpenos hidrocarburos. Al comparar estos resultados con estudios previos realizados en Brasil que describen una variedad de componentes mayoritarios en los aceites esenciales provenientes de hojas *Eugenia uniflora* L., entre ellos: el furanodieno y su producto de transposición, furanoelemento (o curzereno, 50,2 %),  $\beta$ -elemento (5,9 %) y  $\alpha$ -cadinol (4,7 %),<sup>(22)</sup> permitió determinar que los componentes mayoritarios difieren totalmente.

Sin embargo, al comparar todos los componentes se pudo establecer que el  $\beta$ -elemento fue el único compuesto común en ambos estudios. Posteriormente, el estudio que se basó en el color de la fruta de *Eugenia uniflora* determinó que con el aceite esencial obtenido de la planta cuyos frutos eran rojo oscuro, morado y amarillento contenían alto porcentaje de germacreno B ( $21,6 \pm 7,2$  %), atractilona ( $11,7 \pm 5,3$  %) y germacrona ( $17,3 \pm 13,2$  %). De los frutos rojo brillante se obtuvo curzereno ( $42,6 \pm 0,9$  %), germacreno D ( $8,8 \pm 0,1$  %) y germacreno A ( $7,4 \pm 1,5$  %); y de los frutos rojo-naranja: selina-1,3,7 (11) trien-8-ona ( $48,2 \pm 5,7$  %) y selina-1,3,7 (11) trien-8-ona epóxido ( $19,3 \pm 4,3$  %).

Con excepción del curzereno, selina-1,3,7 (11) trien-8-ona y selina-1,3, 7 (11) trien-8-ona epóxido los demás compuestos de los aceites esenciales de hojas provenientes de los diferentes biotipos de frutos de *Eugenia uniflora* están presentes en diferentes porcentajes en el aceite analizado en el presente estudio. Pero solo coincide en la atractilona como componente mayoritario.<sup>(20)</sup>

Otro estudio sobre el aceite de *Eugenia uniflora* determinó que los compuestos mayoritarios eran el germacreno B (21,2 %), selina-1, 3, 7(11) trien-8-one epóxido (19,3 %) y germacreno A (11,6 %) y germacreno D (11,4 %).<sup>(7)</sup> El análisis comparativo entre los estudios permitió determinar un alto porcentaje de concordancia con los componentes presentes en el aceite de *Eugenia uniflora* L. de Los Andes merideños, pero con diferencias en sus concentraciones. Sin embargo, no hubo coincidencia de compuestos mayoritarios entre los estudios referenciados y el presente estudio.

Estos resultados permiten observar como tendencia la presencia común de algunos compuestos, pero con variaciones importantes de concentración entre los distintos aceites de *Eugenia uniflora* L. estudiados. No obstante, el estudio realizado con *Eugenia uniflora* cultivada en Egipto reveló la presencia de Miricetina 3-O-(4",6"-digaloil glucopiranosido, miricetina 3-O-glucopiranosido, quercetina, ácido gálico y ácido elágico como componentes mayoritarios de un extracto a partir de una mezcla de agua-metanol.<sup>(23)</sup>

Mientras, el estudio realizado a partir del aceite esencial de las hojas secas de *Eugenia uniflora* mostró variaciones porcentuales de los principales constituyentes químicos en función del período de recolección y extracción, especialmente en las especies químicas: Selina-1, 3, 7 (11)-Trien 8-one y epóxido de Selina-1, 3, 7 (11)-Trien-8-one. Las concentraciones más altas de Selina-1, 3, 7 (11)-Trien-8-ona, Selina-1, 3, 7 (11)-Trien-8-ona y epóxido de  $\gamma$ -elemeno se observaron en septiembre ( $43,3 \pm 2,7$  %). En tanto que, la mayor concentración de (E)-cariofileno se presentó en el mes de enero ( $6,4 \pm 0,1$  %).<sup>(24)</sup>

Estos compuestos mayoritarios descritos en ambos estudios difieren totalmente de los determinados en *Eugenia uniflora*, de Los Andes merideños. Resultados que ratifican que la variedad de los componentes constitutivos y sus concentraciones en los extractos y aceites esenciales de *Eugenia uniflora* y demás especies de familias botánicas se atribuyen a sus quimiotipos, origen geográfico, estacionalidad y al uso de diferentes métodos de extracción de aceite.<sup>(20,24)</sup>

El estudio de la actividad antifúngica del aceite volátil puro de hojas de *Eugenia uniflora* L., frente a cuatro especies de *Candida*, permitió determinar la inhibición de crecimiento en todas las especies estudiadas, demostrándose así, la actividad antifúngica del aceite de *Eugenia uniflora* L. No obstante, el análisis estadístico determinó que existen diferencias

significativas entre el tamaño de los halos de inhibición obtenidos con *Candida krusei*, en relación al tamaño de los determinados con *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* y *Candida albicans*, respectivamente.

Por otra parte, la susceptibilidad determinada en *Candida krusei* frente al aceite volátil puro de *Eugenia uniflora* L. resulta de especial interés, si consideramos su resistencia intrínseca al fluconazol,<sup>(25)</sup> antifúngico de amplio espectro. Aún más, si se compara con la susceptibilidad obtenida con el aceite puro, en relación con los halos de inhibición alcanzados con el control positivo (Voriconazol).

Al analizar los resultados del estudio de la actividad antifúngica a las diferentes concentraciones del aceite volátil ensayadas, se observó que los halos de inhibición en todas las especies de *Candida* estudiadas reducen su tamaño a medida que disminuye la concentración de aceite volátil, obteniéndose CMI de  $1,5 \times 10^2$  µg/mL para *Candida albicans* de  $1,0 \times 10^2$  µg/mL para *Candida tropicalis* y *Candida parapsilosis*. Mientras que la CMI más baja ( $0,4 \times 10^2$  µg/mL) del aceite esencial diluido de *Eugenia uniflora* L. se alcanzó frente a *Candida krusei*.

Por tanto, *Candida krusei* resultó ser la cepa más susceptible al aceite esencial de hojas de *Eugenia uniflora* L. La susceptibilidad específicamente con *Candida krusei* concuerda con el resultado del estudio previo de actividad antifúngica del aceite esencial de *Eugenia uniflora* L. frente a las cepas *Candida albicans*, *Candida guilliermondii*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida stellatoidea* y *Candida tropicalis*, en el que solo *Candida krusei*, resultó susceptible.<sup>(26)</sup>

Los resultados de las CMI obtenidos para *Candida tropicalis*, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* fueron comparados con los resultados descritos en otro estudio realizado en Brasil sobre la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Eugenia uniflora* L. En este se evidenció actividad antifúngica frente a *Candida tropicalis*, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* y *Candida glabrata* con CMI de 0,90 mg/mL, 1,80 mg/mL, 3,75 mg/mL y 0,93 mg/mL, respectivamente.<sup>(21)</sup>

Los valores de las CMI obtenidos para *Candida albicans* y *Candida tropicalis* en ambos estudios son comparables. Sin embargo, con *Candida parapsilosis* se observa una diferencia entre las investigaciones, ya que la CMI obtenida en este estudio fue del 73,3 % menor. No obstante, al comparar las CMI conseguidas con *Candida albicans* ( $1,5 \times 10^2$  µg/mL) y *Candida parapsilosis* ( $1,0 \times 10^2$  µg/mL) con las descritas por Victoria y otros,<sup>(7)</sup> para las mismas cepas (CIM de  $208,3 \pm 72,1$  µg/ml en los dos casos), se observa una diferencia muy importante entre las CMI en ambos estudios. De ahí que se determinara que el

aceite esencial de *Eugenia uniflora* L. que proviene de Brasil presenta mayor actividad antifúngica frente a *C. albicans* y *C. parapsilosis*.

La actividad antifúngica del aceite esencial de *Eugenia uniflora* L. se vincula a su composición química; a compuestos como el biciclogermacreno, descrito como componente mayoritario en especies del género *Eugenia* como *Eugenia brevistyla*;<sup>(27)</sup> así como a una variedad de familias botánicas con actividad biológica entre ellas actividad antifúngica.<sup>(28)</sup> Igualmente, se ha relacionado el trans- $\beta$ -ocimeno en aceites esenciales de especies de la familia Zingiberaceae con actividades antifúngicas.<sup>(29)</sup>

La atractilona también se ha determinado previamente en aceites de *Eugenia uniflora* L. con actividad antifúngica.<sup>(21)</sup> Asimismo, el mirceno se describe en aceites esenciales del género *Juniperus* Familia de las Cupressaceae con amplia actividad antifúngica.<sup>(30)</sup> No obstante, muchos de los componentes minoritarios determinados en el aceite de *Eugenia uniflora* L., reportados como responsables de la actividad antifúngica de su aceite esencial, se relacionan directamente con actividad antifúngica entre ellos (germacreno D, germacreno A, germacreno B).<sup>(7,20)</sup> Estos resultados permiten inferir que los variados compuestos de los aceites esenciales con actividad biológica y en particular antifúngica no dependen exclusivamente de su valor porcentual en el aceite, sino, también, de posibles interacciones sinérgicas entre los componentes.

Se puede concluir que la composición química del aceite esencial de *Eugenia uniflora* L. está constituida, en su mayoría, por sesquiterpenos hidrocarburos, monoterpenos hidrocarburos, componentes que se correlacionan con su actividad antifúngica sobre *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* y *Candida tropicalis*. Por tanto, el aceite esencial *Eugenia uniflora* L. muestra potencial antifúngico frente a cepas de importancia clínica.

## Referencias bibliográficas

1. Britannica T. Editors of Encyclopaedia. mirtáceas. Enciclopedia Britannica. Estados Unidos de América; 2015 [acceso 12/01/2022]. Disponible en: <https://www.britannica.com/plant/Myrtaceae>
2. Badillo V, Schnee L. Clave de las familias de plantas superiores de Venezuela. Maracay, Venezuela: Universidad Central de Venezuela; 1965. p. 57.
3. Hoyos J. Frutales en Venezuela. Caracas: Sociedad de Ciencias Naturales La Salle. 1994. p. 174 -5.

4. De Souza A, de Oliveira C, de Oliveira V, Betim F, Miguel O, Miguel M. Traditional Uses, Phytochemistry, and Antimicrobial Activities of *Eugenia* Species - A Review. *Planta Med.* 2018;84(17):1232-48. DOI: [10.1055/a-0656-7262](https://doi.org/10.1055/a-0656-7262)
5. Henriques M, Barbosa D, da Nóbrega D, Vieira A, Dias R. Chemical composition, antioxidant, antimicrobial activity, toxicity, genetic analysis and popular use of *Eugenia luschnathiana* (O. Berg) Klotzsch ex B. D. Jacks: a literature review. *Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat.* 2021;20(3):215-25. DOI: [10.37360/blacpma.21.20.3.17](https://doi.org/10.37360/blacpma.21.20.3.17)
6. Ferreira O, da Silva S, de Oliveira M, Andrade E. Chemical Composition and Antifungal Activity of *Myrcia multiflora* and *Eugenia florida* Essential Oil. *Molecules.* 2021;26(23):7259. DOI: [10.3390/molecules26237259](https://doi.org/10.3390/molecules26237259)
7. Victoria F, Lenardao E, Savegnago L, Perin G, Jacob R, Alves D, *et al.* Essential oil of the leaves of *Eugenia uniflora* L.: Antioxidant and antimicrobial properties. *Food and Chemical Toxicology.* 2012;50(8):2668-74. DOI: [10.1016/j.fct.2012.05.002](https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.05.002)
8. Dos Santos J, Esmeraldo J, Fonseca C, Nascimento M, De Matos Y, Sampaio T, *et al.* Chemical composition, antifungal activity and potential anti-virulence evaluation of the *Eugenia uniflora* essential oil against *Candida* spp. *Food Chemistry.* 2018;261:233-9. DOI: [10.1016/j.foodchem.2018.04.015](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.04.015)
9. Figueiredo P, Pinto L, Da Costa J, Ray A, Da Silva R, Mourão R, *et al.* Composition, antioxidant capacity and cytotoxic activity of *Eugenia uniflora* L. chemotype-oils from the Amazon. *Journal of Ethnopharmacology.* 2019;232(25):30-8. DOI: [10.1016/j.jep.2018.12.011](https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.12.011)
10. Sobeh M, Hamza M, Ashour M, Elkhatieb M, El Raey M, Abdel-Naim A, *et al.* A Polyphenol-Rich Fraction from *Eugenia uniflora* Exhibits Antioxidant and Hepatoprotective Activities In Vivo, *Pharmaceuticals (Basel).* 2020;13(5):84. DOI: [10.3390/ph13050084](https://doi.org/10.3390/ph13050084)
11. Da Silva V, Fernandes C, Dantas M, Czermainski L, Pereira M, Micke G, *et al.* Chemical composition and in vitro leishmanicidal, antibacterial and cytotoxic activities of essential oils of the Myrtaceae family occurring in the Cerrado biome. *Industrial Crops and Products.* 2018;123:638-45. DOI: [10.1016/j.indcrop.2018.07.033](https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.07.033)
12. Del Castillo A, Molinares P, Campo M, Bettin A. Actividad antibacteriana del extracto total de hojas de *Cucurbita moschata* Duchesne (Ahuyama). *Rev Cuba Plantas Med.* 2017 [acceso 12/01/2022];22(1):1-13. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1028-47962017000100009](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962017000100009)
13. Gómez C. Resistencia de levaduras del género *Candida* al fluconazol. *Infectio.* 2010;14(Supp2):172-80. DOI: [10.1016/S0123-9392\(10\)70134-X](https://doi.org/10.1016/S0123-9392(10)70134-X)

14. Antinori S, Milazzo L, Sollima S, Galli M, Corbellino M. Candidemia and invasive candidiasis in adults: A narrative review. *Eur J Intern Med.* 2016;34:21-28. DOI: [10.1016/j.ejim.2016.06.029](https://doi.org/10.1016/j.ejim.2016.06.029)
15. Quiñones D. Resistencia antimicrobiana: evolución y perspectivas actuales ante el enfoque «Una salud». *Rev Cubana Med Trop.* 2017 [acceso 12/01/2022];69(3):1-17. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0375-07602017000300009](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602017000300009)
16. Gobierno Bolivariano de Venezuela, Gobernación del Estado Mérida. Datos básicos del municipio Libertador, Mérida-Venezuela; 2006 [acceso 01/03/2022]. Disponible en: [https://web.archive.org/web/20061009221637/http://www.merida.gob.ve/merida/municipios/municipio\\_libertador.html](https://web.archive.org/web/20061009221637/http://www.merida.gob.ve/merida/municipios/municipio_libertador.html)
17. Adams R. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry, 4th. Edition. Carol Stream, Illinois USA: Allured Publishing Corporation; 2007. p. 804.
18. Davies N. Gas chromatographic retention indices of monoterpenes and on methyl silicone and Carbowax 20 M phases. *Journal of Chromatography.* 1990;503:24.
19. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts. M44. 3rd ed. United State: Wayne, PA.; 2018 [acceso 12/01/2022]. Disponible en: <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m44/>
20. Costa D, Filho E, Silva L, Santos S, Passos X, Silva M, *et al.* Influencia de biótipos de frutas sobre a composicao química e actividade antifungica dos óleos essenciais de follas de *Eugenia uniflora*. *J. Braz. Chem. Soc.* 2010;21(05). DOI: [10.1590/S0103-50532010000500012](https://doi.org/10.1590/S0103-50532010000500012)
21. Lago J, Souza E, Mariane B, Pascon R, Vallin M, Martins R, *et al.* Chemical and biological evaluation of essential oils from two species of myrtaceae -*Eugenia uniflora* L. and *Plinia trunciflora* (O. Berg) Kauser. *Molecules.* 2011;16:9827-37. DOI: [10.3390/molecules16129827](https://doi.org/10.3390/molecules16129827)
22. Melo R, Corrêa V, Amorim A, Miranda A, Rezende C. Identification of impact aroma compounds in *Eugenia uniflora* L. (Brazilian Pitanga) leaf essential oil. *J. Braz. Chem. Soc.* 2007;18,1:179–83. DOI: [10.1590/S0103-50532007000100020](https://doi.org/10.1590/S0103-50532007000100020)
23. Bakr R, Shaza A, Mohamed S, Waly N. Phytochemical and biological investigation of *Eugenia uniflora* L. cultivated in Egypt. *J. Pharmacognosy Phytother.* 2017;9(5):57-66. DOI: [10.5897/JPP2017.0443](https://doi.org/10.5897/JPP2017.0443)

24. Do Nascimento L, Moraes M, Araújo L, Andrade E. Rendimiento e composição química do óleo essencial das folhas de *Eugenia uniflora* L. em diferentes tempos de extração. Antonella Carvalho de Oliveira. En: Pesquisa na Cadeia de Suprimentos de Plantas Aromáticas. Ponta Grossa-Brazil: Atena Editora; 2019. p.48-58. DOI: [10.22533/at.ed.621913009](https://doi.org/10.22533/at.ed.621913009)
25. Silva V, Díaz M, Febré N. Vigilancia de la resistencia de levaduras a antifúngicos. Rev Chil Infect. 2002;19(S2):149-56. DOI: [10.4067/S0716-10182002019200016](https://doi.org/10.4067/S0716-10182002019200016)
26. De Oliveira I, De Araújo R, De Oliveira E, Porto N, Leite E. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de Candida. Rev. bras. farmacogn. 2006;16(2):197-200. DOI: [10.1590/S0102-695X2006000200011](https://doi.org/10.1590/S0102-695X2006000200011)
27. De Souza A, de Souza-Junior J, Tenfen A, Scharf D, Simionatto E, Alberton M. Seasonal chemical composition of an unexplored essential oil of *Eugenia brevistyla*. Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat. 2018;17(6):604-9. Disponible en: <https://www.blacpma.ms-editions.cl/index.php/blacpma/article/view/149/146>
28. Perreira A, De Sousa W, Christofoli M, Castro C. Perfil químico e atividades antioxidante e antifúngica do óleo essencial da flor de *Cochlospermum regium* (Mart. ex Schrank.) -Pilg. (Bixaceae). Colloquium Agrariae. 2020;16(4):89-101. DOI: [10.5747/ca.2020.v16.n4.a386](https://doi.org/10.5747/ca.2020.v16.n4.a386)
29. Pérez A, Chamorro L, Mercado J. Inhibición de *Colletotrichum gloeosporioides* en cultivos de ñame en el Caribe colombiano usando aceites esenciales de Curcuma longa y Zingiber officinale. Revista Ciencia en Desarrollo. 2021;12(1):1-12. DOI: [10.19053/01217488.v12.n1.2021.10510](https://doi.org/10.19053/01217488.v12.n1.2021.10510)
30. Dambolena J, Meriles J, López A, Gallucci M, González S, Guerra P, et al. Actividad antifúngica del aceite esencial de cinco especies de Juniperus de Argentina. Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat. 2011;10(2):104-15. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/856/85617384003.pdf>

### Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

### Contribuciones de los autores

*Conceptualización:* Yndra Elena Cordero de Rojas, Liliana Margarita Araujo Baptista, María Eugenia Lucena de Ustáriz.



*Curación de datos:* Rosa Lisbeth Aparicio Zambrano, Yndra Elena Cordero de Rojas, Francisco Javier Ustáriz Fajardo, Marylenlid Rossana Isla Chacón.

*Análisis formal:* María Eugenia Lucena de Ustáriz, Rosa Lisbeth Aparicio Zambrano, Francisco Javier Ustáriz Fajardo.

*Investigación:* Meybi Yurasca García Bustamante, Keiri Yulith Rojas Guerrero, Yndra Elena Cordero de Rojas, Clara Díaz de González.

*Metodología:* Rosa Lisbeth Aparicio Zambrano, Liliana Margarita Araujo Baptista, Clara Díaz de González.

*Supervisión:* Yndra Elena Cordero de Rojas, Clara Díaz de González, Marylenlid Rossana Isla Chacón.

*Validación:* Yndra Elena Cordero de Rojas, Clara Díaz de González, Rosa Lisbeth Aparicio Zambrano.

*Visualización:* Yndra Elena Cordero de Rojas, María Eugenia Lucena de Ustáriz, Francisco Javier Ustáriz Fajardo.

*Redacción - borrador original:* Meybi Yurasca García Bustamant, Keiri Yulith Rojas Guerrero, Yndra Elena Cordero de Rojas.

*Redacción - revisión y edición:* María Eugenia Lucena de Ustáriz, Francisco Javier Ustáriz Fajardo.

### **Financiación**

Universidad de Los Andes, Mérida, República Bolivariana de Venezuela, Programa de Apoyo Directo a Grupos de Investigación (ADG) del Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico, Tecnológico y de las Artes, Grupo de Investigación: Productos Naturales y Química Medicinal. Instituto de Investigaciones. Sección Productos Naturales. Facultad de Farmacia y Bioanálisis de Universidad de Los Andes.