

INSTITUTO FEDERAL GOIANO – CAMPUS RIO VERDE
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROQUÍMICA

COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS
ÓLEOS ESSENCIAIS DAS CASCAS DE DUAS VARIEDADES DE
Citrus sinensis E DAS FLORES DE *Psidium guajava*.

Autora: Jessika Lima Rezende
Orientadora: Dra. Cassia Cristina Fernandes Alves

RIO VERDE – GO
Fevereiro – 2020

INSTITUTO FEDERAL GOIANO – CAMPUS RIO VERDE
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROQUÍMICA

COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS ÓLEOS
ESSENCIAIS DAS CASCAS DE DUAS VARIEDADES DE *Citrus sinensis* E DAS
FLORES DE *Psidium guajava*.

Autora: Jessika Lima Rezende
Orientadora: Dra. Cassia Cristina Fernandes Alves

Dissertação apresentada como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM AGROQUÍMICA, no Programa de Pós-Graduação em Agroquímica do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde – Área de concentração Agroquímica.

RIO VERDE – GO
Fevereiro – 2020

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR PRODUÇÕES TÉCNICO-CIENTÍFICAS NO REPOSITÓRIO INSTITUCIONAL DO IF GOIANO

Com base no disposto na Lei Federal nº 9.610/98, AUTORIZO o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, a disponibilizar gratuitamente o documento no Repositório Institucional do IF Goiano (RIIF Goiano), sem ressarcimento de direitos autorais, conforme permissão assinada abaixo, em formato digital para fins de leitura, download e impressão, a título de divulgação da produção técnico-científica no IF Goiano.

Identificação da Produção Técnico-Científica

- | | |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> Tese | <input type="checkbox"/> Artigo Científico |
| <input checked="" type="checkbox"/> Dissertação | <input type="checkbox"/> Capítulo de Livro |
| <input type="checkbox"/> Monografia – Especialização | <input type="checkbox"/> Livro |
| <input type="checkbox"/> TCC – Graduação | <input type="checkbox"/> Trabalho Apresentado em Evento |
| <input type="checkbox"/> Produto Técnico e Educacional - Tipo: _____ | |

Nome Completo do Autor: Jessika Lima Rezende

Matrícula: 20181033103I0175

Título do Trabalho: COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DAS CASCAS DE DUAS VARIEDADES DE *Citrus sinensis* E DAS FLORES DE *Psidium guajava*.

Restrições de Acesso ao Documento

Documento confidencial: Não Sim, justifique: _____

Informe a data que poderá ser disponibilizado no RIIF Goiano: 31 / 03 / 2020

O documento está sujeito a registro de patente? Sim Não

O documento pode vir a ser publicado como livro? Sim Não

DECLARAÇÃO DE DISTRIBUIÇÃO NÃO-EXCLUSIVA

O/A referido/a autor/a declara que:

- o documento é seu trabalho original, detém os direitos autorais da produção técnico-científica e não infringe os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade;
- obteve autorização de quaisquer materiais incluídos no documento do qual não detém os direitos de autor/a, para conceder ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano os direitos requeridos e que este material cujos direitos autorais são de terceiros, estão claramente identificados e reconhecidos no texto ou conteúdo do documento entregue;
- cumpriu quaisquer obrigações exigidas por contrato ou acordo, caso o documento entregue seja baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano.

Rio Verde GO 31 / 03 / 2020
Local Data

Jessika Lima Rezende
Assinatura do Autor e/ou Detentor dos Direitos Autorais

Ciente e de acordo:

[Assinatura]
Assinatura do(a) orientador(a)

Sistema desenvolvido pelo ICMC/USP
Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas - Instituto Federal Goiano

Rc Rezende, Jessika Lima
COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS
ÓLEOS ESSENCIAIS DAS CASCAS DE DUAS VARIEDADES DE
Citrus sinensis E DAS FLORES DE Psidium guajava. /
Jessika Lima Rezende; orientadora Cassia Cristina
Fernandes Alves; co-orientador Mayker Lázaro Dantas
Miranda. -- Rio Verde, 2020.
63 p.

Dissertação (em Agroquímica) -- Instituto Federal
Goiano, Campus Rio Verde, 2020.

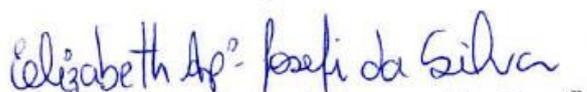
1. Rhizopus stolonifer. 2. Laranja. 3. Xylella
fastidiosa . 4. goiaba. 5. óleo essencial. I.
Fernandes Alves, Cassia Cristina, orient. II.
Dantas Miranda, Mayker Lázaro, co-orient. III.
Título.

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS
DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DAS CASCAS DE DUAS
VARIEDADES DE *Citrus sinensis* E DAS FLORES DE
*Psidium guajava***

Autora: Jessika Lima Rezende
Orientadora: Cássia Cristina Fernandes Alves

TITULAÇÃO: Mestre em Agroquímica – Área de concentração
Agroquímica.

APROVADA em 19 de fevereiro de 2020.


Prof.^a Dr.^a Elizabeth Aparecida Josefi
da Silva
Avaliadora externa
IESRIVER / Rio Verde


Prof. Dr. Eugenio Miranda
Sperandio
Avaliador externo
IF Goiano / Rio Verde


Prof.^a Dr.^a Cássia Cristina Fernandes Alves
Presidente da Banca
IF Goiano / Rio Verde

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente, a Deus, pelo milagre da vida.

Aos meus pais, Lucimar Lima Rezende e Aparecido Roberto da Silva Rezende, que me incentivaram e apoiaram nos momentos difíceis dessa caminhada.

Ao meu esposo, Eder Freitas Xavier, pelas palavras de incentivo e auxílio em alguns experimentos.

À minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Cássia Cristina Fernandes Alves, obrigada por me aceitar, por acreditar que eu conseguiria atingir nossos objetivos, pelo incentivo e pela sua amizade serei eternamente grata.

Ao meu Coorientador, Prof. Dr. Mayker L. Dantas Miranda, pelo apoio, dedicação, amizade, ajuda nas análises e na escrita deste trabalho.

Às minhas colegas de mestrado Flavia Fernanda e Larissa Sousa, por sua amizade, por toda ajuda nas análises antifúngicas, apoio e incentivo.

Aos meus colegas do Laboratório de Química de Produtos Naturais e do Mestrado em Agroquímica, pela amizade, pelas trocas de conhecimento, apoio e dedicação.

À aluna de iniciação científica, Amanda Messias, que me auxiliou no desenvolvimento dos experimentos.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, pela dedicação, empenho e conhecimentos transmitidos.

A todos que contribuíram de forma direta ou indireta, sinto-me eternamente grata por toda experiência transmitida.

Ao Instituto Federal Goiano–Campus Rio Verde e ao Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, pela oportunidade concedida.

BIOGRAFIA DA AUTORA

Jessika Lima Rezende, filha de Lucimar Lima Rezende e Aparecido Roberto da Silva Rezende, nasceu em 30 de julho de 1991 na cidade de Rio Verde - GO. Em agosto de 2014, graduou-se em Química pelo Instituto Federal Goiano, campus Rio Verde-Goiás. Em março de 2019, iniciou no curso de pós-graduação *stricto sensu* em Agroquímica, no Instituto Federal Goiano, Campos Rio Verde- GO. Atuando na linha de pesquisa em Química dos Produtos Naturais.

ÍNDICE

RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	3
1. INTRODUÇÃO.....	5
1.1 Óleos essenciais	5
1.2 Gênero <i>Citrus</i>	6
1.3 Gênero <i>Psidium</i>	6
1.4 Fungo: <i>Rhizopus stolonifer</i>	7
1.5 Atividades biológicas dos óleos essenciais	8
2. OBJETIVOS	12
CAPÍTULO I- Potencial antifúngico de óleos essenciais a partir de duas variedades de <i>Citrus sinensis</i> (laranja-lima e laranja-bahia) no controle pós-colheita de <i>Rhizopus stolonifer</i> (Ehrenb :. Fr.) Vuill	13
RESUMO.....	13
CHAPTER I- Antifungal potential of essential oils from two varieties of <i>Citrus sinensis</i> (lima orange and bahia navel orange) in postharvest control of <i>Rhizopus stolonifer</i> (Ehrenb.: Fr.) Vuill.	14
ABSTRACT.....	14
1. INTRODUÇÃO.....	15
2 MATERIAL E MÉTODOS	16
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	19
4 CONCLUSÃO	24
5. REFERÊNCIAS.....	24

CAPÍTULO II- Efeitos potenciais da composição química do óleo essencial de flores de Psidium guajava L., (Myrtaceae) nas atividades antibacteriana, tripanocida e citotóxica.	28
RESUMO.....	28
CHAPTER II - Effects used in the chemical composition of the essential oil of flowers of Psidium guajava L., (Myrtaceae) on antibacterial, trypanocidal and cytotoxic activities.	30
ABSTRACT.....	30
2.1 INTRODUÇÃO	32
2.2 MATERIAL E MÉTODOS	35
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
2.4 CONCLUSÃO	45
2.5 REFERÊNCIAS.....	46
CONCLUSÕES GERAIS.....	52

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
Capítulo I	
Tabela 1- composição química dos OE da casca de laranja- lima fresca	19
Tabela 2-composição química dos OE da casca de laranja-bahia fresca.....	20
Capítulo II	
Tabela 1-Composição química do óleo essencial de flores de Psidium guajava (OE-PG)	39
Tabela 2-Atividade tripanocida <i>in vitro</i> do óleo essencial de flores de P. guajava (Myrtaceae).....	43
Tabela 3- Atividade citotóxica do óleo essencial de flores de P. guajava (Myrtaceae)..	44

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
<u>Capítulo I</u>	
Figura 1 – Estrutura química do composto majoritário de ambas as laranjas: Limoneno.	20
Figura 2- Porcentagens de inibição do crescimento micelial de <i>R. stolonifer</i> em diferentes doses (25 µL - 100 µL) de OE de casca de laranja-lima fresca.	22
Figura 3- Porcentagens de inibição do crescimento micelial de <i>R. stolonifer</i> em diferentes doses (25 µL - 100 µL) de OE de casca de laranja-bahia fresca.	22
<u>Capítulo II</u>	
Figura 4-Folhas e flores de <i>P. guajava</i> (Myrtaceae).....	35
Figura 5- Estrutura química dos compostos majoritários identificados no óleo essencial das flores de goiabeira.....	40

ÍNDICE DE SIGLAS E ABREVIACÕES

CG – EM	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
CG – DIC	Cromatografia com detector por Ionização de Chama
OE	Óleo essencial
OEs	Óleos essenciais
OE-PG	Óleo essencial de <i>Psidium guajava</i> .
BDA	Ágar batata dextrose
CMI	Concentração mínima inibitória
CIMs	Concentrações inibitórias mínimas
CVC	Clorose variegada dos citros
LLCMK2	Linhagem de fibroblastos
CI50	Concentração Inibitória de 50%
CC50	Concentração citotóxica para 50% das células
MTT	Brometo de [3-(4,5-dimetitiazol-2-il)- 2,5-difeniltetrazólio]
RPMI	Meio Roswell Park Memorial Institute
DMSO	Dimetilsulfóxido

RESUMO

REZENDE, JESSIKA LIMA. Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde – GO, fevereiro de 2020. **Composição química e atividades biológicas dos óleos essenciais das cascas de duas variedades de *Citrus sinensis* e das flores de *Psidium guajava*.** Orientadora: Dr.^a Cassia Cristina Fernandes Alves. Coorientador Dr. Mayker L. Dantas Miranda.

Óleos essenciais (OEs) são uma mistura de compostos voláteis, extraídos de partes vegetais, são responsáveis pelos mecanismos de defesa e proteção das plantas. Apresentando diversas atividades biológicas dentre elas podem ser citadas: antifúngica, antimicrobiana e antioxidante. Apresentam também grande potencial no controle de fitopatógenos, são menos agressivos ao ser humano e ao meio ambiente, além de serem biodegradáveis e de baixo custo. Diante disso; objetivou-se neste estudo, determinar a composição química do óleo essencial das cascas de *Citrus Limettioides* Tanaka, *Citrus sinensis* L. Osbeck e das inflorescências de *Psidium guajava* e suas atividades antiparasitárias, bem como a atividade antifúngica, antimicrobiana e citotóxica. O óleo essencial das duas variedades de *Citrus sinensis* e flores de *Psidium guajava* foram obtidos pelo processo de hidrodestilação utilizando aparelho de clewenger. Os OEs foram analisados utilizando cromatografia gasosa, com detector por ionização de chama (CG-FID) e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-MS). A atividade antifúngica foi avaliada contra o fungo *Rhizopus stolonifer*, a atividade tripanocida foi avaliada sobre formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*, e a atividade antibacteriana *in vitro* frente às bactérias *X. fastidiosa* e *P. carotovorum* foi determinada pelo método de diluição em caldo. A atividade citotóxica foi avaliada sobre fibroblastos e determinada pelo método do MTT. O limoneno foi o principal monoterpeneo identificado nos OEs das cascas de laranja-lima (95,2%)

e laranja-bahia (93,2%). Os OEs de *Citrus Limettioides* Tanaka e *Citrus sinensis* L. Osbeck inibiram 91,95% e 80,05% do crescimento micelial de *R. stolonifer*, respectivamente, nas doses de 100 µL de óleo. O OE das flores de *Psidium guajava* apresentou uma mistura de sesquiterpenos, tendo como compostos majoritários α -cadinol (37,8%), β -cariofileno (12,2%), nerolidol (9,1%), α -selineno (8,8%), β -selineno (7,4%) e óxido de cariofileno (7,2%). Os resultados mostraram que o OE-PG apresentou forte atividade tripanocida contra as formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* com (CI 50 = 14,6 µg / mL), e atividade antibacteriana contra as bactérias *X. fastidiosa* e *P. carotovorum* com (CIM = 12,5 µg / mL) e (CIM = 62,5 µg/mL) respectivamente, apresentando citotoxicidade moderada frente a fibroblastos da linhagem LLCMK2 na concentração avaliada (CC₅₀ = 250,5 µg/mL). Em suma, os óleos essenciais das cascas de *Citrus Limettioides* Tanaka e *Citrus sinensis* L. Osbeck apresentaram alta atividade antifúngica contra o fungo *Rhizopus stolonifer*, enquanto o óleo essencial das flores de goiabeira apresentou moderada atividade antibacteriana e citotóxica, demonstrando o potencial dos óleos essenciais como alternativa aos pesticidas sintéticos na agricultura, bem como no desenvolvimento de novos medicamentos.

PALAVRA-CHAVES: Laranja, Óleo essencial, *Rhizopus stolonifer*, Flores e Atividade antifúngica.

ABSTRACT

REZENDE, JESSIKA LIMA. Instituto Federal Goiano- Rio Verde Campus - GO, February of 2020. **Essencial oils chemical composition and biological activities of two varieties of *Citrus sinensis* barks and *Psidium Guajava* flowers.** Advisor: Dr. Cassia Cristina Fernandes Alves. Co-adviser Dr. Mayker L. Dantas Miranda.

Essential oils (OEs) are a mixture of volatile compounds extracted from plant parts and are responsible by defense and protection mechanisms of plants. They are responsible for several biological activities among them we can mention: antifungal, antimicrobial and antioxidant. They also have great potential in the phytopathogens control, are less aggressive to humans and to environment are biodegradable and with low cost . Considering that the objective of this study was to determine the essential oil chemical composition of *Citrus Limettioides* Tanaka , *Citrus sinensis* L. Osbeck bark and inflorescences *Psidium guajava* flower also its antiparasitic activities, as well as antifungal, antimicrobial and cytotoxic activity. The essential oils from two varieties of *Citrus sinensis* and from *Psidium guajava*. flowers were obtained by hydrodistillation using a clevenger apparatus . The OEs were analyzed using gas chromatography, flame ionization detector (CG-FID) and mass spectrometry-coupled gas chromatography (CG-MS). Antifungal activity was evaluated against *Rhizopus stolonifer* fungus, activity against trypanocidal was evaluated on trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi*, and antibacterial activity in vitro on the bacteria *X. fastidiosa* and *P. carotovorum* was determined by the broth dilution method. Cytotoxic activity was evaluated on fibroblasts and determined by the MTT method. The limonene was the principal monoterpene identified in OEs from bark of lime orange file (95,2%) and bahia orange (93.2%). The OEs of *Citrus Limettioides* Tanaka and *Citrus sinensis* L. Osbeck inhibited 91.95% and 80.05% of the growing mycelium of R. stolonifer growing, respectively, at the doses 100 µl oil doses. The OE of flowers of *Psidium guajava* . Flowers presented a mixture of sesquiterpenes , having as major compounds α - cadinol (37.8%), β - caryophyllene (12.2%), nerolidol (9.1%), α - selinene (8.8%), β - selinene

(7.4%) and caryophyllene oxide (7.2%). The results showed that OE-PG showed strong trypanocidal activity against *Trypanosoma cruzi* trypomastigote forms with (IC₅₀ = 14.6 µg / mL), and antibacterial activity against *X. fastidiosa* and *P. carotovorum* bacteria with (MIC = 12.5 µg / mL) and (MIC = 62.5 µg / mL) respectively, presenting moderate cytotoxicity against LLCMK2 strain fibroblasts at the evaluated concentration (CC₅₀ = 250.5 µg / mL). In short, the essential oils of *Citrus Limettioides* Tanaka and *Citrus sinensis* L. Osbeck bark showed high antifungal activity against *Rhizopus stolonifer* fungus, while the essential oil of guava flowers showed moderate antibacterial and cytotoxic activity, demonstrating the oils essential potencial as an alternative to synthetic pesticides in agriculture, and the development of new drugs .

Keywords: Orange, Essential oil, *Rhizopus stolonifer*, Flowers and Antifungal Activity.

1. INTRODUÇÃO

Óleos essenciais são uma mistura de compostos voláteis, extraídos a partir de material vegetal tais como: flores, folhas, raízes, sementes entre outras. Pesquisas atuais evidenciam as diferentes ações biológicas exercidas pelos óleos essenciais sobre patógenos e fitopatógenos (FELIPE et al., 2017). Entre essas ações biológicas podem ser citadas as atividades antimicrobianas, antifúngicas, antioxidantes, antiparasitárias e citotóxicas (CRUZ et al., 2015).

O Brasil é o maior produtor de frutas, com produção de 40 milhões de toneladas ao ano (FACHINELLO et al., 2011). A citricultura é uma das atividades agrícolas mais praticadas, sendo produzidos frutos como a laranja, tangerina, lima ácida e limão. A produção de citros se destaca no estado de São Paulo, onde a maior parte da produção é destinada a indústria de sucos (FERNANDES, 2010). Além disso, o óleo essencial dos citros é muito utilizado na indústria alimentícia e de perfumaria.

As doenças causadas por fitopatógenos em pós-colheita são responsáveis por 90% das perdas de frutas e hortaliças. Dentre essas doenças se destacam as infecções fúngicas causadas pelo *Rhizopus stolonifer* responsável pela podridão mole em frutos. Estudos recentes demonstram as possíveis aplicações do óleo essencial como agente antifúngico, antibacteriano e antiparasitário (COSTA et al., 2017).

Por isso, é importante a busca de meios alternativos no controle de fitopatógenos. Diante disso, a utilização de óleos essenciais se apresenta como alternativa, pois exibem diferenciadas ações biológicas.

1.1 Óleos essenciais

Os óleos essenciais são originários de duas vias metabólicas sendo uma derivada do acetil-CoA e a outra do ácido Chiquímico. São formados por mais de 20 compostos diferentes, sendo caracterizados pelos seus compostos majoritários. Sua composição pode apresentar diferentes classes de compostos como os: hidrocarbonetos, aldeídos, cetonas, óxidos, ésteres, ácidos orgânicos dentre outras (GOMES 2011).

Os óleos essenciais são definidos como mistura complexa de compostos voláteis que pertencem a duas classes, sendo os terpenos mais abundante e os fenilpropanoides menos frequentes (FELIPE et al., 2017). Eles são extraídos a partir de diversas partes da

planta (flores, cascas, ramos, folhas, frutos e sementes) através do método de hidrodestilação por arraste a vapor (BURT, 2004).

Além disso, sua aplicação é destinada na sua maioria a indústria alimentícia, na produção de condimentos e aromatizantes de bebidas e alimentos, sendo também utilizado na fabricação de cosméticos, perfumes e tratamentos de aromaterapia (OOTANI et al., 2013).

1.2 Gênero *Citrus*

O gênero *Citrus* é originário das regiões subtropicais e tropicais do sul e sudeste da Ásia, chegaram ao Brasil no século XVI trazidos pelos portugueses (GUIMARÃES et al. 2018). Pertence a família Rutaceae que é constituída por mais de 2000 espécies distribuídas em 150 gêneros encontradas em todo o mundo, porém no Brasil ela apresenta 200 espécies e 33 gêneros (BURIL et al., 2014).

A família Rutaceae é abundante no Brasil, sendo representadas pelas laranjas, limões, tangerinas e outras. O óleo essencial de laranja é extraído da fruta a partir do seu epicarpo, sendo empregado na medicina popular pelas suas propriedades terapêuticas. Além da sua finalidade terapêutica, o óleo essencial é usado na indústria de alimentos, farmacêutica e cosmética (LIMA, 2018).

O Brasil é o maior produtor de citros, sendo o estado de São Paulo o responsável pela maior exportação de suco concentrado de laranja. Pesquisas recentes mostram que os resíduos (cascas, sementes e polpas) gerados pela produção do suco de laranja são utilizados como subprodutos no mercado para a obtenção de óleo essencial, rações, essências aromáticas e álcool (FERNANDES, 2010).

A espécie *Citrus sinensis* L. osbeck é caracterizada por árvores de porte médio a grande apresentando frutos esféricos de coloração laranja e chegando a produzir 200 kg de frutos por árvore, acredita-se que essa variedade de fruto é de origem espanhola (QUEIROZ et al., 2016).

A espécie *Citrus limettioides* Tanaka é originária da Índia apresenta árvores de 4-6 m de altura, com poucos espinhos, folhas coriáceas e frutos esféricos. Essa espécie é utilizada na medicina popular para reduzir a pressão arterial, casos de febre e sinusite.

1.3 Gênero *Psidium*

Psidium guajava pertence à família Myrtaceae, conhecida popularmente como goiabeira apresenta mais de 100 gêneros e 3800 espécies. Esse gênero é representado por árvores de pequeno porte, e seu período de safra no Brasil compreende os meses de

janeiro e abril concentrando no mês de fevereiro. As folhas do gênero *Psidium* são utilizadas na medicina popular na forma de chás, por apresentarem propriedade anti-infecciosas (ANDRADE et al., 2019).

O óleo essencial e extratos vegetais obtidos pelas folhas dessa espécie são responsáveis por diversas atividades biológicas (SILVA et al., 2018). Estudos recentes comprovam o potencial dessa espécie no controle de microorganismos. Silva (2019), avaliou o óleo essencial das folhas de *Psidium guajava*, na forma de emulsão, e determinou seu efeito fungicida no controle do fungo *Sclerotinia sclerotiorum in vivo*, na cultura de soja. Os resultados obtidos demonstraram atividade antifúngica do óleo na concentração de $300 \mu\text{L}/\text{mL}^{-1}$. Barbosa et al. (2016), avaliou a atividade antifúngica dos extratos de goiabeira e romanzeiro extraídos a partir de dois solventes (éter etílico a 35% e álcool a 70%) com diferentes concentrações contra a *cândida albicans*. Observaram que ambos os extratos demonstraram atividade inibitória nos dois solventes contra *cândida albicans*, no entanto o extrato de romanzeiro utilizando o álcool 70% foi melhor que os demais, pois na concentração de 25% já mostrou atividade inibitória enquanto os demais inibiram na concentração de 100%.

1.4 Fungo: Rhizopus stolonifer

O fungo *Rhizopus stolonifer* pertence ao Reino Fungi, Filo: Zygomycota, Classe: Zygomycetes, Ordem: Mucolares, Família: Mucolaceae, Gênero: Rhizopus. (NOBREGA et al., 2014). Possuem cerca de 10 espécies diferentes, algumas parasitárias e outras patogênicas, na sua maioria se alimentam de matéria orgânica (PETRUZELLO, 2019).

Rhizopus são fungos cosmopolitas, encontrados no solo, frutas e vegetais. Este é responsável pela podridão mole em pós-colheita, causando prejuízos a várias culturas como batata, melância, morango, melão e pepino (BAGGIO et al., 2016). Esse fitopatógeno é um ectoparasita de feridas, que penetra nos tecidos do hospedeiro através de uma lesão causada pela colheita, manuseio ou insetos (BAGGIO et al., 2016). Ele se propaga através de seus esporos (esporangiosporos ou zigosporos) e fragmentação de hifas, que em contato com um novo substrato se proliferam (BARRETO et al., 2016).

1.5 Atividades biológicas dos óleos essenciais

As atividades biológicas dos óleos essenciais sobre patógenos e fitopatógenos vêm sendo comprovada por diversos estudos. Além disso, os óleos essenciais possuem variada composição química, atuando contra fungos, bactérias e protozoários, sendo fonte de baixa toxicidade e ação natural (MACHADO et al., 2017).

Estudos sobre a atividade antifúngica dos óleos essenciais têm sido relatados na literatura. Elizei et al. (2016), avaliaram o efeito *in vitro* do óleo de café verde sobre o crescimento micelial e a esporulação dos fungos *Penicillium roqueforti* e *Rhizopus stolonifer*, utilizando dois métodos de aplicação, sendo um volátil e o outro direto. Assim, observaram que o contato direto do óleo essencial não inibiu o crescimento micelial dos dois fungos, no entanto a ação do óleo volatilizado reduziu a produção de esporulação de ambos. Freddo et al., (2016), analisaram o potencial do óleo essencial de erva-luísia (*Aloysia citriodora*) no controle *in vitro* de *Fusarium sp.*, e concluíram que o óleo essencial em maiores concentrações foi mais eficiente na redução do crescimento micelial do fungo e germinação de conídios. Fernandes et al., (2015), estudaram o efeito *in vitro* do óleo essencial das folhas de Alecrim da Chapada (*L. gracilis*) no controle do fungo *Monosporascus cannonballus*, e observaram que o óleo essencial inibiu em 100% o crescimento micelial do fungo, essa ação biológica se deve aos compostos majoritários presente no óleo essencial.

A ação antimicrobiana dos óleos essenciais também é demonstrada em vários estudos na literatura. Pombo et al., (2018), avaliaram o efeito antimicrobiano e sinérgico de óleos essenciais de *Eugenia caryophyllata* (cravo) e *Origanum vulgare* (orégano) sobre bactérias contaminantes de alimentos: *Escherichia coli*, *Salmonella entérica*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*, sendo observado o maior potencial de inibição do óleo essencial de orégano frente as bactérias. Concluíram também que as misturas em maiores concentrações de orégano e menor de cravo potenciaram o efeito antimicrobiano. Valeriano et.al (2012), avaliaram a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de hortelã-pimenta (*Mentha piperita*), capim-limão (*Cymbopogon citratus*), Manjerona (*Ocimum basilicum*) e manjeriço (*Origanum majorana*) contra cepas de *Escherichia coli* enteropatogênica, *Salmonella enterica* Enteritidis, *Listeria monocytogenes* e *Enterobacter sakazaki*, em que os resultados evidenciaram atividade antimicrobiana dos óleos essenciais na maioria das bactérias testadas. Além disso, o potencial tripanocida, leishmancida e citotóxico dos óleos essenciais também são

relatados na literatura. Miranda et al. (2017), avaliaram a composição química do óleo essencial das flores de *Eugenia Klotzschiana* (pera-do-cerrado), bem como suas atividades tripanocida e citotóxica *in vitro* e obtiveram resultados positivos. Silva et al. (2017), avaliaram a atividade leishmanicida e citotóxica do óleo essencial das folhas da espécie *Banisteriopsis oxyclada* (cipó-prata), e concluíram através do índice de seletividade que o óleo essencial é 0,05 % menos tóxica para a célula do que para o protozoário.

Assim, pode se concluir que os óleos essenciais são responsáveis por diversas atividades biológicas, podendo ser utilizados tanto no controle de doenças causadas por fungos quanto por bactérias.

1.6 REFERÊNCIAS

ANDRADE, A. P. C. et al. A ação antimicrobiana dos extratos alcoólicos e aquosos da folha da goiabeira (*Psidium guajava*.) no controle de *Staphylococcus aureus* ATCC 27922, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Listeria monocytogenes* SCOTT A. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v. 26, p. e019028-e019028, 2019.

BAGGIO, J. S. et al. Direct penetration of *Rhizopus stolonifer* into stone fruits causing rhizopus rot. **Plant Pathology**, v. 65, n. 4, p. 633-642, 2016.

BARBOSA, C. S. et al. Atividade antifúngica preliminar dos extratos de *Punica granatum* (Linnaeus) e *Psidium guajava* (Linnaeus) sobre *Candida albicans*. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, v. 11, n. 1, p. 66-73, 2016.

BARRETO, T. A. et al. Efeitos da aplicação de revestimento de quitosana e óleo essencial de orégano no controle da qualidade pós-colheita em tomates cereja. 2016.

BURIL, M. T.; THOMAS, W. W.; ALVES, M. Flora da Usina São José, Igarassu-PE: Rutaceae, Simaroubaceae e Picramniaceae. **Rodriguésia**, v. 65, n. 3, p. 701-710, 2014.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. **International journal of food microbiology**, v. 94, n. 3, p. 223-253, 2004.

COSTA, S. S. et al. Atividade Antifúngica de Óleos Essenciais de Espécies de Hyptidinae (Lamiaceae) sobre *Aspergillus niger* e *Rhizopus stolonifer*, p. 79, 2017.

CRUZ, T.P. et al. Atividade fungicida do óleo essencial de *Cymbopogon winterianus jowit* (Citronela) contra *Fusarium solani*. **Bioscience Journal**, v. 31, n. 1, 2015.

ELIZEI, V. G. et al. Atividade antifúngica, in vitro, do óleo de café verde. **Arq. Inst. Biol**, v. 83, p. e1162013-e1162013, 2016.

FACHINELLO, J. C. et al. Situação e perspectivas da fruticultura de clima temperado no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. SPE1, p. 109-120, 2011.

FELIPE, L. O.; BICAS, J. L. Terpenos, aromas e a química dos compostos naturais. **Química Nova na Escola**, v. 39, n. 2, p. 120-130, 2017.

FERNANDES B. C.. Desenvolvimento histórico da citricultura. 2010.

FERNANDES, L. C. B. et al. Fungitoxicidade dos extratos vegetais e do óleo essencial de *Lippia gracilis* Schauer sobre o fungo *Monosporascus cannonballus* Pollack e Uecker. **Summa Phytopathologica**, v. 41, n. 2, p. 153-155, 2015. <http://dx.doi.org/10.1590/0100-5405/1978>

FREDDO, A. R. et al. Potencial do óleo essencial de erva-lúisa (*Aloysia citriodora* Palau) no controle de *Fusarium* sp. in vitro. **Rev. Bras. Pl. Med. Camp.**, v. 18, n. 2, p. 558-562, 2016.

GOMES, M. S. Caracterização Química e Atividade Antifúngica dos Óleos Essenciais de Cinco Espécies do Gênero CITRUS. Tese de Doutorado. Dissertation (Master degree)–postgraduate course of Agrochemistry, Federal University of Lavras, Lavras–Brazil.2011.

GUIMARÃES, D. L. P.; DE CARVALHO, A. N.; TESTON, J. A. Ocorrência de *pleiommatia corniculata* young, 1977 (hemiptera: cicadellidae) em um pomar de citros em altamira, pará, brasil. **Revista Agroecossistemas**, v. 10, n. 2, p. 225-237, 2018.

LIMA, A. F.C. Atividade anestésica de óleo essencial de *Citrus* sp. e parâmetros de qualidade de água em juvenis de Tambatinga. 2018.

MACHADO, R. F. C. et al. Óleos essenciais na qualidade e no controle de podridões pós-colheita em tomate. **Revista de ciências agroambientais**, v. 15, n. 1, 2017.

MIRANDA, M. L. D. et al. Óleo essencial das flores de *Eugenia klotzschiana* (Myrtaceae): sua composição química e atividades tripanocida e citotóxica in vitro. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 3, 2017.

NÓBREGA, F. M. et al. Investigação da atividade antifúngica do alfa-pineno sobre cepas de *Rhizopus oryzae*. 2014.

OOTANI, M. A. et al. Use of essential oils in agriculture. **Journal of biotechnology and biodiversity**, v. 4, n. 2, p. 162-175, 2013.

PETRUZZELLO, M. *Rhizopus*. Encyclopædia Britannica, 2019. Disponível em <<https://www.britannica.com/science/Rhizopus>>. Acesso em 02 de outubro de 2019.

POMBO, J. C. P. et al. Efeito antimicrobiano e sinérgico de óleos essenciais sobre bactérias contaminantes de alimentos. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v. 25, n. 2, p. 108-117, 2018.

QUEIROZ, R. A. et al. Modelagem e simulação do resfriamento do leite de frutas não climatéricas com ar forçado. Estudo de caso: laranja valência. 2016.

SILVA, E. A. J. et al. Antibacterial and antiproliferative activities of the fresh leaf essential oil of *Psidium guajava*. (Myrtaceae). **Brazilian Journal of Biology**, n. ahead, 2018. <http://dx.doi.org/10.1590/1519-6984.189089>

SILVA, E. A. J. Óleo essencial das folhas de *psidium guajava*: controle de sclerotinia sclerotiorum em soja, atividade bactericida e anticariogênica. 2019.

SILVA, L. A. et al. Atividade antioxidante e antimicrobiana do fracionamento bioguiado do extrato etanólico do caule e atividade leishmanicida e citotóxica do óleo essencial das folhas da espécie *Banisteriopsis oxyclada* (A. Juss.) B. Gates. 2017.

VALERIANO, C. et al. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais em bactérias patogênicas de origem alimentar. **Revista brasileira de plantas medicinais**, v. 14, n. 1, p. 57-67, 2012.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar a composição química dos óleos essenciais obtidos das espécies *Citrus sinensis* L. Osbeck, *Citrus Limettioides* Tanaka e *Psidium guajava*, bem como determinar suas potenciais atividades biológicas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extrair e caracterizar por CG-MS e CG-FID os óleos essenciais das cascas de *Citrus sinensis* L. Osbeck, *Citrus Limettioides* Tanaka e das flores de *Psidium guajava*;
- Avaliar a atividade antifúngica *in vitro* dos óleos essenciais extraídos das cascas de *Citrus sinensis* L. Osbeck e *Citrus Limettioides* Tanaka frente ao fungo fitopatogênico *Rhizopus stolonifer*;
- Avaliar a atividade antimicobriana *in vitro* do óleo essencial das flores de *Psidium guajava*, contra as bactérias *Xylella fastidiosa* e *Pectobacterium carotovorum*;
- Determinar a atividade antiparasitária *in vitro* do óleo essencial das flores de *Psidium guajava*;
- Verificar o efeito citotóxico *in vitro* do óleo essencial extraído das flores de *Psidium guajava*.

CAPÍTULO I- Potencial antifúngico de óleos essenciais a partir de duas variedades de *Citrus sinensis* (laranja-lima e laranja-bahia) no controle pós-colheita de *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb .: Fr.) Vuill .

(Normas de acordo com a revista Food Science and Technology)

RESUMO

O Brasil, maior produtor mundial de citros, produz cerca de 19 milhões de toneladas por ano e exporta grande parte de sua produção, como suco de laranja. Os óleos essenciais (OEs) extraídos de folhas, frutos e flores de muitas espécies do gênero *Citrus* têm sido amplamente utilizados pelos resultados de suas bioatividades promissoras. O fungo *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb .) Vuill ., agente causador da podridão mole nos frutos, tem sido considerado um dos principais fatores que causam doenças pós-colheita, levando a grandes perdas econômicas no agronegócio. Esta pesquisa teve como objetivo avaliar a composição química e o efeito antifúngico *in vitro* de OEs de duas variedades de casca fresca de *Citrus sinensis* (laranja-lima e laranja-bahia) no crescimento micelial de *R. stolonifer*. Os OEs foram obtidos por hidrodestilação, realizado em um aparelho do tipo Clevenger, enquanto sua composição química foi analisada por cromatografia gasosa - detecção por ionização por chama (CG-FID) e espectrometria de massa acoplado a cromatografia em fase gasosa (CG-MS). O limoneno foi o principal monoterpeneo identificado nos OE da casca de laranja-lima (95,2%) e laranja-bahia (93,2%). Os OEs da laranja-lima e laranja-bahia inibiram 91,95% e 80,05% do crescimento micelial de *R. stolonifer*, respectivamente, na dose mais alta em avaliação (100 µL). Este estudo revelou o potencial biotecnológico dos OEs extraídos da casca de frutas de duas variedades de citros que podem ser aplicadas na preparação de biofilmes, de modo a revestir e preservar diferentes tipos de frutas.

PALAVRAS-CHAVE: Citros, Controle alternativo, Podridão mole, Doença pós-colheita.

CHAPTER I- Antifungal potential of essential oils from two varieties of *Citrus sinensis* (lime orange and bahia orange) in postharvest control of *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.: Fr.) Vuill.

(Standards according to Food Science and Technology)

ABSTRACT

Brazil, the world's largest citrus producer, yields around 19 million tons per year and exports most part of its production as orange juice. Essential oils (EOs) extracted from leaves, fruits and flowers of many species of the genus *Citrus* have been widely used as the result of their promising bioactivities. The fungus *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.) Vuill., an agent which causes soft rot in fruit, has been considered one of the main factors that cause postharvest diseases, thus, leading to major economic losses in agribusiness. This research aimed at evaluating the chemical composition and *in vitro* antifungal effect of EOs from two varieties of fresh *Citrus sinensis* (lime orange and bahia orange) bark on mycelial growth of *R. stolonifer*. EOs were obtained by hydrodistillation, which was carried out by a Clevenger-type apparatus, while their chemical composition was analyzed by gas chromatography-flame ionization detection (GC-FID) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Limonene was the major monoterpene identified in EOs from lime orange (95.2%) and bahia orange (93.2%) bark. EOs from lime orange and bahia orange inhibited 91.95% and 80.05% of *R. stolonifera* mycelial growth respectively, at the highest dose under evaluation (100 μ L). This study revealed the biotechnological potential of EOs extracted from fruit bark of two varieties of citrus which may applied to biofilm preparation, so as to coat and preserve different types of fruit.

KEYWORDS: citrus, alternative control, soft rot, postharvest disease

1. INTRODUÇÃO

A citricultura é o ramo da fruticultura que se destacou em todo o mundo elevando a produção de frutas cítricas, ela foi introduzida no Brasil quando o país era uma colônia portuguesa e, desde então, tem sido muito importante para os hábitos de consumo de sua população. No entanto, o país só se tornou líder global na produção de laranja após 1960 e se tornou o principal produtor mundial dessa fruta, desde meados dos anos 80 (Couto & Canniatti-Brazaca, 2010). Apesar da alta produção de frutas tropicais, também existem muitas perdas, que correspondem em média a 30% da produção total. As perdas pós-colheita podem ser o resultado de várias causas, como doenças causadas por diferentes tipos de fungos (Dantas et al., 2003).

A infestação de patógenos fúngicos em citros no período pós-colheita geralmente resulta de práticas inadequadas de pré e pós-colheita, transporte e / ou embalagem. O controle das doenças pós-colheita é baseado na fertilização equilibrada dos pomares, poda para limpeza - eliminação de frutas com podridão - e pulverização de fungicidas nos bosques, desde o florescimento até a frutificação (Junqueira & Junqueira, 2014).

No período pós-colheita, o armazenamento a frio (4-7°C) tem sido recomendado para tratar frutas e retardar o desenvolvimento da podridão. A literatura relatou eficiência pós-colheita com o uso dos fungicidas estrobilurina e procloraz (Fischer et al., 2011). No entanto, alguns países não permitem mais o tratamento pós-colheita com procloraz, como resultado de crescentes restrições ao uso de determinados fungicidas no período pós-colheita (Fischer et al., 2011). Uma alternativa sustentável que visa o uso de produtos naturais levou a interesse recente em biofilmes produzidos a partir de OE para revestir frutas (Sousa et al., 2019). Essa alternativa melhora a aparência dos frutos e aumenta os períodos de preservação, fato que pode ser explicado pela diminuição da taxa transpiratória e da atividade metabólica dos fungos (Fischer et al., 2011).

O fungo *Rhizopus stolonifer* agente causador da podridão mole nos frutos, foi considerado um dos principais fatores que causam doenças pós-colheita; sendo frequentemente responsável por 50% da perda de frutas que seriam comercializadas

(Bassetto et al., 2007). Embora os tratamentos térmicos e químicos sejam os mais comuns no controle de *R. stolonifer* e de outros fungos em alimentos, a busca por novos agentes antimicrobianos baseados em plantas tem sido intensa por causa da resistência de microrganismos a produtos sintéticos (Elizei et al., 2016).

Considerando muita controvérsia sobre o uso de fungicidas sintéticos na agricultura, pelos riscos à saúde e ao meio ambiente, este estudo objetivou encontrar alguma aplicação e/ou uso para a casca de frutas de duas variedades de citros, consideradas resíduos nas indústrias de suco de laranja. Portanto foram extraídos os óleos essenciais (EOs) das cascas de frutas de duas variedades de *Citrus sinensis* (laranja-lima e laranja-bahia) e foram determinadas a sua composição química e atividade antifúngica *in vitro* contra *R. stolonifer*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

Os frutos de ambas as variedades de *Citrus sinensis* (laranja-lima e laranja-bahia) foram comprados em 12 de fevereiro de 2018, em Rio Verde, Goiás , Brasil. As frutas foram lavadas com água, secas e descascadas para que as cascas frescas pudessem ser coletadas . Ambas as variedades de *Citrus sinensis* foram identificadas pela botânica Erika Amaral e as amostras foram depositadas como exsicata no Herbarium Jataiense, professor Germano Guarim Neto sob os números de identificação HJ # 151 (laranja-lima) e HJ # 152 (laranja- bahia) .

2.2 Extração de OEs

Amostras de cascas fresca de *C. sinensis* (laranja-lima e laranja-bahia) foram submetidas a hidrodestilação durante 2 horas em um aparelho do tipo Clevenger. Para realizar a análise, 300 g de material vegetal foram divididos em três amostras de 100 g e 500 mL de água destilada foram adicionados a cada amostra. Após a coleta manual das amostras de OE, os vestígios de água remanescente nos óleos foram removidos com

sulfato de sódio anidro e depois filtrados. Os óleos isolados foram armazenados sob refrigeração até a análise e teste.

2.3 Identificação da composição química dos OEs

As análises para a identificação dos OEs foram feitas por cromatografia gasosa (CG) que foram realizadas por um cromatógrafo a gás Shimadzu CG2010 Plus equipado com amostrador automático AOC-20 com detector de ionização de chama FID e um processador de manipulação de dados. Uma coluna capilar de sílica fundida Rtx-5 (Restek Co., Bellefonte, PA, EUA) (30 mx 0,25 mm d.i ; espessura de filme de 0,25 µm) foi empregada. As condições de operação foram as seguintes: a temperatura da coluna foi programada para subir de 60 para 240°C a 3°C / min e, depois manter a 240°C por 5 minutos; o gás transportador = He (99,999%), a 1,0 mL/min; modo de injeção: volume de injeção , 0,1 µL (razão de separação de 1:10); e temperaturas de injetor e detector = 240 e 280°C, respectivamente. As concentrações relativas de componentes foram obtidas pela normalização da área de pico (%). Por fim, as áreas relativas foram a média de análises CG-FID em triplicata.

As análises de CG-MS foram realizadas por um sistema Shimadzu QP2010 Plus (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) equipado com amostrador automático AOC-20i. A coluna utilizada foi uma sílica fundida de um fio fundido RTX-5MS (Restek Co., Bellefonte, PA, EUA) (30 mx 0,25 mm d.i. x 0,25 de espessura de filme). O modo de ionização de elétrons ocorreu a 70 eV. O hélio (99,999%) foi empregado como gás carreador a um fluxo constante de 1,0 mL/min. O volume da injeção foi de 0,1 µL (razão de divisão de 1:10). As temperaturas do injetor e da fonte de íons foram ajustadas em 240 e 280°C, respectivamente. O programa de temperatura do forno era o mesmo utilizado para o CG. Os espectros de massa foram tirados com um intervalo de varredura de 0,5 s, na faixa de massa de 40 a 600 Da.

A identificação de componentes voláteis da casca fresca de *C. sinensis* (laranja-lima e laranja-bahia) (Tabela I e Tabela II) foi baseada em seus índices de retenção em uma coluna capilar Rtx-5MS, nas mesmas condições de operação que no caso de CG

em relação a uma série homóloga de *n*- alcanos (C₈-C₂₀). As estruturas foram computadorizadas com as bibliotecas de espectros Wiley 7, NIST 08 e FFNSC 1.2 e seus padrões de fragmentação foram comparados com dados da literatura (Adams, 2007).

2.4 Atividade antifúngica *in vitro* de OEs de casca de *C. sinensis* fresca (laranja-lima e laranja-bahia) contra fitopatógeno *R. stolonifer*

Os isolados patogênicos de *R. stolonifer* foram coletados em novembro de 2018, por isolamento direto das estruturas fúngicas das uvas infectadas. Os ensaios foram realizados no laboratório de microbiologia agrícola do IF Goiano - Campus Rio Verde e a atividade antifúngica dos OE da casca de frutas de *C. sinensis* foi avaliada de acordo com o método de difusão em disco descrito por Xavier et al. (2016), em doses de 25, 50, 75 e 100 µL de OE puro (Figura 1 - laranja-lima e Figura 2 – laranja- bahia). Os controles negativos foram placas sem adição de OE (testemunha), enquanto o controle positivo foi o fungicida Carboxin + Thiram , a 25 µg / mL de ingrediente ativo. As placas de Petri foram esterilizadas e preparadas com meio de cultura BDA . Após a solidificação do meio, as doses de OEs mencionadas anteriormente, foram adicionados e espalhadas sobre a superfície da placa com a ajuda de uma alça de Drigalski . Posteriormente, discos médios de BDA com 5 mm de diâmetro e micélios com 10 dias de idade foram colocados no centro da placa. Em seguida, elas foram incubadas a 28 ± 2°C. O crescimento micelial foi medido diariamente, até que o fungo crescesse totalmente nas placas de controle. O tratamento foi realizado em quadruplicata e o delineamento experimental foi inteiramente ao acaso. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias dos tratamentos foram avaliadas pelo teste de Scott-Knott, com nível de significância de 5%, pelo software SISVAR.

A porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) foi calculada pela seguinte fórmula:

$$\text{PIC} = \frac{(\text{crescimento controle} - \text{crescimento tratamento})}{(\text{crescimento controle})} \times 100$$

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O CG-MS e o CG-FID identificaram 13 constituintes químicos no OE da casca de laranja-bahia, correspondendo a 100%, enquanto dez foram identificados no OE da casca de laranja lima, correspondendo a 100%. Os tempos de retenção, compostos identificados, índices de retenção e porcentagens relativas (%) são mostrados na Tabela I (laranja-lima) e na Tabela II (laranja-bahia). O principal componente encontrado nos OEs da casca de frutas frescas foi o limoneno (95,2% em laranja-lima; 93,2% em laranja-bahia).

TABELA 1- Composição química dos OE da casca de laranja-lima fresca.

Composto	RT (min)	RI_{exp}	RI_{lit}	RA%
α -Pineno	10.08	936	939	0.1
Mirceno	13.56	991	992	0.9
Limoneno	15.96	1030	1031	95.2
Linalool	19.93	1097	1098	1.0
Citronelal	23.81	1151	1153	1.3
α -Terpineol	24.18	1187	1189	0.1
β -Citronelol	28.95	1227	1228	1.0
<i>trans</i> - α -Bergamoteno	37.12	1434	1435	0.1
Germacrene D	38.78	1479	1480	0.1
β -Bisaboleno	39.89	1508	1509	0.2
Total				100

RT: tempo de retenção; **RI_{exp}:** índice de retenção determinado em relação aos n-alcenos (C8-C20) na coluna Rtx-5MS; **RI_{lit}:** índice de retenção da literatura (Adams, 2007); **% RA:** área relativa (área do pico em relação à área total do pico no cromatograma CG-FID).

TABELA 2-Composição química dos OE da casca de laranja-bahia fresca.

Composto	RT (min)	RT _{exp}	RT _{lit}	%RA
α -Pineno	10.10	937	939	0.3
Sabinene	12.52	975	976	1.0
Mirceno	13.36	990	992	1.4
δ -3-Careno	14.78	1011	1012	0.7
Limoneno	15.94	1030	1031	93.2
Linalool	19.93	1097	1098	0.8
Terpinen-4-ol	25.45	1176	1177	0.1
α -Terpineol	26.14	1189	1189	0.2
Decanal	27.16	1203	1204	0.6
Citronelol	28.94	1227	1228	0.1
Lauraldeido	35.88	1405	1407	0.1
<i>trans</i> -Cariofileno	35.45	1418	1418	1.1
Valencene	38.34	1490	1491	0.4
Total				100

RT: tempo de retenção; **RI_{exp}**: índice de retenção determinado em relação aos n-alcenos (C8-C20) na coluna Rtx-5MS; **RI_{lit}**: índice de retenção da literatura (Adams, 2007); **% RA**: área relativa (área do pico ão à área total do pico no cromatograma CG-FID).

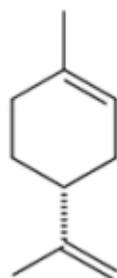


Figura 1 – Estrutura química do composto marjoritário de ambas as laranjas: Limoneno.

Em geral, os OEs chamam a atenção porque são compostos de uma mistura complexa de substâncias voláteis, que conferem aroma específico às plantas. Além disso, atuam como sistema de defesa no reino vegetal, pois são fontes de agentes químicos com atividade antibacteriana, inseticida e antifúngica; é o caso dos OEs extraídos da casca de laranja (Ferronato & Rossi, 2018). Em relação a enorme quantidade de casca de laranja gerada pelas indústrias alimentícias, a preocupação é que esse resíduo possa se tornar um problema quando for mal administrado e representar riscos ao meio ambiente e à saúde da população. Lei n. A 12.305, emitida em agosto de 2010 pela Política Brasileira de Resíduos e Sólidos, diz que um resíduo só é

considerado lixo quando todas as alternativas de uso foram utilizadas (Ferronato & Rossi, 2018).

Ferronato & Rossi (2018), também afirmaram que os OEs de *Citrus sinensis* apresentavam altos teores de limoneno (91,4%), fato que corrobora aos encontrados pelo estudo relatado neste trabalho. Eles acrescentaram que ambos os compostos mirceno e linalol eram considerados constituintes principais, em comparação com os outros, embora fossem encontrados em quantidades mais baixas.

Velázquez-Nuñez et al. (2013), investigaram componentes de OE da casca de laranja e encontraram o limoneno (96,6%) como o principal, seguido por outros terpenos, como mirceno (1,72%) e β - pineno (0,53%). Espina et al. (2011), realizaram estudo com a casca de laranja espanhola e identificaram 56 componentes; os principais foram limoneno (85,5%), óxido de cis- limoneno (1,03%) e mirceno (0,92%). Cabe destacar que alguns estudos já demonstraram a influência de genótipos nas composições químicas de OE de citros; em todas as descobertas, o limoneno foi um constituinte importante (Hosni et al., 2010). O potencial antifúngico dos OE contra os fitopatógenos pós-colheita tem atraído cada vez mais a atenção dos pesquisadores em todo o mundo (Znini et al., 2013), uma vez que esses óleos podem atuar como biofungicidas, sendo utilizados como alternativa aos fungicidas sintéticos. Portanto, a atividade antifúngica *in vitro* dos OEs da casca de *C. sinensis* fresca foi avaliada contra o fungo fitopatogênico *R. stolonifer*. Os OEs inibiram o crescimento micelial de *R. stolonifer* de uma maneira dependente da dose. As porcentagens de inibição do crescimento micelial por OEs de cascas frescas de laranja-lima e laranja-bahia são mostrados nas figuras 1 e 2.

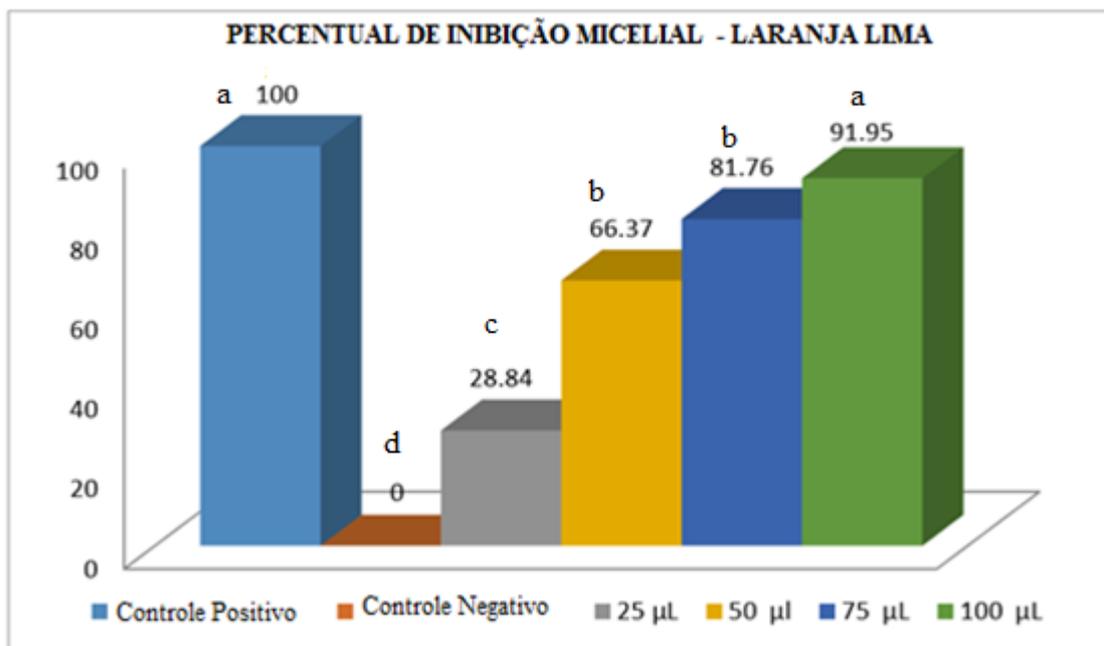


FIGURA 2- Porcentagens de inibição do crescimento micelial de *R. stolonifer* em diferentes doses (25 µL - 100 µL) de OE de casca de laranja-lima fresca. As médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott.

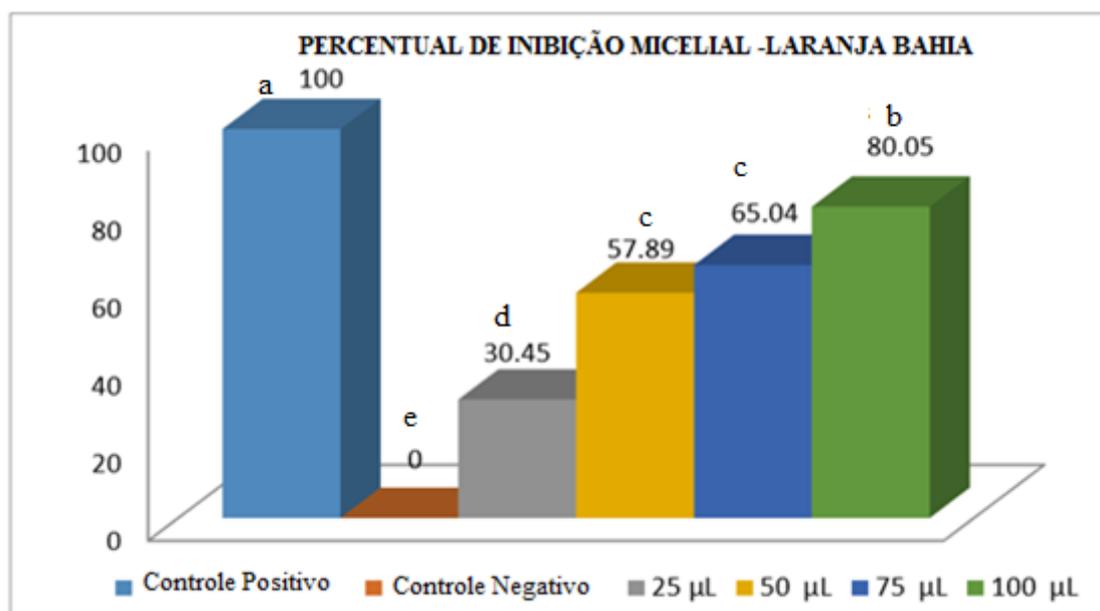


Figura 3- Porcentagens de inibição do crescimento micelial de *R. stolonifer* em diferentes doses (25 µL - 100 µL) de OE de casca de laranja-bahia fresca. As médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott.

Lorenzetti et al. (2011) afirmaram que os OEs podem conter componentes químicos em diferentes concentrações, ou seja, geralmente um componente principal e

outros, em concentrações mais baixas, trabalhando em sinergismo e contribuindo para a ação antifúngica.

Segundo Viuda-Martos et al. (2008), OEs de *C. sinensis* inibiram o crescimento *in vitro* de quatro espécies de fungos que deterioram os alimentos. Sua maior atividade inibitória foi registrada contra o *Aspergillus niger*, que foi mantido até o sétimo dia de avaliação. Passaglia (2017) submetem morangos à atividade de compostos voláteis de *Foeniculum vulgare* var. *Dulce*, *Litsea cubeba*, *Pelargonium graveolens* e *Eucalyptus citriodora* e obtiveram atividade inibitória satisfatória contra *R. stolonifer*. Vu et al. (2011) também mostraram que os OEs podem agir contra fitopatógenos de maneira eficaz quando estudam a atividade dos OE de *Cymbopogon citratus* contra *R. stolonifer*. Uma questão importante foi descrita por Fisher e Phillips (2008), que afirmam que os OE de espécies de *Citrus* são “geralmente reconhecidos como seguros” (GRAS) pela Food and Drug Administration (FDA) como aditivos alimentares, fato que lhes permite ser usado em várias matrizes alimentares.

A promissora atividade anti-*Rhizopus stolonifer in vitro* de OEs de casca de *C. sinensis* fresca pode ser justificada por seu principal constituinte químico, o limoneno que apresentou alta concentração em sua composição química total de 95,2% (Tabela I). Esse monoterpene já mostrou atividade promissora contra vários tipos de fungos, como diferentes espécies de *Candida* (Viriato, 2014). Por outro lado, Chee et al. (2009) descreveram o limoneno como um potente antifúngico contra o *Trichophyton rubrum*. Em geral, Jing et al. (2014) concluíram de forma inteligente que os OE da *Citrus* têm sido amplamente utilizados nas indústrias alimentícia e farmacêutica pela sua atividade antifúngica.

Os mecanismos de ação utilizados pelos OE para inibir a proliferação microbiana ou até a lise celular ainda não foram totalmente compreendidos, uma vez que existem poucos estudos desses mecanismos em fungos. No entanto, Nazzaro et al. (2017) afirmaram que a atividade dos OE pode ocorrer através de alterações na integridade, composição e permeabilidade das membranas celulares, provocando

estresse oxidativo, inibição de processos intracelulares de transporte de íons e ruptura das membranas celulares.

4 CONCLUSÃO

Os OEs de ambas as variedades de Citrus exibiram altos teores de limoneno, um monoterpeneo que pode estar relacionado com a promissora atividade antifúngica *in vitro* contra *Rhizopus stolonifer*. Vale ressaltar que a atividade antifúngica do limoneno puro contra *R. stolonifer* deve ser avaliada no futuro.

5. REFERÊNCIAS

ADAMS, R. P. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy, 4th ed., Allured Publishing Corporation: Carol Stream, p.804, 2007.

BASSETTO, E., AMORIM, L., BENATO, E. A., GONÇALVES, F. P., & LOURENÇO, S. A. Efeito da irradiação UV-C no controle da podridão parda (*Monilinia fructicola*) e da podridão mole (*Rhizopus stolonifer*) em pós-colheita de pêssegos. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, n.5, p. 393-399, 2007. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-41582007000500004>.

COUTO, M. A. L., & CANNIATTI-BRAZACA, S. G. Quantificação de vitamin C e capacidade antioxidante de variedades cítricas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, p. 15-19, 2010. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612010000500003>.

CHEE, H. Y., Kim, H., & LEE, M. H. *In vitro* antifungal activity of limonene against *Trichophyton rubrum*. **Mycobiology**, v. 37, n.3, p.243-246, 2009. <http://dx.doi.org/10.4489/MYCO.2009.37.3.243>.

DANTAS, S. A. F., OLIVEIRA, S. M. A., MICHEREFF, S. J., NASCIMENTO, L. C., GURGEL, L. M. S., & PESSOA, W. R. L. S. Doenças fúngicas pós-colheita em mamões e laranjas comercializados na central de abastecimento do Recife. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, n.5, p.528-533, 2003. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-41582003000500010>.

ELIZEI, V. G., CHALFOUN, S. M., BOTELHO, D. M. S., & REBELLES, P. P. R. (2016). Atividade antifúngica, *in vitro*, do óleo de café verde. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 83,p.1-7, 2016. <http://dx.doi.org/10.1590/1808-1657001162013>.

ESPINA, L., SOMOLINOS, M., LORÁN, S., CONCHELLO, P., GARCÍA, D., & PAGÁN, R. Chemical composition of commercial citrus fruit essential oils and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes. **Food Control**, v.22, p.896-902, 2011. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.11.021>.

FERRONATTO, A. N., & ROSSI, R. C. Extração e aplicação do óleo essencial da casca da laranja como um ingrediente natural. **Estudos Tecnológicos em Engenharia**, v.12, n.2, p.78-93, 2018. <http://dx.doi.org/10.4013/ete.2018.122.05>.

FISCHER, K., & PHILLIPS, C. Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer? **Trends in Food Science & Technology**, v.19, p.156-164, 2008. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2007.11.006>.

FISCHER, I. H., JÚNIOR, H. J. T., ARRUDA, M. C., & JÚNIOR, N. S. M. Pós-colheita de abacates ‘Fuerte’ e ‘Hass’: características físicas e químicas, danos e controle de doenças. **Semina: Ciências Agrárias**, v.32, n.1, p.209-220, 2011. <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2011v32n1p209>.

HOSNI, K., ZAHED, N., CHRIF, R., ABID, I., MEDFEI, W., KALLEL, M., BRAHIM, N. B., & SEBEI, H. Composition of peel essential oils from four selected Tunisian *Citrus* species: evidence for the genotypic influence. **Food Chemistry**, v.123, n.4, p.1098-1104, 2010. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.05.068>.

JUNQUEIRA, N. T. V., & JUNQUEIRA, K. P. Principais doenças de anonáceas no Brasil: descrição e controle. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, p.55-64, 2014. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-29452014000500006>.

JING, L., LEI, Z., LI, L., XIE, R., XI, W., GUAN, Y., SUMNER, L. W., & ZHOU, Z. Antifungal activity of citrus essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.62, p.3011-3033, 2014. <http://dx.doi.org/10.1021/jf5006148>.

LORENZETTI, E. R., MONTEIRO, F. P., SOUZA, P. E., SOUZA, R. J., SCALICE, H. K., DIOGO JR, R., & PIRES, M. S. O. Bioatividade de óleos essenciais no controle de *Botrytis cinerea* isolado de morangueiro. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.13, p.619-627, 2011. <http://dx.doi.org/10.1590/s1516057220011000500019>.

NAZZARO, F., FRATIANNI, F., COPPOLA, R., & DE FEO, V. Essential oils and antifungal activity. **Pharmaceuticals**, v.10, p.86, 2017. <http://dx.doi.org/10.3390/ph10040086>.

PASSAGLIA, V. Óleos essenciais no controle de *rhizopus stolonifer* e *botrytis cinerea* em morangos. 2017.49 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia (Fitopatologia)) - Universidade Federal de Lavras.

SOUSA, H. A. F., FILHO, J. G. O., EGEEA, M. B., SILVA, E. R., MACAGNAN, D., PIRES, M., & PEIXOTO, J. Active film incorporated with clove essential oil on storage of banana varieties. **Nutrition & Food Science**, v.49, n.5, p.911-924, 2019. <http://dx.doi.org/10.1108/NFS-09-2018-0262>.

VELÁZQUEZ-NUÑEZ, M. J., AVILA-SOSA, R., PALOU, E., & LÓPEZ-MALO, A. Antifungal activity of orange (*Citrus sinensis* var. Valencia) peel essential oil applied by direct addition or vapor contact. **Food Control**, v.31, p.1-4, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.09.029>.

VIUDA-MARTOS, M., RUIZ-NAVAJAS, Y., FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J., & PÉREZ-ÁLVAREZ, J. Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradise* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.)

essential oils. **Food Control**, v.19, p.1130-1138, 2008.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2007.12.003>.

VIRIATO, A. Terpenoides com atividade antifúngica para *Candida* Berkhout, causadoras de infecções hospitalares. **O mundo da Saúde**, v.38, n.1, p.40-50, 2014.
<http://dx.doi.org/10.15343/0104-7809.20143801040050>.

VU, K. D., HOLLINGSWORTH, R. G., LEROUX, E., SALMIERI, S., & LACROIX, M. Development of edible bioactive coating based on modified chitosan for increasing the shelf life of strawberries. **Food Research International**, v.44, p.198-203, 2011. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2010.10.037>.

XAVIER, M. N., ALVES, J. M., CARNEIRO, N. S., SOUCHIE, E. L., SILVA, E. A. J., MARTINS, C. H. G., AMBROSIO, M. A. L. V., EGEA, M. B., ALVES, C. C. F., & MIRANDA, M. L. D. Composição química do óleo essencial de *Cardiophyllum calophyllum* Schlttdl. (Annonaceae) e suas atividades antioxidante, antibacteriana e antifúngica. **Revista Virtual de Química**, v.8, n.5, p.1433-1448, 2016.
<http://dx.doi.org/10.21577/1984-6835.20160101>.

ZNINI, M., CRISTOFARI, G., MAJIDI, L., PAOLINI, J., DESJOBERT, J. M., & COSTA, J. Essential oil composition and antifungal activity of *Pulicaria mauritanica* Coss., against postharvest phytopathogenic fungi in apples. **LWT – Food Science and Technology**, v.54, p.564-569, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2013.05.030>.

CAPÍTULO II- Efeitos potenciais da composição química do óleo essencial de flores de *Psidium guajava* L., (Myrtaceae) nas atividades antibacteriana, tripanocida e citotóxica.

(Normas de acordo com a Revista Brazilian Journal of Biology)

RESUMO

A *Xylella fastidiosa* é uma bactéria patogênica que vive dentro dos vasos do xilema hospedeiro, e forma biofilme que é responsável por interromper a passagem de água e nutrientes. *Pectobacterium carotovorum* é uma bactéria Gram-negativa específica para a planta que causa não só podridão mole em vários hospedeiros da planta, mas também canela preta na batata por degradação da parede celular da planta. A doença de Chagas, causada pelo *Trypanosoma cruzi*, tem sido comumente tratada com nifurtimox e benzonidazol, duas drogas que causam vários efeitos colaterais. Como resultado, o uso de produtos naturais para o tratamento de doenças antibacterianas e negligenciadas aumentou nos últimos anos e as plantas se tornaram uma alternativa promissora para o desenvolvimento de novos medicamentos. Portanto, este estudo teve como objetivo determinar, pela primeira vez, a composição química do óleo essencial de flores de *Psidium guajava* (OE-PG) e avaliar suas propriedades antibacteriana *in vitro*, antiparasitária *in vitro* e citotóxico *in vitro*. O OE-PG foi obtido por hidrodestilação em um aparelho de Clevenger, enquanto sua composição química foi determinada por detecção de ionização por chama por cromatografia em fase gasosa (CG-FID) e espectrometria de massa por cromatografia em fase gasosa (CG-MS). Os principais compostos identificados no OE-PG foram α -cadinol (37,8%), β -cariofileno (12,2%), nerolidol (9,1%), α -selineno (8,8%), β -selineno (7,4%) e óxido de cariofileno (7,2%) . Os resultados mostraram que o OE-PG apresentou forte atividade tripanocida contra as formas tripomastigotas de

Trypanosoma cruzi (CI₅₀ = 14,6 µg/mL), prometendo atividade antibacteriana contra *X. fastidiosa* (CIM = 12,5 µg /mL) e *P. carotovorum* (CIM = 62,5 µg/mL) , e a citotoxicidade moderada contra LLCMK2 epiteliais aderentes células na gama de concentração (CC₅₀ = 250,5 µg/mL). Em suma, o OE-PG pode ser considerado uma nova fonte de compostos bioativos para o desenvolvimento de pesticidas e drogas tripanocidas.

PALAVRAS-CHAVE: doenças tropicais negligenciadas; eficácia bactericida; goiaba; α- cadinol; LLCMK 2

CHAPTER II - Potential effects of chemical composition of the essential oil from *Psidium guajava* L., (Myrtaceae) flowers on antibacterial, trypanocidal and cytotoxic activities.

(Standards according to the Brazilian Journal of Biology)

ABSTRACT

Xylella fastidiosa is a plant-pathogenic bacterium that lives inside host xylem vessels, where it forms biofilm which is believed to be responsible for disrupting the water and nutrients passage. *Pectobacterium carotovorum* is a Gram-negative plant-specific bacterium that causes not only soft rot in various plant hosts, but also black cinnamon in potatoes by plant cell wall degradation. Chagas disease, which is caused by *Trypanosoma cruzi*, has been commonly treated with nifurtimox and benznidazole, two drugs that cause several side effects. As a result, the use of natural products for treating antibacterial and neglected diseases has increased in recent years and plants have become a promising alternative to developing new medicines. Therefore, this study aimed to determine, for the first time, the chemical composition of essential oil from *Psidium guajava* flowers (PG-EO) and to evaluate its antibacterial properties *in vitro*, antiparasitic *in vitro* and cytotoxic *in vitro*. PG-EO was obtained by hydrodistillation in a Clevenger apparatus while its chemical composition was determined by gas chromatography-flame ionization detection (GC-FID) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Major compounds identified in PG-EO were α -cadinol (37.8%), β -caryophyllene (12.2%), nerolidol (9.1%), α -selinene (8.8%), β -selinene (7.4%) and caryophyllene oxide (7.2%). Results showed that the PG-EO had strong trypanocidal activity against the trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi* ($IC_{50} = 14.6 \mu\text{g/mL}$),

promising antibacterial activity against *X. fastidiosa* (MIC = 12.5 µg/mL) and *P. carotovorum* (MIC = 62.5 µg/mL), and moderate cytotoxicity against LLCMK₂ adherent epithelial cells in the concentration range (CC₅₀ = 250.5 µg/mL). In short, the PG-EO can be considered a new source of bioactive compounds for pesticides and trypanocide drugs development.

KEYWORDS: Neglected tropical diseases; Bactericide efficacy; Guajava; α -cadinol; LLCMK₂

2.1 INTRODUÇÃO

Xylella fastidiosa, uma bactéria que coloniza o xilema, é um fitopatógeno que vive em várias espécies vegetais, como ervas daninhas e árvores frutíferas de interesse econômico (Coletta-Filho et al., 2016). É responsável por uma das doenças de plantas mais importantes relatadas nas últimas décadas, isto é, uma doença cujos sintomas iniciais são mais silenciosos do que aparentes. Uma exceção é a clorose variegada dos citros (CVC), uma doença caracterizada por pequenas manchas amarelas nas folhas e deterioração severa dos frutos (Coletta-Filho et al., 2016). Os frutos ficam mais ácidos e menores, pois o tempo de maturação é menor; como resultado, seu valor comercial diminui. No Brasil, a doença foi detectada pela primeira vez em 1987. Em 2002, aproximadamente um terço dos laranjais do país havia sido infectado por *X. fastidiosa*, em 2016, a cerca de 43% de toda a produção havia sido invadida pela bactéria. Isso levou a perdas e causou impacto negativo na economia. O CVC pode ter chegado ao Brasil através do transporte de árvores infectadas vindas da Argentina nos anos 80, permitindo que o fitopatógeno disseminasse rapidamente em toda a América do Sul, onde agora é endêmico (Coletta-Filho et al., 2016).

Xylella fastidiosa é transmitida por insetos vetoriais, como cigarrinhas que pertencem à subfamília Cicadellinae (Hemiptera : Cicadellidae). Inseticidas sintéticos têm sido utilizados para controlar esses vetores, a fim de diminuir a transmissão bacteriana e o número de plantas infectadas (Bleve et al., 2018). No entanto, a resistência aos inseticidas convencionais é a principal causa do aumento do número de árvores doentes. Além disso, a infecção bacteriana tem sido observada mesmo quando boas práticas são aplicadas ao manejo da cultura. A literatura tem mostrado algumas estratégias utilizadas contra *X. fastidiosa*, como a produção de plantas geneticamente modificadas com proteínas ou peptídeos capazes de matar patógenos e a busca de pequenas moléculas que possam atingir o fluxo de seiva do xilema e inibir seu crescimento e movimento (Bleve et al., 2018).

A podridão mole causada por *Pectobacterium carotovorum* é considerada uma doença bacteriana que afeta plantas economicamente importantes, como alface e batata,

não apenas no Brasil, mas em todo o mundo (Felix et al., 2014). Em Pernambuco, um estado do nordeste do Brasil, a alface foi cultivada com sucesso durante todo o ano, mas a podridão mole causou graves danos, principalmente quando a temperatura e a umidade são altas. *Pectobacterium carotovorum* também é considerada uma bactéria altamente agressiva que infecta a cultura da batata em regiões tropicais e subtropicais em todo o mundo, desde seu primeiro relato em 2004. O controle desse tipo de doença tem sido dificultado principalmente pela grande variedade de plantas hospedeiras e pela capacidade de sobrevivência dessas bactérias em resíduos de culturas. O uso de cultivares resistentes é considerado a estratégia mais econômica e tecnicamente viável, uma vez que as populações fitopatogênicas resistem aos pesticidas (Felix et al., 2014; Czajkowski et al., 2015).

Os pesticidas têm sido amplamente utilizados no controle de doenças de plantas em todo o mundo. Embora o uso de tais produtos tenha efeitos positivos a curto prazo sobre os produtores, seu emprego a longo prazo tem muitos efeitos negativos sobre a sociedade e o meio ambiente, como poluição do solo e da água, deposição de resíduos agroquímicos nos alimentos e o surgimento de patógenos resistentes, como mencionado anteriormente (Guimarães et al., 2015). A fim de reduzir os efeitos negativos dos pesticidas, produtos naturais foram investigados para controlar os fitopatógenos. Portanto, tem havido intensa busca por novos agentes antimicrobianos das plantas, como resultado do aumento da resistência de microorganismos patogênicos aos produtos sintéticos (Guimarães et al., 2015). Os óleos essenciais são alguns dos produtos naturais que exibem ampla gama de propriedades biológicas, tais como inseticidas, antimicrobiana, antioxidante e biorregulatórias (Pandey et al., 2013). Em relação à sua aplicação na agricultura, sua atividade antifúngica contra fitopatógenos, como *Sclerotinia sclerotiorum* e *Colletotrichum gloeosporioides*, deve ser destacada (Valadares et al., 2018; Sarkhosh et al., 2018). Por outro lado, alguns óleos essenciais também exibiram atividade satisfatória contra várias bactérias fitopatogênicas, como *Xanthomonas vesicatoria* e *Agrobacterium tumefaciens* (Vasinauskiene et al., 2006; Gormez et al., 2015).

As doenças tropicais negligenciadas são um grupo de 17 doenças consideradas infecções comuns crônicas entre as pessoas mais pobres dos países menos desenvolvidos. A Organização Mundial da Saúde reconhece a urgência de desenvolver novas ferramentas e tecnologias para combater essas doenças que são consideradas os maiores problemas de saúde do mundo (Hotez et al., 2016).

A doença de Chagas ou a tripanossomíase americana é causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*, transmitido ao hospedeiro humano, principalmente por triatomíneos infectados, vulgarmente conhecido como barbeiro (Delmondes and Stefani, 2018). Esta doença afeta a cerca de 7-8 milhões de latino-americanos e o principal modo de transmissão para as pessoas são através das fezes dos vetores contaminados (Lavorato et al., 2015). Existem outros meios de contaminação, como transfusão de sangue contaminado, transmissão congênita, transplante de órgãos e até a ingestão de frutas infectadas, como o açaí (Lavorato et al., 2015; Passos et al., 2012).

No tratamento da doença de Chagas, dois fármacos nitroheterocíclicos são amplamente utilizados: nifurtimox e benznidazole (Andrade et al., 2015). Esses fármacos apresentam vários efeitos colaterais, como: anorexia, náusea, distúrbios gastrointestinais, dermatopatia alérgica, polineurite, depressão da medula óssea, neuropatia periférica e outros (Oliveira et al., 2008).

Devido a essas complicações causadas pelos medicamentos disponíveis, a busca por novos agentes quimioterapêuticos eficazes e com baixa toxicidade se torna cada vez mais relevante. Nesse sentido, a ampla biodiversidade de compostos bioativos encontrados em óleos essenciais extraídos de plantas tem despertado cada vez mais o interesse de pesquisadores em todo o mundo (Kamte et al., 2018). Esses óleos essenciais podem ser obtidos de diferentes espécies vegetais e possuem diversas atividades biológicas, tais como: antibacteriano, anticâncer, anti-inflamatório, antimutagênico, antifúngico, antioxidante e antiprotozoário (Raut and Karuppaiyil, 2014).

Psidium guajava. pertence à família Myrtaceae, que compreende a cerca de 80 gêneros e 3.000 espécies distribuídas nos trópicos e subtropicais, principalmente nas Américas, Ásia e Austrália. O gênero *Psidium* possui a cerca de 150 espécies de

arbustos; *P. guajava* é o mais conhecido e amplamente distribuído em todo o mundo (Pereira et al., 2017). A goiabeira é considerada uma das culturas mais importantes da fruticultura nas regiões tropicais e subtropicais do mundo pelas suas características comerciais e nutricionais, resultantes do valor agregado e do alto teor de vitamina C (Panneerselvam et al., 2012). Essa espécie foi escolhida para ser utilizada neste estudo pelo seu alto rendimento de óleos essenciais, fato que chamou a atenção de pesquisadores que buscam melhorar seu uso em diferentes casos (Mendes et al., 2018).



Figura 4- Folhas e flores de *P. guajava* (Myrtaceae). Fonte: SILVA, 2015.

Com base em fatos descritos anteriormente e em vários benefícios demonstrados pelos óleos essenciais, este estudo teve como objetivo determinar, pela primeira vez, a composição química e os efeitos antibacterianos, tripanocidas e citotóxicos *in vitro* do óleo essencial extraído das flores de *P. guajava* contra *X. fastidiosa*, *P. carotovorum*, *T. cruzi* e células epiteliais aderentes LLCMK2.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Material vegetal

As flores foram coletadas no Instituto Federal Goiano, campus Rio Verde, Goiás, Brasil, situada a latitude 17°48'28" , longitude 50°53'57" , no dia 21 de março de 2017, pela manhã. O material vegetal foi identificado e as amostras foram

depositadas como exsicata no herbário da Universidade Estadual de Montes Claros, em Minas Gerais, Brasil sob o número de identificação 4481.

2.2.2 Extração do óleo essencial

O óleo essencial de flores de *Psidium guajava* foi extraído de flores frescas por hidrodestilação por 3 h em um aparelho do tipo Clevenger. A hidrodestilação foi realizada em triplicata. Para este fim, o material vegetal foi dividido em três amostras de 100 g e 500 mL de água destilada foram adicionados a cada amostra. Após a coleta manual do óleo essencial, os traços de água que permaneceram no óleo foram removidos com sulfato de sódio anidro, seguido de filtração. O OE-PG foi armazenado em uma garrafa de âmbar e mantido em geladeira a 4°C até a análise. O cálculo do rendimento de OE-PG foi baseado no peso das flores frescas e expresso como a média das análises em triplicata.

2.2.3 Análises CG-FID e CG-MS

As análises por cromatografia gasosa - detecção por ionização de chama (CG-FID) e cromatografia gasosa por espectrometria de massa (CG-MS) foram realizadas pelos sistemas Shimadzu QP2010 Plus e CGMS2010 Plus (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão). As condições de CG-MS e CG-FID e a identificação de OE-PG foram relatadas anteriormente (Lemes et al., 2018). A identificação de componentes voláteis de OE-PG (Tabela 1) foi baseada em seus índices de retenção em uma coluna capilar Rtx-5MS sob as mesmas condições operacionais usadas para CG em relação a uma série homóloga de *n*- alcanos (C₈-C₂₀). As estruturas foram comparadas por computador com as bibliotecas espectrais Wiley 7, NIST 08 e FFNSC 1.2 e seus padrões de fragmentação foram comparados com os dados encontrados na literatura (Adams, 2007).

2.2.4 Preparação e identificação de patógenos

Ambas as linhagens *X. fastidiosa* 9a5c e *P. carotovorum* Pca (424) utilizadas neste estudo foram coletadas em galhos de laranja doce de Valência afetados por CVC

em Macaúbal (São Paulo, Brasil) e batatas infectadas compradas em Ipuúna (Minas Gerais, Brasil), respectivamente. As cepas foram mantidas na coleção de culturas do Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Aplicada (LaPeMA) da Universidade de Franca, São Paulo, Brasil, sob criopreservação a -80°C em caldo de pervinga (PW) com glicerol a 20% (v / v).

2.2.5 Concentrações inibitórias mínimas e determinação *in vitro*

Concentrações inibitórias mínimas (CIMs), isto é, as menores concentrações de compostos que são capazes de inibir o crescimento de microrganismos, foram determinadas em triplicata usando o método do caldo de microdiluição em uma placa de cultura de tecidos de 96 poços de poliestireno (TPP, Trasadingen, Suíça). A metodologia recomendada pelo Instituto de Normas Clínicas e Laboratoriais (CLSI, 2012) foi seguida. Amostras OE-PG (1 mg) foram dissolvidas em 125 μL de dimetilsulfóxido (DMSO; Merck, Darmstadt, HE, Alemanha) e diluídas em caldo de PW. Em seguida, as amostras foram testadas em concentrações variando de 0,48 a 1.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Os inóculos foram ajustados para produzir concentrações celulares de 1×10^6 UFC / mL, conforme preconizado pelo CLSI (2012). Um controle de crescimento sem antibiótico e um controle de esterilidade sem inóculo também foram incluídos. DMSO a 5% foi a concentração máxima de DMSO (v / v) nas amostras que permitiram o crescimento normal de *X. fastidiosa* 9a5c e *P. carotovorum* Pca (424). A estreptomicina (Sigma, St. Louis, MO, EUA) foi utilizada como antibiótico de referência. A microplaca de 96 poços foi mantida em demanda biológica de oxigênio (BOD, Cientec, Brasil) a 28°C por sete dias. Após a incubação, 30 μL de uma solução aquosa de resazurina a 0,02% (Sigma-Aldrich) foram adicionados a cada poço na microplaca. A resazurina é um corante que permite observar o crescimento microbiano. Azul e vermelho representam ausência e presença de crescimento microbiano, respectivamente (Sarker et al., 2007). A microplaca foi incubada por 24 horas adicionais para que a observação e uma análise descritiva pudessem ser realizadas.

2.2.6 Atividades tripanocidas e citotóxicas *in vitro*

Para obter os tripomastigotos de *T. cruzi*, células epiteliais aderentes à LLCMK2 foram cultivadas em meio RPMI suplementado com 2×10^{-6} mol/L de L-glutamina, 10^{-5} mol/L de NaHCO_3 , 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e soro fetal bovino inativado a 10%. O procedimento foi realizado em frascos de cultura a 37°C, sob 5% de CO_2 ambiente e humidade relativa de 95%. As formas de tripomastigotas foram mantidas em meio RPMI e os parasitas foram transferidos para meio fresco a cada 48 horas para fornecer formas parasitas livres. O ensaio realizado após 24 horas foi baseado na metodologia de Rashed et al., (2016). Aproximadamente 1×10^6 tripomastigotas foram adicionados a cada poço em uma placa de microtitulação de 96 poços. Em seguida, o óleo essencial foi adicionado em concentrações variando de 12,5 a 200 µg/mL. Após 24 h de incubação, a atividade biológica das amostras foi avaliada pelo ensaio colorimétrico de sal de tetrazólio MTT (MTT = 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-brometo de difeniltetrazólio) (5 mg/mL). As leituras foram conduzidas por um leitor de microplacas no comprimento de onda de 517 nm. Controles positivos e negativos foram benznidazol (12,5-200 mg/mL) e dimetilsulfóxido a 0,5% (DMSO), respectivamente. Os ensaios foram realizados em triplicata.

As células epiteliais aderentes do LLCMK2 foram cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e soro fetal de bezerro inativado a 5%. Eles foram mantidos a 37°C em 5% de CO_2 . Uma suspensão de células foi semeada em concentração de 1×10^6 células/ml em microplaca de 96 poços com meio RPMI 1640. Posteriormente, as células foram tratadas com óleo essencial em diferentes concentrações (6,25, 12,5, 25, 50, 100, 200 e 400 µg/mL). As placas foram incubadas a 37°C por 24 h e a atividade biológica foi avaliada pelo método colorimétrico MTT [MTT; Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] num leitor de microplacas a 540 nm. O meio RPMI 1640 foi o controle positivo, enquanto os meios DMSO e RPMI 1640 foram os negativos. Todas as

experiências foram realizadas em triplicata. A porcentagem de viabilidade celular foi determinada pela seguinte fórmula: % viabilidade celular = $1 - [(Y-N) / (N-P)] \times 100$, em que Y = absorvância de poços contendo células e óleo essencial em diferentes concentrações; N = controle negativo ; e P = controle positivo (Rashed et al., 2016).

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Treze compostos voláteis foram identificados no OE-PG, enquanto o seu rendimento foi de $0,011 \pm 0,002\%$. Os principais compostos de OE-PG foram α -cadinol (37,8%), β -cariofileno (12,2%), nerolidol (9,1%), α -selineno (8,8%), β -selineno (7,4%) e óxido de cariofileno (7,2%) (Tabela1). Eles foram determinados por CG-FID e CG-MS.

Tabela 1-Composição química do óleo essencial de flores de *Psidium guajava* (OE-PG).

Compostos	RT _{exp}	RT _{lit}	%RA
<i>trans</i> - β -Cariofileno	1413	1414	12.2
α -Humuleno	1442	1442	4.3
Nerolidol	1553	1554	9.1
β -Selineno	1475	1476	7.4
α -Selineno	1477	1478	8.8
Germacreno D	1479	1480	0.6
δ -Selineno	1494	1495	0.9
Óxido de cariofileno	1580	1581	7.2
Spathulenol	1583	1584	1.3
Globulol	1611	1611	3.0
Cubenol	1626	1628	2.9
<i>Epi</i> - α -Cadinol	1638	1638	4.5
α -Cadinol	1651	1652	37.8
Hidrocarbonetos de sesquiterpenos			34.2
Sesquiterpenos Oxigenados			65.8
Total			100.0

RT: Tempo de retenção; **RL_{exp}**: Índice de retenção determinado em relação aos *n*-alcanos (C8–C20) na coluna Rtx-5MS; **RL_{lit}**: Índice de retenção da literatura (Adams, 2007); **RA%**: área relativa (área do pico relativa a área total do pico no cromatograma CG-FID), média de três repetições; **RL**: comparação do RL_{exp} com a literatura (Adams, 2007); **MS**: comparação dos espectros de massa com os das bibliotecas Wiley 7. NIST 08. e FFNSC 12 bem como com as da literatura (Adams, 2007).

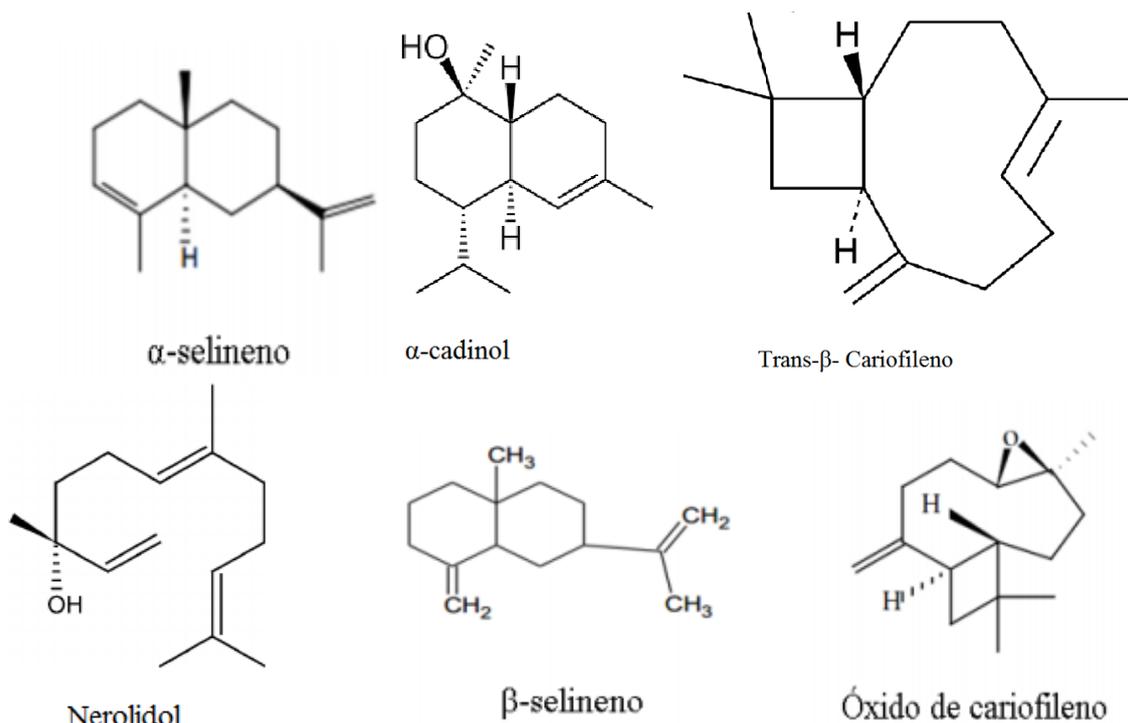


Figura 5- Estrutura química dos compostos majoritários identificados no óleo essencial das flores de goiabeira.

É importante mencionar que os constituintes químicos predominantes no OE-PG já haviam sido previamente identificados em diferentes concentrações no óleo essencial das folhas desta espécie no Brasil (Mendes et al., 2018; Souza et al., 2017). Quando a composição química do OE-PG é comparada com os óleos extraídos da mesma espécie em outras regiões do mundo, algumas semelhanças podem ser encontradas. Na China, principais constituintes foram α - cubebeno , cariofileno , aromadendreno , α -cadineno e e calameneno no óleo essencial de folhas de *P. guajava* (Xu et al., 2017).

Os óleos extraídos das hastes e folhas tunisinas de *P. guajava* exibiram os seguintes constituintes principais: α - humuleno, germacreno D, valeranol, viridiflorol e β - cariofileno (Khadhri et al., 2014). Na Índia, os principais componentes do óleo das folhas de resíduos de *P. guajava* foram cineol, cariofileno, copaeno, azuleno e eucaliptol (Kamran et al., 2012). Os principais componentes deste óleo essencial no Nepal foram (*E*) - nerolidol e (*E*) – cariofileno(folhas de *P. guajava*), enquanto limoneno e β - cariofileno (folhas de *P. guajava*) foram identificados na Nigéria (Satyal et al., 2015;

Ogunwande et al., 2003). Em Cuba, os principais constituintes identificados no óleo essencial das folhas de *P. guajava* foram os seguintes terpenos: β - cariofileno, (*E*) - nerolidol e selin -11-en-4 α - ol (Pino et al., 2001). Embora este estudo seja o primeiro relato da composição química do OE-PG, pode-se notar que a composição química encontrada por este estudo é semelhante à composição química já descrita na literatura para outras espécies pertencentes ao mesmo gênero e família Myrtacea (Stefanello et al., 2011).

Na literatura, diferenças nas composições químicas de óleos essenciais desta espécie botânica podem ser por causa do método de extração, região de origem da planta, clima, composição do solo, órgão da planta, idade, sazonalidade e ciclo circadiano. Esses fatores afetam a qualidade e a quantidade da composição dos óleos essenciais, além de agentes bióticos e abióticos. Sabe-se que a variação quimiotípica orienta o uso das plantas, uma vez que a caracterização química e a identificação do quimiotipo permitem análises químicas e agrícolas mais refinadas (Souza et al., 2017; Bouyahya et al., 2019).

Os valores de CIM determinados para o OE-PG contra *X. fastidiosa* e *P. carotovorum* foram 12,5 $\mu\text{g/ml}$ e 62,5 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. A estreptomicina foi o controle positivo e seu valor de CIM foi de 0,0368 $\mu\text{g} / \text{mL}$. Em relação à atividade antibacteriana de produtos naturais, Holetz et al. (2002) mostraram que amostras com boa atividade bacteriana, moderada, fraca e inativa apresentaram valores de CIM de acordo com os valores abaixo.

Boa atividade < 100 $\mu\text{g/mL}$
Moderada 100 a 500 $\mu\text{g/mL}$
Fraca 500 a 1000 $\mu\text{g/mL}$
Inativo > 1000 $\mu\text{g/mL}$

Os resultados mostrados pelo OE-PG exibiram alta atividade antibacteriana *in vitro* contra *X. fastidiosa* (CIM = 12,5 $\mu\text{g/mL}$) e *P. carotovorum* (CIM = 62,5 $\mu\text{g/mL}$) indicando atividade promissora contra bactérias fitopatogênicas. Cabe destacar que o OE-PG das flores exibiu atividade anti- *Xyllela fastidiosa in vitro* mais promissora

do que os dezessete óleos essenciais cujos valores de CIM já haviam sido relatados na literatura (Santiago et al., 2018). Além disso, o óleo essencial de folhas de *P. guajava* já foi descrito como um produto natural com atividade potencial contra *Sclerotinia sclerotiorum*, um fitopatógeno que também causa danos para as diversas culturas de importância econômica (Silva et al., 2018).

A excelente atividade antibacteriana exibida pelo OE-PG contra ambas as bactérias fitopatogênicas sob investigação pode ser justificada pelas altas concentrações de seus principais constituintes, uma vez que eles já tiveram seu potencial antibacteriano descrito na literatura. Por exemplo, α -cadinol, β -cariofileno, α -selineno, β -selineno e óxido de cariofileno já foram identificados como constituintes principais do óleo essencial de *Teucrium yemense*, cuja atividade antibacteriana satisfatória foi demonstrada pelo teste de difusão em disco e pelo teste de microdiluição em caldo (Ali et al., 2017). O terceiro constituinte principal encontrado no OE-PG - nerolidol - pode ter contribuído significativamente para bons resultados das atividades anti-*Xylella fastidiosa* e anti-*Pectobacterium carotovorum*, uma vez que esse sesquiterpeno possui atividade antibacteriana relevante e tem sido considerado um composto bioativo promissor no campo da agricultura pela literatura especializada (Chan et al., 2016). De acordo com Bajpai et al. (2011), certos óleos essenciais atuam de várias maneiras em vários tipos de complexos de doenças e podem ser aplicados em culturas agrícolas da mesma maneira que outros defensivos agrícolas. Estes óleos podem ser usados como fator principal em uma ampla gama de atividades contra muitas bactérias fitopatogênicas, em que esses desenvolveram resistência contra o bactericida específico.

Deve-se enfatizar que, além das classes (hidrocarbonetos de sesquiterpenos e sesquiterpenos oxigenados) as quais os constituintes pertencem, outros fatores, como isomerismo e sinergismo entre os componentes, devem ser levados em consideração na avaliação da atividade antibacteriana (Costa et al., 2017). Em suma, os resultados deste estudo mostraram que o OE-PG teve uma forte atividade antibacteriana contra *X. fastidiosa* e *P. carotovorum*, este fato pode ser atribuído também aos seus constituintes

de sabineno , α - pineno , β - pineno , limoneno e β - cariofileno (Tabela 1), que parecem tornar a membrana celular permeavelmente e desintegrar a membrana externa das bactérias Gram-negativas (Zhang et al., 2017).

Em relação à atividade tripanocida investigada, o óleo essencial de flores de *P. guajava* demonstrou ser ativo contra formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*. Houve redução na viabilidade das células tripomastigotas com aumento da concentração de óleo essencial. Assim, o óleo essencial exibiu atividade tripanocida satisfatória com $IC_{50} = 14,6 \mu\text{g/mL}$ em comparação ao controle positivo usando benznidazol (controle positivo) com $IC_{50} = 9,8 \mu\text{g/ml}$ (Tabela 2).

Tabela 2-Atividade tripanocida *in vitro* do óleo essencial de flores de *P. guajava* (Myrtaceae).

	% Lise \pm D.P/concentração ($\mu\text{g/mL}$)							CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
	6.25	12.5	25	50	100	200	400	
OE-PG	17.6 \pm 4.2	58.9 \pm 4.0	57.5 \pm 0.4	79.1 \pm 4.9	96.9 \pm 0.8	99.9 \pm 0.8	99.5 \pm 0.4	14.6

OE-PG: óleo essencial de flores de *P. guajava*. **D.P.** Desvio padrão; Controle positivo: benznidazol ($CI_{50} = 9,8 \mu\text{g} / \text{mL}$).

$CI_{50} < 10 \mu\text{g/mL}$ Altamente ativa;
$CI_{50} > 10 < 50 \mu\text{g/mL}$ Ativa
$CI_{50} > 50 < 100 \mu\text{g/mL}$ Moderada
$CI_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$ Inativa

Um estudo atual com o óleo essencial de folhas secas de *Eugenia dysenterica* relata que amostras de óleo essencial com $CI_{50} < 10 \mu\text{g/mL}$ apresentaram atividade tripanocida considerada altamente ativa, ativa ($CI_{50} > 10 < 50 \mu\text{g/mL}$), moderadamente ativa ($CI_{50} > 50 < 100 \mu\text{g/mL}$) e inativo ($CI_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$) contra formas tripomastigotas de *T. cruzi* (Santos et al., 2019).

A atividade antiparasitária apresentada pelo óleo essencial de flores de *P. guajava* pode ser atribuída ao sinergismo entre os constituintes presentes no óleo essencial analisado (Bakkali et al., 2008). Além disso, dentre os constituintes presentes no óleo, existem aqueles que já reconhecem atividade tripanocida relatada na literatura, como terpenos : α - cadinol (37,8%), β - cariofileno (12,2%), nerolidol (9,1%) , α -

selineno (8,8%), β - selineno (7,4%) e óxido de cariofileno (7,2%) (Tabela 1) previamente identificados nos óleos essenciais das espécies *Annona vepretorum* , *A. squamosa* , *Cymbopogon giganteus* , *C. nardus* , *C. citratus* , *C. schoenanthus* , *Hagenia abyssinica* , *Leonotis ocymifolia* , *Moringa stenopetala* , óleos que também tiveram efeito tripanocida significativo (Meira et al., 2014; Kpoviessi et al., 2014; Nibret and Wink, 2010).

As várias atividades biológicas dos óleos essenciais, inclusive contra os tripanossomatídeos, são devidas principalmente à sua composição terpênica e ao sinergismo acima mencionado entre seus constituintes (Borges et al., 2012). Os terpenos são responsáveis pela natureza hidrofóbica dos óleos essenciais, permitindo a sua difusão através da membrana celular do parasita, afetando, assim, as vias metabólicas e as organelas intracelulares (Raut and Karuppayil, 2014).

A citotoxicidade foi avaliada contra células LLCMK2 porque o meio celular é o mesmo que os parasitas são cultivados. A execução deste ensaio é justificada, uma vez que a eficácia da amostra contra os parasitas é comprovada sem lisar as células saudáveis ao mesmo tempo em que os parasitas são lisados. As culturas de células epiteliais aderentes LLCMK2 foram tratadas com o óleo essencial nas concentrações de 6,25; 12,5; 25, 50, 100, 200 e 400 $\mu\text{g} / \text{mL}$ durante 24 h. Os resultados mostraram que o óleo essencial a partir de flores de *P. guajava* apresentou citotoxicidade moderada na concentração avaliada, apresentando $\text{CC}_{50} = 250,5 \mu\text{g/ml}$ (Tabela 3) em comparação com o benznidazol controlo positivo ($\text{CC}_{50} = 147,3 \mu\text{g/ml}$) e com dados já relatados na literatura (Carneiro et al., 2017).

Tabela 3-- Atividade citotóxica do óleo essencial de flores de *P. guajava* (Myrtaceae).

	% Lise \pm D.P. /concentração ($\mu\text{g/mL}$)							CC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
	6.25	12.5	25	50	100	200	400	
OE- PG	100 \pm 0	100 \pm 0	100 \pm 0	86.3 \pm 2.7	62.2 \pm 0.9	35.9 \pm 1.1	15.2 \pm 4.3	250.5

OE-PG: óleo essencial de flores de *P. guajava*. **SD.** Desvio padrão.

$CC_{50} < 10 \mu\text{g/mL}$ Altamente tóxicos
$CC_{50} > 10 < 100 \mu\text{g/mL}$ Tóxicos
$CC_{50} > 100 < 1000 \mu\text{g/mL}$ Moderadamente tóxico
$CC_{50} > 1000 \mu\text{g / mL}$ Não tóxico

É importante avaliar a citotoxicidade de uma determinada amostra, pois possibilita elucidar o mecanismo biológico que gera o efeito citotóxico e o mecanismo de ação de diferentes compostos durante a interação com os tecidos. É relatado na literatura que os óleos essenciais com ($CC_{50} < 10 \mu\text{g/mL}$) foram considerados altamente tóxicos, tóxicos ($CC_{50} > 10 < 100 \mu\text{g/mL}$), moderadamente tóxico ($CC_{50} > 100 < 1000 \mu\text{g/mL}$) e não tóxico ($CC_{50} > 1000 \mu\text{g / mL}$) (Andrade et al., 2018; de Lima et al. 2012; Camacho et al., 2003). A citotoxicidade moderada exibida pelo óleo essencial de flores *P. guajava* contra célula epiteliais aderentes ao LLCMK2 s é um indicador de que esse óleo essencial pode ser bem tolerado pelo sistema biológico, no entanto, ainda são necessários mais estudos para avaliar sua toxicidade *in vivo*.

2.4 CONCLUSÃO

Os constituintes principais do OE-PG foram α - cadinol, β - cariofileno, nerolidol, α - selineno, β - selineno e óxido de cariofileno, por apresentarem as maiores concentrações. A alta concentração de α - cadinol (37,8%) no OE-PG investigada por este estudo é a perspectiva de uma nova fonte do metabólito secundário como matéria-prima na síntese de um novo agente bactericida. O OE-PG também mostrou atividade tripanocida satisfatória contra as formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* e exibiu citotoxicidade moderada contra células epiteliais aderentes a LLCMK2. Em suma, os resultados fornecem suporte para mais estudos de OE-PG que visam o isolamento de compostos bioativos e investigar as suas propriedades antibacterianas e tripanocidas *in vivo*.

2.5 REFERÊNCIAS

ADAMS, R.P. In Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy, 4th ed., Allured Publishing Corporation: Carol Stream, p.804, 2007.

ALI, N.A.A., CHHETRI, B.K., DOSOKY, N.S., SHARI, K., AI-FAHAD, A.J.A., WESSJOHANN, L., SETZER, W.N. Antimicrobial, antioxidante, and cytotoxic activities of *Ocimum forskolei* and *Teucrium yemense* (Lamiaceae) essential oils. **Medicines**, v. 4, n. 2, p. 1-17, 2017. <https://doi.org/10.3390/medicines4020017>.

ANDRADE, P.M., DE MELO, D.C., ALCOBA, A.E.T., JÚNIOR, W.G.F., PAGOTTI, M.C., MAGALHÃES, L.G., DOS SANTOS, T.C.L., CROTTI, A.E.M., MIRANDA, M.L.D. Chemical composition and evaluation of antileishmanial and cytotoxic activities of the essential oil from leaves of *Cryptocarya aschersoniana* Mez. (Lauraceae Juss.). *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v.90, n. 3, p. 2671-2678, 2018. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201820170332>.

ANDRADE, M.A., CARDOSO, M.G., GOMES, M.S., AZEREDO, C.M.O., BATISTA, L.R., SOARES, M.J., RODRIGUES, L.M.A., FIGUEIREDO, A.C.S. Biological activity of the essential oils from *Cinnamodendron dinisii* and *Siparuna guianensis*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.46, n.1, p.189-194, 2015. <https://doi.org/10.1590/S1517-838246120130683>.

BAJPAI, V.K., XU, H., LEE, S.G., BAEK, K.H., KANG, S.C. Potential roles of essential oils on controlling plant pathogenic bacteria *Xanthomonas* species: a review. **The Plant Pathology Journal**, v.27, n.3, p. 207-224, 2011. <https://doi.org/10.5423/PPJ.2011.27.3.207>.

BAKKALI, F., AVERBECK, S., AVERBECK, D., IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – a review. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, n.2, p. 446-475, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>.

BOUYAHYA, A., BELMEHDI, O., JEMLI, M.E., MARMOUZI, I., BOURAIS, I., ABRINI, J., FAOUZI, M.E.A., DAKKA, N., BAKRI, Y. Chemical variability of *Centaurium erythraea* essential oils at the three developmental stages and investigation of their in vitro antioxidant, antidiabetic, dermatoprotective and antibacterial activities. **Industrial Crops and Products**, v.132, p.111-117, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.01.042>.

BORGES, A.R., AIRES, J.R.A., HIGINO, T.M.M., MEDEIROS, M.G.F., CITÓ, A.M.G.L., LOPES, J.A.D., FIGUEIREDO, R.C.B.Q., 2012. Trypanocidal and cytotoxic activities of essential oils from medicinal plants of northeast of Brazil. **Experimental Parasitology**, v.132, n.2, p.123-128, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2012.06.003>.

BLEVE, G., GALLO, A., ALTOMARE, C., VURRO, M., MAIORANO, G., CARDINALI, A., D'ANTUONO, I.D., MARCHI, G., MITA, G. In vitro activity of antimicrobial compounds against *Xylella fastidiosa*, the causal agent of the olive quick

decline syndrome in Apulia (Italy). **Microbiology Letters**, v.365, n.5, p.281, 2018. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnx281>.

CAMACHO, M.D.R., PHILLIPSON, J.D., CROFT, S.L., SOLIS, P.N., MARSHALL, S.J., GHAZANFAR, S.A. Screening of plant extracts for antiprotozoal and cytotoxic activities. **Journal of Ethnopharmacology**, v.89, p.185-191, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(03\)00269-1](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(03)00269-1).

CARNEIRO, N.S., ALVES, J.M., ALVES, C.C.F., ESPERANDIM, V.R., MIRANDA, M.L.D. Óleo essencial das flores de *Eugenia klotzchiana* (Myrtaceae): composição química e atividades tripanocida e citotóxica in vitro. **Revista Virtual de Química**, v.9, n. 3, p. 1381-1392, 2017. <https://doi.org/10.21577/1984-6835.20170080>.

COLETTA-FILHO, H.D., FRANCISCO, C.S., LOPES, J.R.S., OLIVEIRA, A.F., SILVA, L.F.O. First report of olive leaf scorch in Brazil, associated with *Xylella fastidiosa* subsp. pauca. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 55, n. 1, p. 130-135, 2016. https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-17259.

CZAJKOWSKI, R., PÉROMBELON, M.C.M., JAFRA, S., LOJKOWSKA, E., POTRYKUS, M., VAN DER WOLF, J.M., SLEDZ, W. Detection, identification and differentiation of *Pectobacterium* and *Dickeya* species causing potato blackleg and tuber soft rot: a review. **Annals of Applied Biology**, v.166, n.1, p.18-38, 2015. <https://doi.org/10.1111/aab.12166>.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI), Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved Standard – Ninth Edition. 32, M07–A9. Wayne, PA: CLSI (2012).

CHAN, W.K., TAN, L.T.H., CHAN, K.G., LEE, L.H., GOH, B.H. Nerolidol: a sesquiterpene alcohol with multi-faceted pharmacological and biological activities. **Molecules**, v.21, n.5, p. 529, 2016. <https://doi.org/10.3390/molecules21050529>.

COSTA, E.C.C., CHRISTOFOLI, M., COSTA, G.C.S., PEIXOTO, M.F., FERNANDES, J.B., FORIM, M.R., PEREIRA, K.C., SILVA, F.G., CAZAL, C.M. Essential oil repellent action of plants of the genus *Zanthoxylum* against *Bemisia tabaci* biotype B (Homoptera: Aleyrodidae). **Scientia Horticulturae**, v. 26, n.19, p. 327-332, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.08.041>

DELMONDES, P.H., STEFANI, R. In silico study of the antichagasic activity of aromatic compounds. **Orbital: The Electronic Journal of Chemistry**, v.10, n. 5, p. 395-401, 2018. <https://doi.org/10.17807/orbital.v10i5.1018>.

DE LIMA, J.P.S., PINHEIRO, M.L.B., SANTOS, A.M.G., PEREIRA, J.L.S., SANTOS, D.M.F., BARISON, A., SILVA-JARDIM, I., COSTA, E.V. In vitro antileishmanial and cytotoxic activities of *Annona mucosa* (Annonaceae). **Revista Virtual de Química**, v.4, n. 6, p. 692-702, 2012. <http://dx.doi.org/10.5935/1984-6835.20120052>.

FELIX, K.C.S., OLIVEIRA, W.J., MARIANO, R.L.R., SOUZA, E.B. Lettuce genotype resistance to “soft rot” caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp.

carotovorum. **Scientia Agricola**, v. 71, n. 4, p. 287-291, 2014. <http://dx.doi.org/10.1590/0103-9016-2013-0301>.

GORMEZ, A., BOZARI, S., YANMIS, D., GULLUCE, M., SAHIN, F., AGAR, G. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils of two species of Lamiaceae against phytopathogenic bacteria. **Polish Journal of Microbiology**, v. 64, n. 2, p. 121-127, 2015. PMID: 26373171.

GUIMARÃES, P.G., MOREIRA, I.S., FILHO, P.C.C., FERRAZ, J.L.A.A., NOVAES, Q.S., BATISTA, R. Antibacterial activity of *Schinopsis brasiliensis* against phytopathogens of agricultural interest. **Fitos**, v.9, n. 3, p. 161-252, 2015. <http://dx.doi.org/10.5935/2446-4775.20150013>.

HOLETZ, F.B., PESSINI, G.L., SANCHES, N.R., CORTEZ, D.A.G., NAKAMURA, C.V., FILHO, B.P.D. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infections diseases. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 97, n.7, p. 1027-1031, 2002. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762002000700017>.

HOTEZ, P.J., PECOULT, B., RIJAL, S., BOEHME, C., AKSOY, S., MALECELA, M., TAPIA-CONYER, R., REEDER, J.C. Eliminating the neglected tropical diseases: translational science and new technologies. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 3, p.3895, 2016. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003895>.

KAMTE, S.L.N., RANJBARIAN, F., CIANFAGLIONE, K., SUT, S., DALL'ACQUA, S., BRUNO, M., AFSHAR, F.H., IANNARELLI, R., BENELLI, G., CAPPELLACCI, L., HOFER, A., MAGGI, F., PETRELLI, R. Identification of highly effective antitrypanosomal compounds in essential oils from the Apiaceae family. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 156, n. 30, p. 154-165, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.03.032>.

KHADHRI, A., MOKNI, R.E., ALMEIDA, C., NOGUEIRA, J.M.F., ARAÚJO, M.E.M. Chemical composition of essential oil of *Psidium guajava*. growing in Tunisia. **Industrial Crops and Products**, v.52, n.1, p.29-31, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.10.018>.

KAMRAN, A., MISHRA, R.K., GUPTA, R., KUMAR, A., BAJAJ, A.K., DIKSHIT, A. Therapeutic effects of essential oil from waste leaves of *Psidium guajava*. against cosmetic embarrassment using phylogenetic approach. **American Journal of Plant Sciences**, v. 3, n. 6, p. 745-752, 2012. <https://doi.org/10.4236/ajps.2012.36090>.

KPOVIESSI, S., BERO, J., AGBANI, P., GBAGUIDI, F., KPOVIESSI, B.K., SINSIN, B., ACCROMBESSI, G., FRÉDÉRICH, M., MOUDACHIROU, M., LECLERCQ, J.Q. Chemical composition, cytotoxicity and in vitro antitrypanosomal and antiplasmodial activity of the essential oils of four *Cymbopogon* species from Benin. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 151, n. 1, p. 652-659, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.11.027>.

LAVORATO, S.N., SALES JÚNIOR, P.A., MURTA, S.M.F., ROMANHA, A.J., ALVES, R.J. In vitro activity of 1,3-bisaryloxypropanamines against

Trypanosoma cruzi-infected L929 cultures. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 110, n. 4, p. 566-568, 2015. <http://dx.doi.org/10.1590/0074-02760150007>.

LEMES, R.S., ALVES, C.C.F., ESTEVAM, E.B.B., SANTIAGO, M.B., MARTINS, C.H.G., SANTOS, T.C.L., CROTTI, A.E.M., MIRANDA, M.L.D. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from *Citrus aurantifolia* leaves and fruit peel against oral pathogenic bacteria. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 90, n. 2, p. 1285-1292, 2018. <http://dx.doi.org/10.1590/0001-3765201820170847>.

MENDES, L.A., SOUZA, T.S., MENINI, L., GUILHEN, J.H.S., BERNARDES, C.O., FERREIRA, A., FERREIRA, M.F.S. Spring alterations in the chromatographic profile of leaf essential oils of improved guava genotypes in Brazil. *Scientia Horticulturae*, v. 238, n. 19, p. 295-302, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.04.065>.

MEIRA, C.S., GUIMARÃES, E.T., MACEDO, T.S., SILVA, T.B., MENEZES, L.R.A., COSTA, E.V., SOARES, M.B.P. Chemical composition of essential oils from *Annona vepretorum* Mart. and *Annona squamosa* L. (Annonaceae) leaves and their antimalarial and trypanocidal activities. *Journal of Essential Oil Research*, v. 27, n. 2, p. 160-168, 2014. <https://doi.org/10.1080/10412905.2014.982876>.

NIBRET, E., WINK, M. Trypanocidal and antileukaemic effects of the essential oils of *Hagenia abyssinica*, *Leonotis ocymifolia*, *Moringa stenopetala*, and their main individual constituents. *Phytomedicine*, v.17, n.12, p.911-920, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2010.02.009>.

OLIVEIRA, M.F., NAGAO-DIAS, A.T., PONTES, V.M.O., SOUSA JÚNIOR, A.S., COELHO, H.L.L., COELHO, I.C.B. Tratamento etiológico da Doença de Chagas no Brasil. *Revista de Patologia Tropical*, v.37, n.3, p.209-228, 2008. <https://doi.org/10.5216/rpt.v37i3.5063>.

OGUNWANDE, I.A., OLAWORE, N.O., ADELEKE, K.A., EKUNDAYA, O., KOENIG, W.A. Chemical composition of the leaf volatile oil of *Psidium guajava* growing in Nigeria. *Flavour and Fragrance Journal*, v.18, n.2, p.136-138, 2003. <https://doi.org/10.1002/ffj.1175>.

PANNEERSELVAM, P., MOHANDAS, S., SARITHA, B., UPRETI, K.K., MONNAPPA, A.P., SULLADMATH, V.V. *Glomus mosseae* associated bacteria and their influence on stimulation of mycorrhizal colonization, sporulation, and growth promotion in guava (*Psidium guajava*.) seedlings. *Biological Agriculture and Horticulture*, v.28, n.4, p.267-279, 2012. <https://doi.org/10.1080/01448765.2012.741108>.

PANDEY, A.K., SINGH, P., PALNI, U.T., TRIPATHI, N.N. Application of *Chenopodium ambrosioides* Linn. essential oil as botanical fungicide for the management of fungal deterioration in pulses. *Biological Agriculture and Horticulture*, v. 29, n. 3, p. 197-208, 2013. <https://doi.org/10.1080/01448765.2013.822828>.

PASSOS, L.A.C., GUARALDO, A.M.A., BARBOSA, R.L., DIAS, V.L., PEREIRA, K.S., SCHMIDT, F.L., FRANCO, R.M.B., ALVES, D.P. Sobrevivência e infectividade do *Trypanosoma cruzi* na polpa de açaí: estudo in vitro e in vivo. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, v. 21, n. 2, p. 223-232, 2012. <http://dx.doi.org/10.5123/S1679-49742012000200005>.

PEREIRA, F.M., USMAN, M., MAYER, N.A., NACHTIGAL, J.C., MAPHANGA, O.R.M., WILLEMSE, S. Advances in guava propagation. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 39, n. 4, p.358, 2017. <http://dx.doi.org/10.1590/0100-29452017358>.

PINO, J.A., AGUERO, J., MARBOT, R., FUENTES, V. Leaf oil of *Psidium guajava*. from Cuba. **Journal of Essential Oil Research**, v. 13, n. 1, p. 61-62, 2001. <https://doi.org/10.1080/10412905.2001.9699607>.

RAUT, J.S., KARUPPAYIL, S.M. A status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 62, n. 1, p. 250-264, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.05.055>.

RASHED, K., FERREIRA, D.S., ESPERANDIM, V.R., MARÇAL, M.G., SEQUEIRA, B.M., FLAUZINO, L.G.B., CUNHA, W.R. In vitro trypanocidal activity of the Egyptian plant *Schinopsis lorentzii* against trypomastigote and amastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 6, n. 6, p. 055-060, 2016. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2016.60610>.

SANTOS, L.S., ALVES, C.C.F., ESTEVAM, E.B.B., MARTINS, C.H.G., SILVA, T.S., ESPERANDIM, V.R., MIRANDA, M.L.D.. Chemical composition, in vitro trypanocidal and antibacterial activities of the essential oil from the dried leaves of *Eugenia dysenterica* DC from Brazil. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 22, n. 2, p. 347-355, 2019. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2019.1626293>.

SANTIAGO, M.B., MORAES, T.S., MASSUCO, J.E., SILVA, L.O., LUCARINI, R., SILVA, D.F., VIEIRA, T.M., CROTTI, A.E.M., MARTINS, C.H.G. In vitro evaluation of essential oils for potential antibacterial effects against *Xylella fastidiosa*. **Journal of Phytopathology**, v. 116, n. 11-12, p. 790-798, 2018. <https://doi.org/10.1111/jph.12762>.

SARKER, S.D., NAHAR, L., KUMARASAMY, Y. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. **Methods**, v. 42, n. 4, p. 321-324, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2007.01.006>.

SARKHOSH, A., SCHAFFER, B., VARGAS, A.I., PALMATEER, A.J., LOPEZ, P., SOLEYMANI, A., FARZANEH, M. Antifungal activity of five plant-extracted essential oils against anthracnose in papaya fruit. **Biological Agriculture and Horticulture**, v. 34, n. 1, p. 18-26, 2018. <https://doi.org/10.1080/01448765.2017.1358667>.

SATYAL, P., PAUDEL, P., LAMICHHANE, B., SETZER, W.N. Leaf essential oil composition and bioactivity of *Psidium guajava* from Kathmandu, Nepal. **American Journal of Essential Oils and Natural Products**, v. 3, n. 2, p. 11-14, 2015.

SILVA, E.A.J., SILVA, V.P., ALVES, C.C.F., ALVES, J.M., SOUCHIE, E.L., BARBOSA, L.C.A. Chemical composition of the essential oil of *Psidium guajava* leaves and its toxicity against *Sclerotinia sclerotiorum*. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 39, n. 2, p. 865-874, 2018. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2018v39n2p865>.

SOUZA, T.S., FERREIRA, M.F.S., MENINI, L., SOUZA, J.R.C.L., PARREIRA, L.A., CECON, P.R., FERREIRA, A., 2017. Essential oil of *Psidium guajava*: influence of genotypes and environment. **Scientia Horticulturae**, vol. 216, no. 14, pp. 38-44. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.12.026>.

STEFANELLO, M.E.A., PASCOAL, A.C.R.F., SALVADOR, M.J. Essential oils from neotropical Myrtaceae: chemical diversity and biological properties. **Chemistry and Biodiversity**, v. 8, n. 1, p. 73-94, 2011. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201000098>.

SILVA, E. A. J. et al. Tempo de secagem, época de coleta e ação antifúngica do óleo essencial das folhas de goiabeira. 2015.

VALADARES, A.C.F., ALVES, C.C.F., ALVES, J.M., DEUS, I.P.B., FILHO, J.G.O., SANTOS, T.C.L., DIAS, H.J., CROTTI, A.E.M., MIRANDA, M.L.D. Essential oils from *Piper aduncum* inflorescences and leaves: chemical composition and antifungal activity against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 90, n. 3, p. 2691-2699, 2018. <http://dx.doi.org/10.1590/0001-3765201820180033>.

VASINAUSKIENE, M., RADUSIENE, J., ZITIKAITE, I., SURVILIENE, E. Antibacterial activities of essential oils from aromatic and medicinal plants against growth of phytopathogenic bacteria. **Agronomy Research**, v. 4, n.especial, p. 437-440, 2006.

XU, C., LIANG, Z., TANG, D., XIAO, T., TSUNODA, M., ZHANG, Y., ZHAO, L., DENG, S., SONG, Y. Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analysis of volatile components from guava leaves. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 20, n. 6, p. 1536-1546, 2017. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2017.1417746>.

ZHANG, J., YE, K.P., ZHANG, X., PAN, D.D., SUN, Y.Y., CAO, J.X. Antibacterial activity and mechanism of action of black pepper essential oil on meat-borne *Escherichia coli*. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 4, p. 2094, 2017. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02094>.

CONCLUSÕES GERAIS

De acordo com os resultados obtidos, conclui-se que:

O composto majoritário dos óleos essenciais das duas variedades de *Citrus sinensis* foi o limoneno, sendo 95,2 % para a laranja-lima e 93,2% para a laranja-bahia.

Foi verificada uma atividade antifúngica frente ao fungo *Rhizopus stolonifer*. De modo que, o OE da laranja-lima e laranja-bahia exibiram 91,9 % e 80% respectivamente, de inibição do crescimento micelial do fungo.

Os componentes majoritários presentes no óleo essencial das flores de *Psidium guajava* foram: α - cadinol (37,8%), β - cariofileno (12,2%), nerolidol (9,1%), α - selineno (8,8%), β - selineno (7,4%) e óxido de cariofileno (7,2%).

O óleo essencial das flores de *Psidium guajava* exibiu atividade antibacteriana com valores de CIM (12,5 $\mu\text{g} / \text{mL}$) para a bactéria *X. fastidiosa* e (62,5 $\mu\text{g} / \text{mL}$) para a *P. carotovorum*, amostras com valores de CIM abaixo de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ apresentam boa atividade, diante disso o óleo essencial das flores de *Psidium guajava* exibiu alta atividade antibacteriana.

O OE-PG exibiu atividade tripanocida com ($\text{CI}_{50} = 14,6 \mu\text{g} / \text{mL}$), sendo reportado que as amostras que exibiram $\text{CI}_{50} > 50 < 100 \mu\text{g. mL}^{-1}$ tiveram sua atividade tripanocida considerada moderadamente ativa e somente acima de $\text{CI}_{50} > 100 \mu\text{g. mL}^{-1}$ são considerados inativas.

O OE-PG apresentou moderada citotoxicidade em fibroblastos com $\text{CC}_{50} = 250,5 \mu\text{g}/\text{mL}$, sendo relatado na literatura que óleos essenciais com $\text{CC}_{50} < 10 \mu\text{g}/\text{mL}$ foram considerados altamente tóxicos, tóxicos $\text{CC}_{50} > 10 < 100 \mu\text{g}/\text{mL}$, Moderadamente tóxico $\text{CC}_{50} > 100 < 1000 \mu\text{g}/\text{mL}$ e não tóxicos $\text{CC}_{50} > 1000 \mu\text{g}/\text{mL}$.

Diante disso, neste presente estudo, foi demonstrado pela primeira vez que os óleos essenciais extraídos das cascas de duas variedades de *Citrus sinensis* possuem alta atividade antifúngica frente ao fungo *Rhizopus stolonifer*. Demonstrou também que o óleo essencial das flores de *Psidium guajava*,

apresentou atividade Tripanocida ativa, bem como moderada citotoxicidade contra células epiteliais aderentes a LLCMK2. Em suma os resultados obtidos possibilitam mais estudos sobre a ação dos óleos essenciais e suas diferentes atividades biológicas.