

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
GOIANO – IF GOIANO - CAMPUS RIO VERDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROQUÍMICA

COMPOSIÇÃO, VARIAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES  
BIOLÓGICAS DO ÓLEO ESSENCIAL DE  
*Psidium myrtoides* O. Berg

Autora: Aline Laiane Borges Dias  
Orientadora: Dr.<sup>a</sup> Cássia Cristina Fernandes Alves

RIO VERDE – GO  
Fevereiro - 2019

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
GOIANO – IF GOIANO - CAMPUS RIO VERDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROQUÍMICA

COMPOSIÇÃO, VARIAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES  
BIOLÓGICAS DO ÓLEO ESSENCIAL DE  
*Psidium myrtoides* O. Berg

Autora: Alline Laiane Borges Dias  
Orientadora: Dr.<sup>a</sup> Cássia 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 Goiano – Campus Rio Verde – Área de concentração Agroquímica.

RIO VERDE – GO  
Fevereiro - 2019

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

DAL436  
c Dias, Alline Laiane Borges Dias  
Composição, Variação química e atividades biológicas do óleo essencial de *Psidium myrtooides* O. Berg / Alline Laiane Borges Dias; orientadora Dr.<sup>a</sup>. Cássia Cristina Fernandes Alves; co-orientadora Dr.<sup>a</sup> Cristiane de Melo Casal. -- Rio Verde, 2019.  
107 p.

Dissertação (Mestrado em Agroquímica) -- Instituto Federal Goiano, Campus Rio Verde, 2019.

1. *Psidium myrtooides*. 2. Óleo essencial. 3. Composição. 4. Atividade antimicrobiana. 5. Antiproliferativa. I. Alves, Dr.<sup>a</sup>. Cássia Cristina Fernandes, orient. II. Casal, Dr.<sup>a</sup> Cristiane de Melo, co-orient. III. Título.

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

COMPOSIÇÃO, VARIAÇÃO QUÍMICA E  
ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO ÓLEO ESSENCIAL DE  
*Psidium myrtoides O. Berg*

Autora: Alline Laiane Borges Dias  
Orientador: Cassia Cristina Fernandes Alves

*TITULAÇÃO:* Mestre em Agroquímica – Área de concentração  
Agroquímica.

APROVADA em 22 de fevereiro de 2019.



Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Elisa Flávia Luiz Cardoso  
Bailão  
*Avaliadora externa*  
UEG - Anápolis



Prof. Dr. Eugênio Miranda  
Sperandio  
*Avaliador externo*  
IF Goiano/RV



Prof. Dr. Fábio Henrique Dyszy  
*Avaliador interno*  
IF Goiano/RV



Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cassia Cristina Fernandes  
Alves  
*Presidente da banca*  
IF Goiano/RV

## AGRADECIMENTOS

Sou eternamente grata a Deus pelo dom da vida, pelo infinito amor e cuidado.

Aos meus pais, João Dias da Silva e Iracy Maria de Jesus Silva, pelo amor e incentivo incondicional. Obrigada pelo companheirismo nesta trajetória, vocês são meus exemplos de determinação, coragem e humildade.

À minha irmã Daisa Mirelle Borges Dias, pela compreensão durante esse tempo no qual estive muito ausente em momentos importantes da vida dela e mesmo assim demonstrou amor e paciência.

Ao meu namorado Helton Dourado de Oliveira, pelo amor paciente e benigno. Pelas orações, abraços e palavras de determinação durante esse período.

As minhas avós (Diomara Maria; Maria da Silva) e avô (Pedro Dias) que sempre torceram por mim e pela minha felicidade. Vocês são meus maiores exemplos de perseverança.

À minha orientadora, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cássia Cristina Fernandes Alves, pelo carinho, amizade, paciência durante todo esse tempo de orientação. Sou muito grata a Deus por colocar pessoas como você na minha vida, você é luz por onde passa. Você é o exemplo de docente que levarei para minha vida profissional.

Ao Prof. Dr. Mayker L. Dantas Miranda, pelo apoio, dedicação, profissionalismo e amizade durante todo o mestrado.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cristiane de Melo Casal, pelo apoio e auxílio nas análises de composição química.

Ao Prof. Dr. Moacir Rossi Forim, da Universidade Federal de São Carlos, por permitir a realização das análises cromatográficas em seu laboratório.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Lizandra Guidi Magalhães, da Universidade de Franca, pela ajuda no teste antibacteriano e antiproliferativa.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Elisa Flávia Luiz Cardoso Bailão, da Universidade Estadual de Goiás, pelo apoio nas análises do fruto de *Psidium myrtoides* O. Berg.

Ao Prof. Dr. Edson Luiz Souchie, do Instituto Federal Goiano – campus Rio Verde, por me receber e permitir os ensaios antifúngicos no laboratório de microbiologia.

Aos botânicos Luzia Francisca e Marcos Sobral, pela imprescindível ajuda na identificação da espécie e registro da exsicata.

Aos meus novos amigos e companheiros de bancada do Laboratório de Química de Produtos Naturais, Larissa Sousa, Flávia Fernanda, Fernando Duarte, Fernando Campos, Rodrigo Cruvinel, Jessika Rezende e Josemar Oliveira.

Aos meus colegas de curso, em especial o Wendel Cruvinel, que esteve comigo durante todos os experimentos.

À aluna de iniciação científica Hellen Regina, que foi o meu braço direito e esquerdo durante todo o mestrado, muito obrigada por toda dedicação.

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

À FAPEG - Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de Goiás, pela bolsa concedida.

À Universidade de Rio Verde, por ceder laboratórios de pesquisa para a realização de alguns experimentos.

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

Em especial, quero deixar registrado e agradecer toda amizade, motivação, alegrias e conhecimento compartilhado pela minha amiga Giovana Baptista Caldas (*in memoriam*), iniciamos os estudos com óleos essenciais ainda na graduação. Obrigada por toda contribuição durante o período em que trabalhamos juntas, você foi uma guerreira!

## **BIOGRAFIA DO AUTOR**

Alline Laiane Borges Dias, filha de Iracy Maria de Jesus Silva e João Dias da Silva, nasceu em 06 de setembro de 1990 na cidade de Iporá-Goiás. Em agosto de 2013, graduou-se em Licenciatura e Bacharelado em Química pelo Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, campus Rio Verde-Goiás. Em fevereiro de 2017, iniciou no curso de pós-graduação *stricto sensu* em Agroquímica pela mesma Instituição, atuando na linha de pesquisa em química de produtos naturais.

## ÍNDICE

	Página
RESUMO.....	01
ABSTRACT.....	03
1. INTRODUÇÃO.....	05
1.1 Família Myrtaceae.....	05
1.2 Gênero <i>Psidium</i> .....	06
1.3 Metabolismo especial e óleos essenciais.....	06
1.4 Aplicações dos óleos essenciais.....	08
1.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	10
2. OBJETIVOS.....	16
2.1 Geral.....	16
2.2 Específicos.....	16
3. CAPÍTULO I.....	17
3.1 INTRODUÇÃO.....	20
3.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
3.2.1 Material vegetal.....	21
3.2.2 Obtenção do óleo essencial.....	21
3.2.3 Análise da composição química.....	21
3.2.4 Avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial.....	22
3.2.5 Atividade antiproliferativa em linhagem de células tumorais humanas.....	23
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
3.4 CONCLUSÃO.....	27



3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	27
4. CAPÍTULO II.....	31
4.1 INTRODUÇÃO.....	35
4.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
4.2.1 Material vegetal.....	36
4.2.2 Variação sazonal e obtenção do óleo essencial.....	37
4.2.3 Teor do óleo essencial.....	37
4.2.4 Análise de CG - EM do óleo de <i>Psidium myrtoides</i> O. Berg.....	37
4.2.5 Ensaio da atividade antifúngica <i>in vitro</i> .....	38
4.2.5.1 <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (Lib.) De Bary.....	38
4.2.5.2 <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> .....	38
4.2.5.3 Determinação da inibição do crescimento micelial.....	39
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
4.3.1 Rendimento e composição química dos óleos essenciais.....	39
4.3.2 Atividade antifúngica.....	45
4.3.2.1 <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> .....	45
4.3.2.2 <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> .....	47
4.4 CONCLUSÃO.....	48
4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49
5. CAPÍTULO III.....	53
5.1 INTRODUÇÃO.....	56
5.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	56
5.2.1 Material vegetal e extração do óleo essencial.....	56
5.2.2 Teor do óleo essencial.....	57
5.2.3 Composição química do óleo essencial de <i>Psidium myrtoides</i> O. Berg.....	58
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	58
5.4 CONCLUSÃO.....	63
5.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64
6. CONCLUSÕES GERAIS.....	66

## ÍNDICE DE TABELAS

	Página
CAPÍTULO I	
Composição química do óleo essencial das folhas de <i>Psidium myrtoides</i> (OE-PM)	24
Concentrações mínimas inibitórias (CMI <sub>s</sub> ) em µg/mL de óleo essencial das folhas de <i>P. myrtoides</i> (PM-OE) frente a bactérias cariogênicas selecionadas.....	26
Efeito inibidor de crescimento (IC <sub>50</sub> ) e índice de seletividade (IS) do óleo essencial das folhas de OE-PM frente a diferentes células.....	26
CAPÍTULO II	
Valores mensais da precipitação e umidade relativa em Rio Verde, no período de abril de 2017 a março de 2018.....	36
Composição química dos óleos essenciais de folhas frescas de <i>Psidium myrtoides</i> coletadas na época chuvosa e seca.....	40
CAPÍTULO III	
Informações sobre o local e mês de coleta das amostras de <i>Psidium myrtoides</i> O. Berg.....	57
Valores médios do teor de óleo essencial (%) de <i>Psidium myrtoides</i> .....	58
Composição química das folhas de <i>P. myrtoides</i> submetidas as diferentes coletas e método de extração.....	59

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
INTRODUÇÃO	
Algumas espécies da família Myrtaceae que apresentam atividade biológica na literatura.....	06
Biossíntese simplificada de terpenos.....	07
Sintomas típicos provocados pelo fungo <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> .....	09
CAPÍTULO II	
Cromatograma do óleo essencial extraído da época chuvosa de <i>Psidium myrtoides</i> .....	42
Cromatograma do óleo essencial extraído da época seca de <i>Psidium myrtoides</i> ..	43
Espectro de massas do $\alpha$ -ylangeno.....	44
Espectro de massas do <i>trans</i> - $\beta$ -cariofileno.....	44
Espectro de massas do <i>cis</i> -Prenil-limoneno.....	44
Espectro de massas do óxido de cariofileno.....	44
Percentual de inibição micelial do óleo essencial de folhas <i>in natura</i> de <i>Psidium myrtoides</i> sobre o fungo <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> .....	46
Percentual de inibição micelial do óleo essencial de folhas <i>in natura</i> de <i>Psidium myrtoides</i> sobre o fungo <i>Colletotrichum gloesporioides</i> .....	47
CAPÍTULO III	
Cromatograma do óleo essencial extraído das folhas jovens de <i>Psidium myrtoides</i> O. Berg.....	60

Cromatograma do óleo essencial extraído das folhas adultas de <i>Psidium myrtoides</i> O. Berg.....	61
Cromatograma do óleo essencial extraído das folhas de <i>Psidium myrtoides</i> O. Berg utilizando o banho ultrassônico combinado com a hidroddestilação.....	61
Cromatograma do óleo essencial extraído das folhas de <i>Psidium myrtoides</i> O. Berg coletadas na UNIRV.....	61
Estrutura química dos compostos majoritários presentes nas amostras (1) Folhas jovens, (2) Folhas adultas, (3) Folhas submetidas a banho ultrassônico, (4) Folhas UNIRV.....	62

## ÍNDICE DE APÊNDICE

	Página
<b>APÊNDICE A</b>	
Table 1A. Values of minimum inhibitory concentrations (MICs) in $\mu\text{g/mL}$ of essential oil from leaves of <i>P. myrtooides</i> (PM-EO) against selected cariogenic bacteria.....	72
Table 2A. Concentration inhibiting 50% growth ( $\text{IC}_{50}$ ), in $\mu\text{g/mL}$ , and selectivity index (SI) of PM-EO against diferent cell lines.....	72
Table S1A. Chemical composition of the essential oil from the leaves of <i>Psidium myrtooides</i> (PM-EO).....	81
<b>APÊNDICE B</b>	
Figure 1B. <i>Citrus reticulata</i> (1), <i>Citrus sinensis</i> (2) and <i>Citrus deliciosa</i> (3).....	85
Table 1B. Chemical composition of EO from <i>Citrus sinensis</i> , <i>C. reticulata</i> and <i>C. deliciosa</i> fruit peel.....	88
Table 2B. <i>In vitro</i> antifungal activity of EO from Citrus and limonene against <i>S. sclerotiorum</i> .....	89

## LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACÕES E UNIDADES

<b>BDA</b>	Ágar batata dextrose
<b>CMI</b>	Concentração mínima inibitória
<b>IC<sub>50</sub></b>	Concentração inibitória de 50%
<b><i>C. gloesporioides</i></b>	<i>Colletotrichum gloesporioides</i>
<b>GM07492A</b>	Linhagem de célula normal de fibroblastos de pulmão
<b>CG-DIC</b>	Cromatografia gasosa com detector de ionização de chamas
<b>CG-EM</b>	Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas
<b>CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub></b>	Diclorometano
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de carbono
<b>DCC</b>	Dicloridrato de clorexidina
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>Hela</b>	Linhagem celular de carcinoma cervical humano
<b>IR</b>	Índice de retenção
<b>MCF-7</b>	Linhagem celular de câncer de mama humano
<b>M059J</b>	Linhagem tumoral humana de glioblastoma
<b>Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	Sulfato de sódio anidro
<b>OE</b>	Óleo essencial
<b>OE<sub>s</sub></b>	Óleos essenciais
<b>OE-PM</b>	Óleo essencial de <i>Psidium myrtoides</i>
<b>PIC</b>	Percentual de Inibição do Crescimento Micelial
<b><i>P. myrtoides</i></b>	<i>Psidium myrtoides</i>

<i>S. sclerotiorum</i>	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>
<i>S. mitis</i>	<i>Streptococcus mitis</i>
<i>S. mutans</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
<i>S. sanguinis</i>	<i>Streptococcus sanguinis</i>
<i>S. salivarius</i>	<i>Streptococcus salivarius</i>
<i>S. sobrinus</i>	<i>Streptococcus sobrinus</i>
<b>S/L</b>	Sem leitura
<b>T%</b>	Teor de óleo essencial, em porcentagem
<b>UniRV</b>	Universidade de Rio Verde
<b>UR</b>	Umidade relativa do ar
<b>XTT</b>	Brometo de [3-(4,5-dimetitiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]
$\gamma$	Gama
$\delta$	Delta
$\beta$	Beta
$\alpha$	Alfa
$\mu\text{g}$	Micrograma
$\mu\text{L.L}^{-1}$	Microlitros por litro
$\text{mg.mL}^{-1}$	Miligrama por mililitro
<b>mL</b>	Mililitro
<b>%</b>	Porcentagem

## RESUMO

DIAS, ALLINE LAIANE BORGES. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde – GO, fevereiro de 2019. **Composição, variação química e atividades biológicas do óleo essencial de *Psidium myrtoides* O. BERG.** Orientadora: Dr.<sup>a</sup> Cassia Cristina Fernandes Alves. Coorientadores: Dr.<sup>a</sup> Cristiane de Melo Cazal e Dr. Mayker L. Dantas Miranda.

Objetivou-se determinar neste estudo a composição, variação química e teor em função da sazonalidade, idade das folhas, habitat e técnica de extração, bem como a atividade antibacteriana, antifúngica e antiproliferativa do óleo essencial de *Psidium myrtoides* O. Berg. Os óleos essenciais foram obtidos através da técnica convencional de hidrodestilação em aparelho de clewenger e pela técnica de banho ultrassônico combinado com a hidrodestilação. A identificação dos compostos foi realizada através de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM). A atividade antibacteriana do OE-PM contra um painel de patógenos orais foi investigada através da concentração mínima inibitória (CMI) utilizando o método de microdiluição, já a atividade antifúngica foi avaliada pela metodologia de difusão em disco contra os fungos *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary e *Colletotrichum gloeosporioides* em diferentes concentrações do óleo essencial. A atividade antiproliferativa em linhagem de célula normal (GM07492A), fibroblastos de pulmão e linhagens tumorais (MCF-7, Hela e M059J) foi realizada utilizando o ensaio de XTT. O teor de óleo essencial das folhas jovens foi o maior em comparação as outras amostras analisadas, 0,53%. A combinação do banho ultrassônico e hidrodestilação proporcionou menor tempo de extração e consumo de energia. Os compostos majoritários encontrados foram  $\alpha$ -copaeno, *trans*- $\beta$ -



cariofileno,  $\alpha$ -humuleno, óxido de cariofileno,  $\alpha$ -bisabolol,  $\alpha$ -ylangeno, *cis*-prenil-limoneno, isobazzanene e o eugenol. Sendo que o eugenol foi encontrado somente na amostra coletada na Universidade de Rio Verde. Os compostos dos óleos essenciais extraídos e analisados variaram qualitativamente e quantitativamente. Em relação as atividades antimicrobianas, o OE-PM obteve pouca influência sobre o efeito antibacteriano, exceto para *Streptococcus mutans* que apresentou forte atividade com CMI = 62,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Na atividade antifúngica em todas as concentrações houve inibição do crescimento dos fungos testados, porém os resultados sobre o *Colletotrichum gloeosporioides* nas concentrações de 225 e 450  $\text{mg mL}^{-1}$  foram melhores, estes não diferiram estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade do fungicida comercial Frowncide 500 SC. O óleo essencial de *Psidium myrtoides* também mostrou potencial na atividade antiproliferativa, com 50% de inibição no crescimento celular normal a  $359,8 \pm 6,3 \mu\text{g mL}^{-1}$ , sendo que contra a linhagem de células tumorais os valores de IC<sub>50</sub> foram significativamente mais baixos do que o obtido para a linha celular normal fibroblastos de pulmão, MCF-7 ( $254,5 \pm 1,6 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), Hela ( $324,2 \pm 41,4 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e M059J ( $289,3 \pm 10,9 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Este trabalho descreve pela primeira vez a composição química, bem como as atividades biológicas do óleo essencial de *Psidium myrtoides* O. BERG.

**PALAVRAS-CHAVES:** *Psidium myrtoides*; óleo essencial; composição; atividade antimicrobiana; antiproliferativa.

## ABSTRACT

The objective of this study was to determine the composition, chemical variation and content in function of seasonality, leaf age, habitat and extraction technique, as well as the antibacterial, antifungal and antiproliferative activity of the *Psidium myrtoides* O. Berg essential oil. The essential oils were obtained by the conventional hydrodistillation technique in clevenger apparatus and the ultrasonic bath technique combined with hydrodistillation. The compounds identification was performed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). The antibacterial activity of essential oil *Psidium myrtoides* against a panel of oral pathogens was investigated through the minimum inhibitory concentration (MIC) using the microdilution method, whereas the antifungal activity was evaluated by disc diffusion methodology against the fungi *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary and *Colletotrichum gloeosporioides* in different essential oil concentrations. Anti-proliferative activity in normal cell line (GM07492A), lung fibroblasts and tumor lines (MCF-7, Hela and M059J) was performed using the XTT assay. The essential oil content of the young leaves was the highest compared to other samples analyzed, 0.53%. The combination of the ultrasonic bath and hydrodistillation provided less extraction time and energy consumption. The major compounds found were  $\alpha$ -copaene, *trans*- $\beta$ -caryophyllene,  $\alpha$ -humulene, caryophyllene oxide,  $\alpha$ -bisabolol,  $\alpha$ -ylangene, *cis*-prenyl-limonene, isobazzanene and eugenol. However, eugenol was found only in the sample collected at the Rio Verde University. Compounds of the extracted and analyzed essential oils varied qualitatively and quantitatively. In relation to antimicrobial activities, OE-PM had little influence on the antibacterial effect, except for *Streptococcus mutans*, a strong activity was observed with MIC= 62.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . In the antifungal activity in all concentrations there was growth inhibition of tested fungi, but the results on *Colletotrichum gloeosporioides* in the concentrations of 225 and 450  $\text{mg mL}^{-1}$  were

better, these were not statistically different by Tukey test from commercial fungicide Frowncide 500 SC. OE-PM also showed potential in antiproliferative activity, with 50% inhibition in normal cell growth at  $359.8 \pm 6.3 \mu\text{g mL}^{-1}$ , however against the tumor cell line the  $\text{IC}_{50}$  values were significantly lower than MCF-7 ( $254.5 \pm 1.6 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), Hela ( $324.2 \pm 41.4 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) and M059J ( $289.3 \pm 10.9 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). This work describes for the first time the chemical composition as well as the biological activities of the *Psidium myrtoides* O. BERG essential oil.

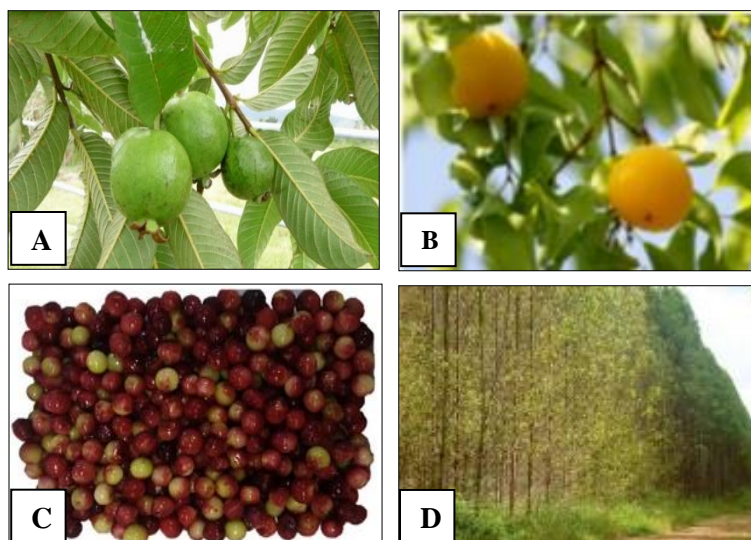
**KEY WORDS:** *Psidium myrtoides*; essential oil; composition; antimicrobial activity; antiproliferative.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Família Myrtaceae

A família Myrtaceae possui aproximadamente 6000 espécies e 145 gêneros de árvores e arbustos nas regiões tropicais. Possui centros de diversidade na América do Sul, Austrália e Ásia Tropical. No Brasil, é uma das famílias com maior número de espécies, aproximadamente 1034, representada por 23 gêneros de ocorrência em todas as regiões do país. *Psidium*, *Eugenia*, *Pimenta*, *Pseuocaryophyllus*, *Syzygium*, *Eucalyptus* e *Plinia* estão entre os principais gêneros desta família (GOVINDARAJAN e BENELLI, 2016; RAPOSO et al., 2018; FARAG et al., 2018).

As espécies crescem sob condições ambientais adversas, em exposição a luz solar, chuva, seca, inundações, sendo desta forma representados por uma fonte rica de metabólitos secundários, estes estão envolvidos na defesa das plantas. Desta forma, alguns gêneros como *Psidium*, *Syzygium* e *Pimenta* destacam-se pela importância comercial, pois muitas das espécies são utilizadas na medicina tradicional. Diversos extratos e óleos essenciais das plantas pertencentes a família Myrtaceae (Figura 1) tem sido investigado por apresentarem potencial antifúngico, antioxidante, leishmanicida, anti-inflamatório, antitumoral, antibacteriana e inseticida (DONADO-PESTANA et al., 2018; DAVARI e EZAZI., 2017; LEE et al., 2004).



**Figura 1** – Algumas espécies da família Myrtaceae que apresentam atividade biológica na literatura (A) *Psidium guajava*; (B) *Eugenia dysenterica* DC.; (C) *Myrciaria dubia* McVaugh; (D) *Eucalyptus* sp. Fonte:(A) Weli et al., 2018; (B) Donado-Pestana et al., 2018; (C) Cunha-Santos et al., 2019; (D) Alfenas et al., 2013.

## 1.2 Gênero *Psidium*

Entre os gêneros pertencentes a família Myrtaceae, o gênero *Psidium* reúne cerca de 100 espécies e se destaca por seu uso alimentar e farmacológico. No Brasil, *Psidium guajava* L. é a espécie de maior interesse econômico deste gênero, porém há crescente interesse nos “araçazeiros” que englobam várias espécies de *Psidium*, tais como: *Psidium myrtilloides* O. Berg, *Psidium firmum* O. Berg, *Psidium myrsinites* DC, *Psidium salutare* entre outros (MACHADO et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2017).

As folhas do araçá são utilizadas em comunidade “quilombolas” com potencial medicinal. Dados na literatura reforçam atividades biológicas atribuída aos frutos e folhas do araçá (FAUTH et al., 2002; CORRÊA et al., 2011; MEDINA et al., 2011; VOSS-RECH et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2012; PATEL, 2012).

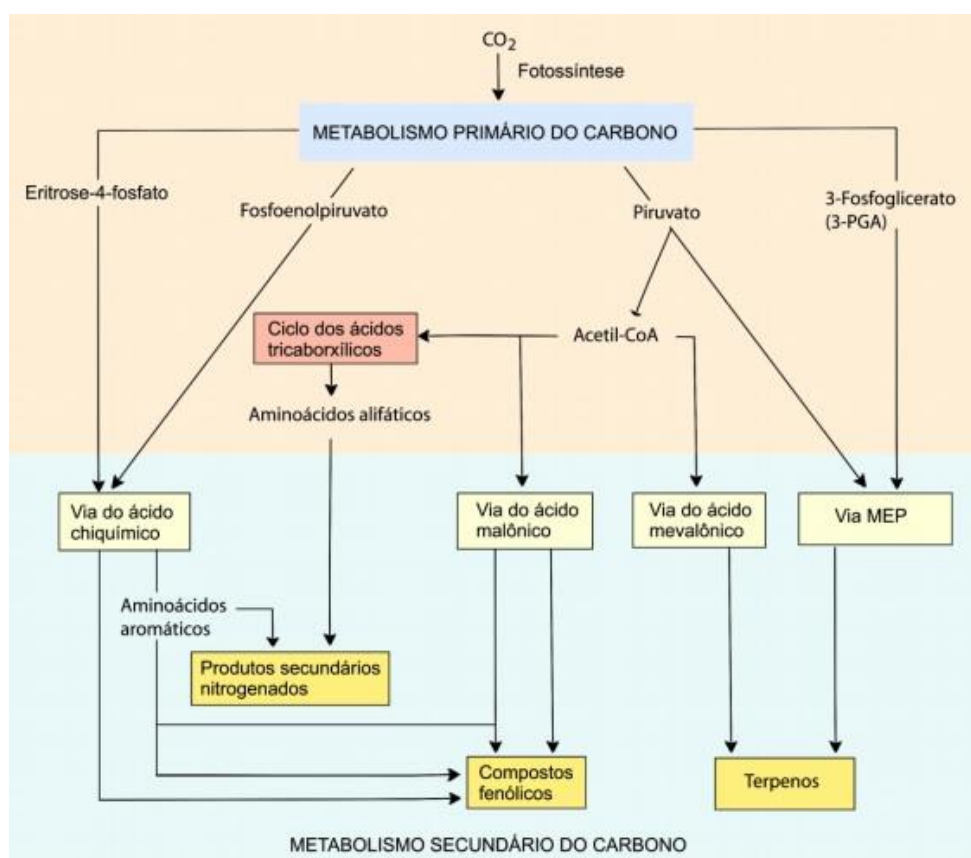
## 1.3 Metabolismo especial e óleos essenciais

Os caminhos do metabolismo secundário das plantas sintetizam os óleos essenciais como compostos de comunicação e defesa. Eles exercem funções importantes de defesa direta e indireta contra patógenos e herbívoros, contribuem também para a atração dos polinizadores e disseminadores de sementes. A acumulação e síntese dos óleos essenciais deve-se a presença de estruturas secretoras como: tricomas glandulares

(Lamiaceae), cavidades secretoras (Myrtaceae, Rutaceae) e ductos de resina (Asteraceae, Apiaceae) (PAVELA e BENELLI., 2016).

Os óleos essenciais são misturas de hidrocarbonetos saturados e insaturados, álcool, aldeídos, ésteres, éteres, cetonas, óxidos e fenóis. Os terpenos são sintetizados na rota do ácido mevalônico (Figura 2), são compostos voláteis e não voláteis, apresentam pouca solubilidade em água. Dentre os 3000 tipos de óleos essenciais catalogados, somente 300 tem sido empregado no âmbito comercial (DONSÌ e FERRARI., 2016; MAIA et al., 2015).

Porém, a composição química dos óleos essenciais pode sofrer variações de acordo com diversos fatores, como: umidade, condições do solo, temperatura, sazonalidade, técnica de extração, diferentes estágios de desenvolvimento da planta, tornando-se desta forma necessária a escolha do melhor momento e processo extrativo para obtenção de substâncias específicas e maior quantidade de óleo essencial (MATIAS et al., 2016).



**Figura 2** – Biossíntese simplificada de terpenos. Fonte: ZEIGER (2006).

Segundo DA SILVA et al. (2016), os estímulos decorrentes do ambiente no qual a planta está sendo exposta pode redirecionar a rota metabólica, resultando na biossíntese de diferentes compostos. Neste trabalho os autores obtiveram o maior teor de óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) no horário de coleta das 11h. LI et al. (2016) observaram variações nos rendimentos e composição química do óleo essencial de *Cinnamomum verum*, segundo eles a coleta das folhas dos ramos com 1 ano e 2 anos apresentam matéria-prima para a extração com alta qualidade. Foi observado maior teor de eugenol nas folhas dos ramos de 1 ano de idade.

DE ALMEIDA et al. (2016) obtiveram maior porcentagem de sesquiterpenos não oxigenados do óleo essencial de *Copaifera langsdorffi* na coleta realizada às 17h na época da seca. Desta forma, conseguiram monitorar as respostas metabólicas e revelar o método para maior obtenção de compostos bioativos de utilização na medicina. El ASBAHANI et al. (2015) destacam sobre os métodos de extração de óleos essenciais que podem ser mais eficientes. Exemplo disto, é a técnica de ultrassom em combinação com a hidrodestilação, no qual induz a vibração mecânica das paredes e membranas do material vegetal, tendo assim, a obtenção mais rápida do óleo essencial.

#### 1.4 Aplicações dos óleos essenciais

Os óleos essenciais apresentam grande potencial como agente antimicrobiano, pela presença de vários tipos de aldeídos, terpenos e compostos fenólicos ativos que atuam em variados patógenos. O OE de *Psidium guajava* L. apresentou atividade antimicrobiana contra *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis* e *Streptococcus sanguinis*. Bactérias deste gênero são responsáveis pela cárie, que é considerada um problema de saúde pública, além de outras doenças como a bacteremia, endocardite e meningite (SILVA et al., 2018; DI VITO et al., 2019; DELORME et al., 2015).

De acordo com HARKAT-MADOURI et al. (2015), a investigação de produtos naturais tem sido promissora na prevenção de doenças orais, sendo cada vez mais usados como alternativa ao tratamento tradicional. Neste trabalho, o óleo essencial das folhas de *Eucalyptus globulus* também foi eficiente contra bactérias periodontopatogênicas. Esse efeito foi atribuído a presença de monoterpenos oxigenados no óleo. BALOUIRI et al. (2016) destaca que uma das principais fontes de novas moléculas ainda são os produtos naturais.

Seguindo este panorama, alguns trabalhos avaliaram o potencial antibacteriano em função do sinergismo dos compostos presentes no óleo essencial (HYLDGAARD et al., 2012). O efeito sinérgico dos compostos segundo os autores, melhora a atividade, obtendo desta forma diferentes modos de ação e possibilitando menor resistência antimicrobiana. Além da atividade antibacteriana, os OEs e extratos de algumas plantas apresentam também atividade biológica contra fungos, vírus e insetos (PAVELA, 2015).

O controle de fungos patogênicos por contato direto com óleos essenciais *in vitro* e *in vivo* tem sido relatado. BOUKAEW et al. (2017) observou que a utilização do óleo essencial de *Vatica diospyroides* Symington durante o armazenamento do milho é muito promissor, pois o OE a  $50 \mu\text{L L}^{-1}$  apresentou forte atividade antifúngica, inibiu completamente a esporulação, germinação e o crescimento de conídios de *Aspergillus flavus* PSRDC-2. Outro fungo patogênico é *Sclerotinia sclerotiorum* Lib. De Bary, causador da doença mofo branco, uma das doenças mais prejudiciais que ocorrem no Brasil (REIS et al., 2011).

*S. sclerotiorum* é favorecido por climas temperados e alta umidade. Esse fungo espalha rapidamente por esporos, geralmente em forma de escleródios podendo infectar caules, flores e folhas (Figura 3). Os escleródios podem residir no solo por vários anos, provocando assim enormes perdas para as lavouras (SABATÉ et al., 2018).



**Figura 3** – Sintomas típicos provocados pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum*. (A) Desenvolvimento inicial da lesão na haste; (B) (D) Expansão gradual da lesão e cobre toda a planta; (E) Causou a morte da planta; (F) Escleródio desenvolvido dentro da haste morta. Fonte: KAMAL et al., 2016.



Óleos essenciais foram utilizados na inibição do crescimento micelial de *S. sclerotiorum*. O uso dos OEs pode proteger sem deixar resíduos nocivos nas culturas (MA et al., 2016; SILVA et al., 2018). Há relatos na literatura também do uso de óleo essencial contra os fungos *Botrytis cinerea*, *Cladosporium cladosporioides* e *Colletotrichum gloeosporioides*. Este último infecta mais de 1000 espécies de plantas, reduz os rendimentos e provoca enormes perdas econômicas. A antracnose provocada pelo *C. gloeosporioides* infecta culturas durante o crescimento ou durante o período de armazenamento (FENG et al., 2019; AGUILAR-GONZÁLEZ et al., 2015; ANDRADE et al., 2016; MURAKAMI et al., 2017).

Muitos OEs são utilizados também na indústria de cosméticos, alimentos, perfumaria, possuem propriedades anti-inflamatórias, analgésicas, antioxidante, anticancerígena e entre outros (BAHR et al., 2018; BIZZO et al., 2009; LAOSINWATTANA et al., 2018).

DO NASCIMENTO et al. (2018) observou que o óleo essencial das folhas de *Psidium guineense* Sw. apresentou potencial antiproliferativo. Salientando que o óleo essencial pode ser promissor em novos tratamentos contra o câncer. De acordo ELKADY e AYOUB (2018) aproximadamente 60% dos medicamentos anticâncer são compostos naturais ou provenientes de um produto natural.

## 1.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILAR-GONZÁLEZ, A. E.; PALOU, E.; LÓPEZ-MALO, A. Antifungal activity of essential oils of clove (*Syzygium aromaticum*) and/or mustard (*Brassica nigra*) in vapor phase against gray mold (*Botrytis cinerea*) in strawberries. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 32, p. 181-185, 2015.

ALFENAS, R. F.; PEREIRA, O. L.; FREITAS, R. G.; FREITAS, C. S.; DITA, M. A.; ALFENAS, A. C. Mass spore production and inoculation of *Calonectria pteridis* on *Eucalyptus spp.* under different environmental conditions. **Tropical Plant Pathology**, v. 38, n. 5, p. 406-413, 2013.

ANDRADE, W. P.; VIEIRA, G. H. C. Effect of essential oils on *in vitro* anthracnose and in fruits of the papaya plant. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, n. 1, p. 367-372, 2016.

BAHR, T.; ALLRED, K.; MARTINEZ, D.; RODRIGUEZ, D.; WINTERTON, P. Effects of a massage-like essential oil application procedure using Copaiba and Deep Blue oils

in individuals with hand arthritis. **Complementary therapies in clinical practice**, v. 33, p. 170-176, 2018.

BALOUIRI, M.; SADIKI, M.; IBNSOUDA, S. K. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. **Journal of pharmaceutical analysis**, v. 6, n. 2, p. 71-79, 2016.

BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 588-594, 2009.

BOUKAEW, S.; PRASERTSAN, P.; SATTAYASAMITSATHIT, S. Evaluation of antifungal activity of essential oils against aflatoxigenic *Aspergillus flavus* and their allelopathic activity from fumigation to protect maize seeds during storage. **Industrial crops and products**, v. 97, p. 558-566, 2017.

CORRÊA, L. C.; SANTOS, C. A. F.; VIANELLO, F.; LIMA, G. P. P. Antioxidant content in guava (*Psidium guajava*) and araca (*Psidium* spp.) germplasm from different Brazilian regions. **Plant Genetic Resources**, v. 9, n. 3, p. 384 – 391, 2011.

CUNHA-SANTOS, E. C. E.; VIGANÓ, J.; NEVES, D. A.; MARTÍNEZ, J.; GODOY, H. T. Vitamin C in camu-camu [*Myrciaria dubia* (HBK) McVaugh]: evaluation of extraction and analytical methods. **Food Research International**, v. 115, p. 160-166, 2019.

DA SILVA, T. I.; MACIEL, T. C. M.; CHAVES, M. M.; DE OLIVEIRA ALCANTARA, F. D.; DOS SANTOS, H. R.; MARCO, C. A. Influência do período de secagem e horário de colheita no teor de óleo essencial de *Lippia alba* (MILL.). **Cadernos de Cultura e Ciência**, v.15, n. 1, p. 29-38, 2016.

DO NASCIMENTO, K. F.; MOREIRA, F. M. F.; SANTOS, J. A.; KASSUYA, C. A. L.; CRODA, J. H. R.; CARDOSO, C. A. L.; VIEIRA, M. C.; RUIZ, A. L. T. G.; FOGGIO, M. A.; CARVALHO, J. E.; FORMAGIO, A. S. N. Antioxidant, anti-inflammatory, antiproliferative and antimycobacterial activities of the essential oil of *Psidium guineense* Sw. and spathulenol. **Journal of ethnopharmacology**, v. 210, p. 351-358, 2018.

DAVARI, M.; EZAZI, R. Chemical composition and antifungal activity of the essential oil of *Zhumeria majdae*, *Heracleum persicum* and *Eucalyptus* sp. against some important phytopathogenic fungi. **Journal de mycologie medicale**, v. 27.4, p. 463-468, 2017.

DE ALMEIDA, L. F. R.; DE OLIVEIRA PORTELLA, R.; BUFALO, J.; MARQUES, M. O. M.; FACANALI, R.; FREI, F. Non-oxygenated sesquiterpenes in the essential oil of *Copaifera langsdorffii* Desf. increase during the day in the dry season. **PloS one**, v. 11, n. 2, p. e0149332, 2016.

DELORME, C.; ABRAHAM, A. L.; RENAULT, P.; GUÉDON, E. Genomics of *Streptococcus salivarius*, a major human commensal. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 33, p. 381-392, 2015.

DI VITO, M.; BELLARDI, M. G.; MONDELLO, F.; MODESTO, M.; MICHELOZZI, M.; BUGLI, F.; SANGUINETTI, M.; SCLOCCHI, C.; SEBASTIANI, M. L.; BIFFI, S.; BARBANTI, L.; MATTARELLI, P. Monarda citriodora hydrolate vs essential oil comparison in several anti-microbial applications. **Industrial Crops and Products**, v. 128, p. 206-212, 2019.

DONADO-PESTANA, C. M.; MOURA, M. H. C.; DE ARAUJO, R. L.; DE LIMA SANTIAGO, G.; DE MORAES BARROS, H. R.; GENOVESE, M. I. Polyphenols from Brazilian native Myrtaceae fruits and their potential health benefits against obesity and its associated complications. **Current Opinion in Food Science**, v. 19, p. 42-49, 2018.

DONADO-PESTANA, C. M.; DOS SANTOS-DONADO, P. R.; DAZA, L. D.; BELCHIOR, T.; FESTUCCIA, W. T.; GENOVESE, M. I. Cagaita fruit (*Eugenia dysenterica* DC.) and obesity: Role of polyphenols on already established obesity. **Food Research International**, v. 103, p. 40-47, 2018.

DONSÌ, F.; FERRARI, G. Essential oil nanoemulsions as antimicrobial agents in food. **Journal of biotechnology**, v. 233, p. 106-120, 2016.

ELKADY, W. M.; AYOUB, I. M. Chemical profiling and antiproliferative effect of essential oils of two Araucaria species cultivated in Egypt. **Industrial Crops and Products**, v. 118, p. 188-195, 2018.

EL ASBAHANI, A.; MILADI, K.; BADRI, W.; SALA, M.; ADDI, E. A.; CASABIANCA, H.; MOUSADIK, A. E.; HARTMANN, D.; JILALE, A.; RENAUD, F. N. R.; ELAISSARI, A. Essential oils: from extraction to encapsulation. **International journal of pharmaceutics**, v. 483, n. 1-2, p. 220-243, 2015.

FARAG, N. F.; EL-AHMADY, S. H.; ABDELRAHMAN, E. H.; NAUMANN, A., SCHULZ, H.; AZZAM, S. M.; EL-KASHOURY, E. S. A. Characterization of essential oils from Myrtaceae species using ATR-IR vibrational spectroscopy coupled to chemometrics. **Industrial Crops and Products**, v. 124, p. 870-877, 2018.

FAUTH, S.; CAMPOS, A. R.; SILVEIRA, E. R.; RAO, V. S. Efeitos de óleos essenciais de plantas no tempo de sono induzido por cetamina em camundongos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, p. 112 – 113, 2002.

FENG, G.; ZHANG, X. S.; ZHANG, Z. K.; YE, H. C.; LIU, Y. Q.; YANG, G. Z.; CHEN, C.; CHEN, M.; YAN, C.; WANG, L.; ZHANG, J. X.; ZHANG, J. Fungicidal activities of camptothecin semisynthetic derivatives against *Colletotrichum gloeosporioides* *in vitro* and in mango fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 147, p. 139-147, 2019.

GOVINDARAJAN, M.; E BENELLI, G.  $\alpha$ -Humulene and  $\beta$ -elemene from *Syzygium zeylanicum* (Myrtaceae) essential oil: highly effective and eco-friendly larvicides against *Anopheles subpictus*, *Aedes albopictus*, and *Culex tritaeniorhynchus* (Diptera: Culicidae). **Parasitology research**, v. 115.7, p. 2771-2778, 2016.

HARKAT-MADOURI, L.; ASMA, B.; MADANI, K.; SAID, Z. B. O. S.; RIGOU, P.; GRENIER, D.; ALLALOU, H.; REMINI, H.; ADJAOUD, A.; BOULEKBACHE-MAKHLOUF, L. Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of essential oil of *Eucalyptus globulus* from Algeria. **Industrial Crops and Products**, v. 78, p. 148-153, 2015.

HYLDGAARD, M.; MYGIND, T.; MEYER, R. L. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. **Frontiers in microbiology**, v. 3, p. 12, 2012.

KAMAL, M. M.; SAVOCCHIA, S.; LINDBECK, K. D.; ASH, G. J. Biology and biocontrol of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary in oil seed Brassicas. **Australasian Plant Pathology**, v. 45, n. 1, p. 1-14, 2016.

LAOSINWATTANA, C.; WICHITTRAKARN, P.; TEERARAK, M. Chemical composition and herbicidal action of essential oil from *Tagetes erecta* L. leaves. **Industrial Crops and Products**, v. 126, p. 129-134, 2018.

LEE, B. H.; ANNIS, P. C.; CHOI, W. S. Fumigant toxicity of essential oils from the Myrtaceae family and 1, 8-cineole against 3 major stored-grain insects. **Journal of Stored Products Research**, v. 40, n. 5, p. 553-564, 2004.

LI, Y.; KONG, D.; LIN, X.; XIE, Z.; BAI, M.; HUANG, S.; NIAN, H.; WU, H. Quality evaluation for essential oil of *Cinnamomum verum* leaves at different growth stages based on GC-MS, FTIR and microscopy. **Food analytical methods**, v. 9, n. 1, p. 202-212, 2016.

MA, B. X.; BAN, X. Q.; HE, J. S.; HUANG, B.; ZENG, H.; TIAN, J.; CHEN, Y. X.; WANG, Y. W. Antifungal activity of *Ziziphora clinopodioides* Lam. essential oil against *Sclerotinia sclerotiorum* on rapeseed plants (*Brassica campestris* L.). **Crop Protection**, v. 89, p. 289-295, 2016.

MACHADO, A. J.; SANTOS, A. T.; MARTINS, G. M.; CRUZ, R. P.; COSTA, M. D. S.; CAMPINA, F. F.; FREITAS, M. A.; BEZERRA, C. F.; LEAL, A. L. A. B.; CARNEIRO, J. N. P.; CORONEL, C.; ROLON, M.; GOMEZ, C. V.; COUTINHO, H. D. M.; MORAIS-BRAGA, M. T. F. Antiparasitic effect of the *Psidium guajava* L. (guava) and *Psidium brownianum* MART. EX DC. (araçá-de-veado) extracts. **Food and Chemical Toxicology**, v. 119, p. 275-280, 2018.

MAIA, T. F.; DONATO, A.; FRAGA, M. E. Atividade antifúngica de óleos essenciais de plantas. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 17, n. 1, p. 105-116, 2015.

MATIAS, E. F.; ALVES, E. F.; SILVA, M. K.; CARVALHO, V. R.; FIGUEREDO, F. G.; FERREIRA, J. V.; COUTINHO, H. D. M.; SILVA, J. M. F. L.; FILHO, J. R.; COSTA, J. G. Seasonal variation, chemical composition and biological activity of the essential oil of *Cordia verbenacea* DC (Boraginaceae) and the sabinene. **Industrial Crops and Products**, v. 87, p. 45-53, 2016.

MURAKAMI, C.; CORDEIRO, I.; SCOTTI, M. T.; MORENO, P. R. H.; YOUNG, M. C. M. Chemical Composition, Antifungal and Antioxidant Activities of *Hedyosmum brasiliense* Mart. ex Miq. (Chloranthaceae) Essential Oils. **Medicines**, v. 4.3, p. 55, 2017.

OLIVEIRA, V. B.; YAMADA, L. T.; FAGG, C. W.; BRANDÃO, M. G. Native foods from Brazilian biodiversity as a source of bioactive compounds. **Food Research International**, v. 48, n. 1, p. 170 – 179, 2012.

OLIVEIRA, E. F.; BEZERRA, D. G.; SANTOS, M. L.; Rezende, M. H.; PAULA, J. A. Leaf morphology and venation of *Psidium* species from the Brazilian Savanna. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 27, n. 4, p. 407-413, 2017.

PATEL, S. Planta tropical exótica *Psidium cattleianum*: uma revisão sobre perspectivas e ameaças. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 11, n. 3, p. 243 – 248, 2012.

PAVELA, R. Essential oils for the development of eco-friendly mosquito larvicides: a review. **Industrial crops and products**, v. 76, p. 174-187, 2015.

PAVELA, R.; BENELLI, G. Essential oils as ecofriendly biopesticides? Challenges and constraints. **Trends in plant science**, v. 21, n. 12, p. 1000-1007, 2016.

RAPOSO, J. D. A.; FIGUEIREDO, P. L. B.; SANTANA, R. L.; DA SILVA JUNIOR, A. Q.; SUEMITSU, C.; DA SILVA, R.; E MAIA, J. G. S. Seasonal and circadian study of the essential oil of *Myrcia sylvatica* (G. Mey) DC., a valuable aromatic species occurring in the Lower Amazon River region. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 79, p. 21-29, 2018.

REIS, E. M.; CASA, R. TREZZI.; BIANCHIN, V. Control of plant disease by crop rotation. **Summa Phytopathologica**, v. 37, n. 3, p. 85-91, 2011

SABATÉ, D. C.; BRANDAN, C. P.; PETROSELLI, G.; ERRA-BALSELLS, R.; AUDISIO, M. C. Biocontrol of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary on common bean by native lipopeptide-producer *Bacillus* strains. **Microbiological research**, v. 211, p. 21-30, 2018.

SILVA, E. A. J.; DA SILVA, V. P.; ALVES, C.C.F.; ALVES, J. M.; SOUCHIE, E. L.; BARBOSA, L.C.A. Composição química do óleo essencial de folhas de *Psidium guajava* e sua toxicidade contra *Sclerotinia sclerotiorum*. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 39, n. 2, p. 865-874, 2018.

SILVA, E. A. J.; ESTEVAM, E. B. B.; SILVA, T. S.; NICOLELLA, H. D.; FURTADO, R. A.; ALVES, C. C. F.; SOUCHIE, E. L.; MARTINS, C. H. G.; TAVARES, D. C.; BARBOSA, L. C. A.; MIRANDA, M. L. D. Antibacterial and antiproliferative activities of the fresh leaf essential oil of *Psidium guajava* L.(Myrtaceae). **Brazilian Journal of Biology**, 2018.

VOSS-RECH, D.; KLEIN, C. S.; TECHIO, V. H.; SCHEUERMANN, G. N.; RECH, G.; FIORENTIN, L. Atividade antibacteriana de extratos vegetais contra sorovares de *Salmonella*. **Ciência Rural**, v. 41, n. 2, p. 314 – 320, 2011.

WELI, A.; AL-KAABI, A.; AL-SABAHI, J.; SAID, S.; HOSSAIN, M. A.; AL-RIYAMI, S. Chemical composition and biological activities of the essential oils of *Psidium guajava* leaf. **Journal of King Saud University-Science**, 2018.

ZEIGER, E.; TAIZ, L. Secondary metabolites and Plant defense. In: *Plant Physiology*. 4<sup>o</sup> Ed., cap 13. **Sinauer Associates**, 2006

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Geral

O objetivo deste trabalho foi avaliar a composição química do óleo essencial de *Psidium myrtoides* O. Berg, bem como determinar sua atividade antimicrobiana e antiproliferativa.

### 2.2 Específicos

- Identificar os constituintes do óleo essencial extraído das folhas *in natura* de *P. myrtoides*;
- Avaliar a atividade antibacteriana *in vitro* do óleo essencial das folhas de *P. myrtoides* sobre *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis* e *Streptococcus sanguinis*;
- Analisar a atividade antiproliferativa *in vitro* do óleo essencial de *P. myrtoides* em três diferentes linhagens de células tumorais: adenocarcinoma de mama humano (MCF-7), adenocarcinoma cervical humano (Hela) e glioblastoma humano (M059J);
- Avaliar a influência da variação sazonal sobre o teor e a composição química do óleo essencial de *P. myrtoides*;
- Determinar a atividade antifúngica do óleo essencial de *P. myrtoides* contra *Colletotrichum gloeosporioides* e *Sclerotinia sclerotiorum*;
- Avaliar a variação química do óleo essencial de *P. myrtoides* extraído das folhas em diferentes etapas do desenvolvimento vegetativo, habitat e técnica de extração de ultrassom combinada com hidrodestilação;

### 3. CAPÍTULO I

(Normas de acordo com a revista Natural Product Research)

#### **COMPOSIÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ANTIPROLIFERATIVA *IN VITRO* DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Psidium myrtoides* O. Berg (MYRTACEAE)**

**RESUMO** - Neste estudo, a composição química, o potencial antibacteriano e antiproliferativo do óleo essencial obtido das folhas frescas de *Psidium myrtoides* (OE-PM) contra patógenos orais e linhagens de células tumorais humanas foram investigados pela primeira vez. As análises de CG-DIC e CG-EM mostraram que o *trans*- $\beta$ -cariofileno (30,9%),  $\alpha$ -humuleno (15,9%),  $\alpha$ -copaeno (7,8%), óxido de cariofileno (7,3%) e  $\alpha$ -bisabolol (5,3%) são os principais constituintes do OE-PM. A atividade antibacteriana do OE-PM contra um painel de patógenos orais foi investigada através da concentração mínima inibitória (CMI) utilizando o método de microdiluição. O OE-PM apresentou atividade moderada frente à *Streptococcus mitis* (CMI = 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), *Streptococcus sanguinis* (CMI = 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), *S. sobrinus* (CMI = 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), *S. salivarius* (CMI = 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e uma forte atividade contra *S. mutans* (CMI = 62,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). A atividade antiproliferativa em linhagem de célula normal (GM07492A, fibroblastos de pulmão) e linhagens tumorais (MCF-7, Hela e M059J) foi realizada utilizando o ensaio de XTT. O OE-PM mostrou 50% de inibição no crescimento celular normal a  $359,8 \pm 6,3 \mu\text{g mL}^{-1}$ . A atividade antiproliferativa foi observada contra linhagem de células tumorais humanas com os valores de IC<sub>50</sub> significativamente mais baixos do que o obtido para a linha celular



normal, demonstrando os valores para as células MCF-7 ( $254,5 \pm 1,6 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), HeLa ( $324,2 \pm 41,4 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e M059J ( $289,3 \pm 10,9 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Portanto, a citotoxicidade do OE-PM teve pouca influência sobre o efeito antibacteriano, uma vez que esta atividade é determinada nas concentrações inferiores. Resultados sugerem que o OE-PM é uma fonte promissora de novos agentes antibacterianos e antitumorais.

**PALAVRAS-CHAVES:** *Psidium myrtoides*; óleo essencial; *trans*- $\beta$ -cariofileno; patógenos orais; atividade antiproliferativa.

## CHEMICAL COMPOSITION AND *IN VITRO* ANTIBACTERIAL AND ANTIPROLIFERATIVE ACTIVITIES OF ESSENTIAL OIL FROM *Psidium myrtoides* O. Berg (Myrtaceae) LEAVES

**ABSTRACT-** In this study, the chemical composition and antibacterial and antiproliferative potential of the essential oil from *Psidium myrtoides* (PM-EO) fresh leaves against oral pathogens and human tumour cell lines were investigated for the first time. GC-FID and GC-MS analyses showed that *trans*- $\beta$ -caryophyllene (30.9%),  $\alpha$ -humulene (15.9%),  $\alpha$ -copaene (7.8%), caryophyllene oxide (7.3%), and  $\alpha$ -bisabolol (5.3%) are the major constituents of PM-EO. The antibacterial activity of PM-EO against a panel of oral pathogens was investigated in terms of their minimal inhibitory concentrations (MIC) using the microdilution method. PM-EO displayed moderate activity against *Streptococcus mitis* (MIC = 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), *Streptococcus sanguinis* (MIC = 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), *Streptococcus sobrinus* (MIC = 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), and *S. salivarius* (MIC = 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), and strong activity against *S. mutans* (MIC = 62.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). The antiproliferative activity in normal (GM07492A, lung fibroblasts) and tumors cell lines (MCF-7, HeLa, and M059J) was performed using the XTT assay. PM-EO showed 50% inhibition of normal cell line growth at  $359.8 \pm 6.3 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Antiproliferative activity was observed against human tumors cell lines, with  $\text{IC}_{50}$  values significantly lower than that obtained for the normal cell line, demonstrating  $\text{IC}_{50}$  values for MCF-7 cells ( $254.5 \pm 1.6 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), HeLa cells ( $324.2 \pm 41.4 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) and M059J cells ( $289.3 \pm 10.9 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Therefore, the cytotoxicity of PM-EO had little influence on the antibacterial effect, since it showed antibacterial activity at lower concentrations. The results suggest that PM-EO is a promising source of new antibacterial and antitumor agents.

**KEYWORDS:** *Psidium myrtoides*; essential oil; *trans*- $\beta$ -caryophyllene; oral pathogens; antiproliferative activity.



### 3.1 INTRODUÇÃO

Os óleos essenciais obtidos de diferentes fontes das plantas podem apresentar diversas atividades biológicas, tais como: Antiprotozoária, antioxidante, antifúngica, antimutagênica, anti-inflamatória, anticâncer e propriedades antibacterianas (RAUT e KARUPPAYIL 2014). A cárie dentária é um problema de saúde pública que afeta muitos países ao redor do mundo. Bactérias acidogênicas e acidúricas podem formar colônias organizadas causando placa dental (CREVELIN et al. 2015). O procedimento mais eficiente para a prevenção da cárie dentária é a remoção dos biofilmes por escovação e fio dental (MELO et al. 2017).

Atualmente, o tratamento do câncer é considerado um dos problemas mais desafiadores na medicina. Vários estudos experimentais e epidemiológicos demonstraram que a utilização de algumas plantas pode promover ação quimiopreventiva e/ou antineoplásica (MANGAL et al. 2013). Neste cenário, alguns óleos essenciais extraídos de diferentes plantas apresentam potencial antitumoral promissor, tanto *in vitro* e *in vivo* (LESGARDS et al. 2014).

Considerando relatos recentes que demonstraram o potencial antibacteriano e antiproliferativo de alguns óleos essenciais (TILAOUI et al. 2011; VIEIRA et al. 2017), neste estudo o objetivo foi a determinação da composição química, o efeito antibacteriano e antiproliferativo *in vitro* do óleo essencial extraído das folhas de *Psidium myrtilodes* (OE-PM) (Myrtaceae).

*Psidium myrtilodes* é conhecido popularmente como araçá roxo no Brasil e várias propriedades biológicas têm sido relatadas para os extratos e óleos essenciais do gênero *Psidium*, tais como: antidiabético, anti-inflamatória, antifúngica, anti-hipertensiva,

antidiarreico, antioxidante, atividade antibacteriana e antiprotozoária (HO et al. 2012; ALVAREDA et al. 2015; UKWUEZE et al. 2015; CHARNEAU et al. 2016; OUYANG et al. 2016; TULER et al. 2017). Até o momento, a composição química, atividade antibacteriana e antiproliferativa do óleo essencial das folhas de *P. myrtoides* não foram investigadas na literatura.

## **3.2 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.2.1 Material vegetal**

As folhas de *Psidium myrtoides* O. Berg (Myrtaceae) foram coletadas no Instituto Federal Goiano - campus Rio Verde, na cidade de Rio Verde (latitude 16°06'20" S e longitude 51°17'11" W), Estado de Goiás, Brasil, em junho de 2016, às 9h. A planta foi identificada pela botânica Luzia Francisca de Souza e um exemplar de *P. myrtoides* (HJ998) foi depositado no herbário Jataiense Professor Germano Guarim Neto.

### **3.2.2 Obtenção do óleo essencial**

O óleo essencial das folhas frescas de *P. myrtoides* foi extraído por hidrodestilação por 2 horas em aparelho do tipo Clevenger. A hidrodestilação foi realizada em triplicata. Para este fim, o material vegetal foi dividido em três amostras de 500 g cada e 500 mL de água destilada foram adicionados a cada amostra. Após a coleta manual do óleo essencial (OE), traços de água no óleo foram removidos com sulfato de sódio anidro, seguido de filtração.

O OE foi armazenado em frasco âmbar e mantido em geladeira a - 4°C até a análise. O rendimento do OE foi calculado a partir do peso das folhas frescas.

### **3.2.3 Análise da composição química**

O OE-PM foi dissolvido em éter etílico e analisado por cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (CG-DIC) e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM), utilizando o aparelho Shimadzu QP5000 Plus e CGMS2010 Plus (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan). A temperatura da coluna utilizada em CG-DIC foi programada com temperatura inicial de 60 °C com elevação da temperatura a 240 °C na razão de 3 °C/min e elevação a 240 °C durante 5 min. O gás de arraste foi o H<sub>2</sub> a taxa de fluxo de 1,0 mL/min.

O equipamento foi ajustado para operar no modo de injeção, o volume de injeção foi de 0,1 µl (split de 1:10), e as temperaturas do injetor e o detector foram mantidos a 240 e 280 °C, respectivamente. As análises foram realizadas em triplicata e a concentração relativa dos componentes foram obtidas em porcentagem (%) da área do pico correspondente em relação à área total dos picos.

As condições do CG-EM e a identificação do OE-PM foram previamente relatadas (COSTA et al., 2017). A identificação dos compostos voláteis do OE (Tabela 1) foi baseada em seus índices de retenção em uma coluna capilar OPTIMA-5 (30m x 0,25 mm; 0,250 µm) sob as mesmas condições operacionais usadas para CG em relação a uma série homóloga de *n*-alcanos (C<sub>8</sub>-C<sub>20</sub>), as estruturas foram computadorizadas com NIST/EPA/NIH e seus padrões de fragmentação foram comparados com dados da literatura (ADAMS., 2007).

### 3.2.4 Avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial

As concentrações mínimas inibitórias (CMI<sub>s</sub>) do óleo essencial foram calculadas utilizando o método de microdiluição com microplacas de 96 poços. Foram utilizadas as seguintes cepas da ATCC-American Type Culture Collection: *Streptococcus salivarius* (ATCC 25975), *Streptococcus sobrinus* (ATCC 33478), *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Streptococcus mitis* (ATCC 49456), e *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556). Colônias individuais crescidas em ágar-sangue durante 24 horas (Difco Labs, Detroit, Michigan, EUA) foram suspensas em 10 mL de caldo trípico de soja (Difco). A padronização da suspensão de cada microrganismo foi realizada conforme descrito anteriormente (FERREIRA et al., 2010).

Amostra de óleo essencial foi dissolvida em DMSO (Merck, Darmstadt, Alemanha) 1 mg mL<sup>-1</sup> e diluído em caldo de soja trípico (Difco), de modo que concentrações na faixa de 4000 a 3,9 µg mL<sup>-1</sup> foram obtidas. A concentração final de DMSO foi de 5% (v/v) e esta solução foi usada como controle negativo. Um poço inoculado foi incluído, de modo a controlar a adequação do caldo para o crescimento do microrganismo. Um não inoculado (sem o agente antimicrobiano) também foi incluído para garantir a esterilidade do meio.

O dicloridrato de clorexidina (DCC) (C8527 Sigma) foi dissolvido em caldo trípico de soja (Difco) e utilizado como controle positivo em concentrações que variaram entre 59,0 a 0,115 µg mL<sup>-1</sup>. As microplacas (96 poços) foram seladas com parafilme e

incubadas a 37°C por 24 horas como descrito acima. Após a incubação, 30 µl da solução aquosa de resazurina a 0,02% (199303 Sigma, Stl Louis, MO, EUA) foram adicionados em cada cavidade da microplaca para indicar a viabilidade do microrganismo. Os valores de CMI foram determinados a partir da menor concentração do OE capaz de inibir o crescimento dos microrganismos. Os ensaios foram realizados em triplicata para cada microrganismo.

### **3.2.5 Atividade antiproliferativa em linhagem de células tumorais humanas**

Neste estudo, foram utilizadas três diferentes linhagens de células tumorais: adenocarcinoma de mama humano (MCF-7), adenocarcinoma cervical humano (Hela) e glioblastoma humano (M059J). Uma linha celular humana normal (fibroblastos de pulmão, GM07492A) foi incluída para avaliar a possível atividade do produto natural testado. As diferentes linhagens de células foram mantidas em meio de cultura (HAM-F10 + DMEM, 1:1, Sigma-Aldrich) suplementado com 10% de soro bovino fetal (Nutricell), antibióticos (0,01 mg mL<sup>-1</sup> de estreptomicina e 0,005 mg mL<sup>-1</sup> penicilina; Sigma-Aldrich) e 2,38 mg mL<sup>-1</sup> de HEPES (Sigma-Aldrich). As células foram incubadas em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 36,5 °C e ambiente úmido.

A atividade antiproliferativa foi medida utilizando o kit de Ensaio Colorimétrico Toxicológico *in vitro* (XTT; Roche Diagnostics) de acordo com as instruções do fabricante. Para os experimentos, as células (10<sup>4</sup> células/poço) foram distribuídas em microplacas de 96 poços. Cada poço recebeu 100 µL de meio HAM-F10/DMEM contendo óleo essencial em concentrações que variaram de 3,91 a 500 µg mL<sup>-1</sup>. Foram incluídos controle negativo (sem tratamento), o solvente (DMSO a 0,02%, Dimetilsulfóxido, Sigma-Aldrich) e o positivo (Doxorrubicina, DXR, Pharmacia Brasil Ltda.). Após incubação a 36,5 °C por 24 horas, o meio de cultura foi removido. As células foram lavadas com 100 µL de PBS (phosphate buffered saline) para remover os tratamentos e posteriormente foram expostas a 100µL de meio de cultura HAM-F10 sem vermelho de fenol.

Em seguida, 25 µl de XTT foi adicionado e as células foram incubadas a temperatura de 36,5 °C por 17 horas. A absorção das amostras foi determinada usando leitor de placas múltiplas (ELISA - Tecan - SW Magellan vs 5.03 STD 2P) no comprimento de onda de 450 nm e comprimento de referência de 620 nm.

A atividade antiproliferativa foi avaliada utilizando IC<sub>50</sub>, concentração capaz de inibir 50% do crescimento da linha celular como um parâmetro de resposta, no qual foi calculado com o programa GraphPad Prism, traçando a sobrevivência celular contra as respectivas concentrações dos tratamentos. One-way ANOVA foi utilizado para a comparação de médias ( $P < 0,05$ ). As análises foram realizadas em triplicata. O índice de seletividade foi calculado dividindo o valor de IC<sub>50</sub> do óleo essencial obtido para célula GM07492A pelo valor do IC<sub>50</sub> obtido para a linhagem de células tumorais.

### 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os principais compostos presentes no óleo essencial de *Psidium myrtooides* são: *Trans*- $\beta$ -cariofileno (30,9%),  $\alpha$ - humuleno (15,9%),  $\alpha$ - copaeno (7,8%), óxido de cariofileno (7,3%) e  $\alpha$ - bisabolol (5,3%) (Tabela 1) conforme identificado por cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (CG-DIC) e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM).

Os compostos *trans*- $\beta$ -cariofileno,  $\alpha$ - humuleno,  $\alpha$ - copaeno, óxido de cariofileno e  $\alpha$ - bisabolol foram previamente detectados nos óleos essenciais de outras três espécies do gênero *Psidium* (MEDEIROS et al., 2015; SCUR et al., 2016; SILVA et al., 2016). A composição química observada no presente estudo foi semelhante à composição química já descrito na literatura para outras espécies pertencentes ao mesmo gênero e família Myrtaceae (STEFANELLO et al., 2011).

**TABELA 1** - Composição química do óleo essencial das folhas de *Psidium myrtooides* (OE-PM).

TR (min)	Compostos	IR <sub>exp</sub>	IR <sub>lit</sub>	AR %
				OE-PM
5.718	$\alpha$ -pineno	934	932	1.3
6.897	sabineno	979	969	0.2
8.503	limoneno	1029	1024	1.0
11.063	terpinoleno	1092	1086	0.2
22.608	<b><math>\alpha</math>-copaeno</b>	1372	1374	<b>7.8</b>
24.419	<b><i>trans</i>-<math>\beta</math>-cariofileno</b>	1423	1417	<b>30.9</b>
25.059	<i>trans</i> - $\alpha$ -bergamoteno	1439	1432	1.0
25.804	<b><math>\alpha</math>-humuleno</b>	1457	1452	<b>15.9</b>
26.082	ishwarone	1464	1465	1.5
26.728	$\gamma$ -muroleno	1480	1478	1.1
26.957	$\alpha$ -curcumeno	1485	1479	0.5

27.118	$\beta$ -selineno	1489	1489	1.5
27.488	$\delta$ -selineno	1499	1492	1.5
27.991	$\gamma$ -cadineno	1512	1513	2.7
28.600	<i>trans</i> -cadin-1,4-dieno	1527	1533	4.3
29.050	$\alpha$ -cadineno	1539	1537	1.6
29.310	elemol	1546	1548	2.2
29.909	<i>trans</i> -nerolidol	1564	1561	2.6
30.107	espatulenol	1575	1577	1.0
30.920	<b>óxido de cariofileno</b>	1587	1582	<b>7.3</b>
31.690	globulol	1599	1590	0.8
32.626	cubenol	1635	1645	1.8
32.924	hinesol	1641	1640	1.0
33.285	$\alpha$ -cadinol	1651	1652	1.0
33.595	14-hidroxi-9-epi-( <i>E</i> )-cariofileno	1669	1668	0.6
34.631	<b><math>\alpha</math>-bisabolol</b>	1688	1685	<b>5.3</b>
35.117	tiglato de geranyl	1701	1700	1.1
<b>Total</b>				<b>97.7</b>

**TR:** Tempo de retenção; **IR<sub>exp</sub>:** Índice de retenção determinado em relação aos *n*-alcanos (C<sub>8</sub>-C<sub>20</sub>) utilizando coluna capilar OPTIMA-5 (30 m x 0.25 mm; 0.250  $\mu$ m); **IR<sub>lit</sub>:** Índice de retenção da literatura (Adams, 2007); **AR%:** Área relativa.

A tabela 2 lista as concentrações mínimas inibitórias em relação aos ensaios antibacterianos do OE-PM contra as principais bactérias cariogênicas. O óleo essencial extraído das folhas de *P. myrtoides* (OE-PM) exibiu uma atividade moderada contra *Streptococcus mitis* e *S. sanguinis* (CMI = 100  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>), e *S. sobrinus* e *S. salivarius* (CMI = 250  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>). Além disso, o OE-PM exibiu forte atividade contra *S. mutans* (CMI= 62,5  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>). De acordo com VIEIRA et al. (2017), a atividade antibacteriana pode ser considerada boa quando os valores de CMI são inferiores a 100  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> e moderada de 100-500  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>. Este resultado é interessante, pois poucos compostos naturais são conhecidos por inibir *S. mutans*, principal agente causador de cárie dentária (MELO et al., 2017).

A atividade antibacteriana dos óleos essenciais está associada com à lipofilicidade dos seus compostos químicos, pois podem facilmente difundir através da membrana celular. Esta é uma importante vantagem no que diz respeito à interação com alvos intracelulares (VIEIRA et al., 2017). Além disso, a possível interação sinérgica entre os componentes do óleo essencial é benéfica para a sua atividade (CARNEIRO et al., 2017). Os principais constituintes do OE-PM já tiveram atividade antibacteriana descrita na literatura (KASIM et al., 2014; MOREIRA et al., 2014; MARTINS et al., 2015; CARNEIRO et al., 2017). A presença destes compostos explica a boa ação antibacteriana do OE-PM.



**TABELA 2** - Concentrações mínimas inibitórias (CMIs) em  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de óleo essencial das folhas de *P. myrtoides* (PM-OE) frente a bactérias cariogênicas selecionadas.

Microrganismos	CMI	CMI
	OE-PM	CP
<i>Streptococcus mutans</i>	62,5	0,922
<i>Streptococcus mitis</i>	100	1,844
<i>Streptococcus sanguinis</i>	100	0,922
<i>Streptococcus sobrinus</i>	250	0,922
<i>Streptococcus salivarius</i>	250	0,737

CMI: Concentração mínima inibitória ( $\mu\text{g/mL}$ ); CP: Controle positivo–Dicloridrato de clorexidina; OE-PM: Óleo essencial das folhas de *P. myrtoides*.

A citotoxicidade do OE-PM foi avaliada contra a linha celular normal GM07492A, com  $\text{IC}_{50}$  de  $359,8 \pm 6,3 \mu\text{g mL}^{-1}$ , e contra linhas tumorais MCF-7, Hela, e M059J com  $\text{IC}_{50}$  de  $254,5 \pm 1,6$ ;  $324,2 \pm 41,4$  e  $289,3 \pm 10,9 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente (Tabela 3). O  $\text{IC}_{50}$  do MCF-7, Hela, e M059J foram significativamente menores do que a da linha normal, com índices de seletividade de 1,4, 1,1 e 1,2, respectivamente.

**TABELA 3** - Efeito inibidor de crescimento ( $\text{IC}_{50}$ ) e índice de seletividade (IS) do óleo essencial das folhas de OE-PM frente a diferentes células.

Células	Tratamentos ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )			
	OE-PM		DRX	
	$\text{IC}_{50}$	IS	$\text{IC}_{50}$	IS
GM07492A	$359,8 \pm 6,3$	-	$0,5 \pm 0,2$	-
MCF-7	$254,5 \pm 1,6^a$	1,4	$62,1 \pm 2,0$	-
Hela	$324,2 \pm 41,4^a$	1,1	$5,3 \pm 1,3$	-
M059J	$289,3 \pm 10,9^a$	1,2	$16,2 \pm 2,5$	-

A Doxorrubicina (DRX) foi usado com controle positivo, GM07492A (fibroblasto de pulmão humano), MCF-7 (adenocarcinoma da mama humana), Hela (adenocarcinoma cervical humano) e M059J (glioblastoma humano). O índice de seletividade é a relação entre o valor  $\text{IC}_{50}$  e do PM-OE obtido para células GM07492a e para a linhagem de células tumorais humanas. Os valores de média  $\pm$  SD,  $n=3$ .

<sup>a</sup> Significativamente diferente da linha celular normal (GM07492A) ( $p < 0,05$ ).

A evidência a partir deste estudo é a quantidade elevada de terpenos conhecidos pela sua atividade antitumoral, tais como: *trans*- $\beta$ -cariofileno,  $\delta$ -selineno,  $\alpha$ -humuleno, e óxido de cariofileno, desta forma sugere-se que o OE-PM é uma fonte importante de compostos puros com atividade antitumoral promissora (SALVADOR et al., 2011; QUASSINTI et al., 2013; FIDYT et al., 2016; GUERRINI et al., 2016).

Além disso, apesar da baixa concentração de monoterpenos hidrocarbonados, esta classe de compostos merece atenção especial para a sua importante atividade antitumoral (SOBRAL et al., 2014). É importante notar que a citotoxicidade do OE-PM teve pouca influência sobre o efeito antibacteriano, uma vez que revelou atividade antimicrobiana em menores concentrações.

### 3.4 CONCLUSÃO

Esta é a primeira vez que a composição química e as atividades antibacteriana e antiproliferativa do óleo essencial das folhas de *P. myrtoides* foram investigados contra bactérias cariogênicas e linhagem de células tumorais humanas. O óleo essencial exibe atividade antibacteriana moderada contra *Streptococcus mitis*, *S. sanguinis*, *S. sobrinus*, e *S. salivarius* e boa atividade contra *S. mutans*. Nesse sentido, o OE-PM pode ser usado como um componente promissor de novos produtos de cuidado oral devido *S. mutans* ser um dos principais agentes causadores de problemas orais tal como, a cárie dentária. Portanto, os resultados destacam *P. myrtoides* como uma potencial fonte para a pesquisa de novos agentes antitumorais e reforça a importância dos estudos que avaliam os mecanismos celulares envolvidos no tratamento antibacteriano e antiproliferativo. Em suma, mais estudos para identificar os componentes químicos ativos do OE-PM estão em andamento.

### 3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R.P. (2007). Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. Carol Stream, Illinois, USA: Allured Publishing Corporation.

ALVARENDA FQ, ROYO VA, MOTA BFC, LAURENTIZ RS, MENEZES EV, MELO JUNIOR AF, OLIVEIRA DA. 2015. Atividade antinociceptiva e antimicrobiana da casca do caule de *Psidium cattleianum* Sabine. Rev Bras Pl Med. 17:1125–1133.

CARNEIRO NS, ALVES CCF, ALVES JM, EGEA MB, MARTINS CHG, SILVA TS, BRETANHA LC, BALLESTE MP, MICKE GA, SILVEIRA EV, et al. 2017. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of essential oils from leaves and flowers of *Eugenia klotzchiana* Berg (Myrtaceae). An Acad Bras Cienc. 89:1907–1915.

CHARNEAU S, MESQUITA ML, BASTOS IMD, SANTANA JM, PAULA JE, GRELLIER P, ESPINDOLA LS. 2016. *In vitro* investigation of Brazilian Cerrado plant

extract activity against *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma cruzi* and *T. brucei gambiense*. Nat Prod Res. 30:1320–1326.

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. (2017). Essential oil repellent action of plants of the genus *Zanthoxylum* against *Bemisia tabaci* biotype B (Homoptera: Aleyrodidae). Sci Hortic., 226, 327-332.

CREVELIN E.J, CAIXETA S.C, DIAS H.J, GROppo M, CUNHA W.R, MARTINS C.H.G, CROTTI A.E.M. 2015. Antimicrobial activity of the essential oil of *Plectranthus neochilus* against cariogenic bacteria. Evid Based Complement Alternat Med. 2015:102317.

FERREIRA, M.A., CARVALHO, T.C., TURATTI, I.C.C., FURTADO, N.A.J.C., MARTINS, C.H.G., LOPES, N.P., CUNHA, W.R., & CROTTI, A.E.M. (2010). Antimicrobial activity of *Aegiphilla sellowiana* against oral pathogens. Brazilian Journal of Pharmacognosy, 20, 246-249.

FIDYT K, FIEDOROWICZ A, STRZADALA L, SZUMNY A. 2016.  $\beta$ -caryophyllene and  $\beta$ -caryophyllene oxide – natural compounds of anticancer and analgesic properties. Cancer Med. 5:3007–3017.

GUERRINI A, SACCHETTI G, GRANDINI A, SPAGNOLETTI A, ASANZA M, SCALVENZIL. 2016. Cytotoxic effect and TLC bioautograph-guided approach to detect health properties of Amazonian *Hedyosmum sprucei* essential oil. Evid Based Complement Alternat Med. 2016:1638342.

HO R, VIOLETTE A, CRESSEND D, RAHARIVELOMANANA P, CARRUPT PA, HOSTETTMANN K. 2012. Antioxidant potential and radical-scavenging effects of flavonoids from the leaves of *Psidium cattleianum* grown in French Polynesia. Nat Prod Res. 26:274–277.

KASIM L.S, OLALEYE K.O, FAGBOHUN A.B, IBITOYE S.F, ADEJUMO O.E. 2014. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from *Struchium sparganophora* Linn. Ktze Asteraceae Adv Biol Chem. 4:246–252.

LESGARDS JF, BALDOVINI N, VIDAL N, PIETRI S. 2014. Anticancer activities of essential oils constituents and synergy with conventional therapies: review. Phytother Res. 28:1423–1446.

MANGAL M, SAGAR P, SINGH H, RAGHAVA GPS, AGARWAL SM. 2013. NPACT: naturally occurring plant-based anti-cancer compound-activity-target database. Nucleic Acids Res. 41:D1124–D1129.

MARTINS C.M, NASCIMENTO E.A, MORAIS S.A.L, OLIVEIRA A, CHANG R, CUNHA L.C.S, MARTINS M.M, MARTINS C.H.G, MORAES T.S, RODRIGUES P.V, et al. 2015. Chemical constituents and evaluation of antimicrobial and cytotoxic activities

of *Kielmeyera coriacea* Mart & Zucc. Essential oils. Evid Based Complement Alternat Med. 2015:842047.

MEDEIROS F.C.M, MENEZZI C.H.S.D, BIZZO H.R, VIEIRA R.F. 2015. Scents from Brazilian Cerrado: *Psidium myrsinites* DC. (Myrtaceae) leaves and inflorescences essential oil. J Essent Oil Res. 27:289–292.

MELO D.C, MIRANDA M.L.D, JUNIOR W.G.F, ANDRADE P.M, ALCOBA A.E.T, SILVA T.S, CAZAL C.M, MARTINS C.H.G 2017. Anticariogenic and antimycobacterial activities of the essential oil of *Siparuna guianensis* Aublet (Siparunaceae). Orbital: Electron J Chem. 9:55–60.

MOREIRA R.R.D, MARTINS G.Z, BOTELHO V.T, SANTOS L.E, CAVALEIRO C, SALGUEIRO L, ANDRADE G, MARTINS C.H.G. 2014. Composition and activity against oral pathogens of the essential oil of *Melampodium divaricatum* (Rich.) DC. Chem Biodivers. 11:438–444.

OUYANG W, ZHU X, WANG W, CHEN X.X, CHEN Y.J, CAO Y. 2016. Novel skeleton sesquiterpenoids isolated from guava leaves. Nat Prod Res. 30:898–903.

QUASSINTIL, LUPIDI G, MAGGIF, SAGRATINI G, PAPA F, VITTORI S, BIANCO A, BRAMUCCI M. 2013. Antioxidant and antiproliferative activity of *Hypericum hircinum* L. subsp. Majus (Aiton) N. Robson essential oil. Nat Prod Res. 27:862–868.

RAUT J.S, KARUPPAYIL S.M. 2014. A status review on the medicinal properties of essential oils. Ind Crops Prod. 62:250–264.

SALVADOR M.J, CARVALHO J.E, WISNIEWSKI-J. R A, KASSUYA C.A.L, SANTOS E.P, RIVA D, STEFANELLO M.E.A. 2011. Chemical composition and cytotoxic activity of the essential from the leaves of *Casearia lasiophylla*. Rev Bras Farmacogn. 21:864–868.

SCUR M.C, PINTO F.G.S, PANDINI J.A, COSTA W.F, LEITE C.W, TEMPONI L.G. 2016. Antimicrobial and antioxidant activity of essential oil and different plant extracts of *Psidium cattleianum* Sabine. Braz J Biol. 76:101– 108.

SILVA E.A.J, SILVA V.P, ALVES C.C.F, ALVES J.M, SOUCHIE E.L, BARBOSA L.C.A. 2016. Effect of natural and artificial drying of leaf biomass of *Psidium guajava* on the content and chemical composition of essential oil. Semina: Cienc Agrar. 37:3059–3068.

SOBRAL M.V, XAVIER A.L, LIMA T.C, SOUSA D.P. 2014. Antitumor activity of monoterpenes found in essential oils. Scientific World Journal. 2014:953451.

STEFANELLO M.E.A, PASCOAL A.C.R.F, SALVADOR M.J. 2011. Essential oils from neotropical Myrtaceae: chemical diversity and biological properties. Chem Biodivers. 8:73–94.

TILAOUI M, MOUSE H.A, JAAFARI A, ABOUFATIMA R, CHAIT A, ZYAD A. 2011. Chemical composition and antiproliferative activity of essential oil from aerial parts of a medicinal herb *Artemisia herba-alba*. Rev Bras Farmacogn. 21:781–785.

TULER A.C, SILVA T, CARRIJO T.T, GARBIN M.L, MENDONCA C.B.F, PEIXOTO A.L, ESTEVES-GONCALVES V. 2017. Taxonomic significance of pollen morphology for species delimitation in *Psidium* (Myrtaceae). Plant Syst Evol. 303:317–327.

UKWUEZE S.E, OSADEBE P.O, OKOYE F.B.C. 2015. A new antibacterial benzophenone glycoside from *Psidium guajava* (Linn.) leaves. Nat Prod Res. 29:1728–1734.

VIEIRA T.M, DIAS H.J, MEDEIROS T.C.T, GRUNDMANN C.O, GROppo M, HELENO V.C.G, MARTINS C.H.G, CUNHA W.R, CROTTI A.E.M, SILVA E.O. 2017. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Artemisia absinthium* Asteraceae leaves. J Essent Oil Bear Pl. 20:123–131.

## 4. CAPÍTULO II

(Normas de acordo com a revista Ciência Rural)

### **VARIAÇÃO SAZONAL, COMPOSIÇÃO QUÍMICA E POTENCIAL ANTIFÚNGICO *IN VITRO* DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Psidium myrtoides* O. Berg (MYRTACEAE)**

**RESUMO** – *Psidium myrtoides* O. Berg é uma espécie pertencente ao gênero *Psidium*. Este gênero apresenta diversas espécies com atividades biológicas já relatadas na literatura, porém há poucos estudos com a espécie *P. myrtoides*. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da variação sazonal sobre o teor e a composição química do óleo essencial (OE) extraído de folhas *in natura* de *P. myrtoides*, bem como o seu potencial antifúngico contra *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary e *Colletotrichum gloeosporioides*. As folhas foram coletadas nas estações sazonais seca e chuvosa. Para obtenção dos óleos essenciais, as folhas foram submetidas a hidrodestilação em aparelho de Clevenger. O teor dos óleos essenciais foi determinado em % e a composição química por CG-EM. Não foram estatisticamente observados pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade diferenças significativas nos teores do OE entre a época chuvosa (0,34%) e seca (0,47%). Os óleos essenciais foram caracterizados pela presença de monoterpenos e sesquiterpenos durante as épocas analisadas. Os compostos majoritários em comum na época chuvosa e seca foram o *trans*- $\beta$ -cariofileno (20,0 e 32,9%) e *cis*-prenil-limoneno (12,4 e 17,8%). Outros compostos representativos em relação à porcentagem foram:  $\alpha$ -copaeno,  $\beta$ -bisaboleno, globulol, *epi*- $\alpha$ -bisabolol (época chuvosa) e o  $\delta$ -amorpheno e 7-*epi*- $\alpha$ -selineno (época seca). A atividade antifúngica *in vitro* apresentou percentual de inibição para todas as concentrações do OE frente aos fungos testados, porém nas concentrações de 225 e 450 mg mL<sup>-1</sup> sobre o fungo *C. gloeosporioides*, não diferiram

estatisticamente do fungicida comercial Frowncide 500 SC. Os resultados deste estudo contribuem para identificar a variação química do óleo essencial de *Psidium myrtoides* em relação as duas épocas, característica desta região, bem como demonstrar o potencial antifúngico desta espécie.

**PALAVRAS-CHAVES:** Sazonalidade; óleo essencial; *Sclerotinia sclerotiorum*; *Colletotrichum gloeosporioides*.

**SAZONAL VARIATION, CHEMICAL COMPOSITION AND *IN VITRO* ANTIFUNGAL POTENTIAL OF *Psidium myrtoides* O. Berg (MYRTACEAE) ESSENTIAL OIL**

**ABSTRACT** - *Psidium myrtoides* O. Berg is a species in the genus *Psidium*. This genus presents several species with biological activities already reported in the literature, however there are few studies with the *P. myrtoides* species. The objective of this work was to evaluate the influence of seasonal variation on content and chemical composition of essential oil (OE) extracted from *P. myrtoides* fresh leaves, as well as its antifungal potential against *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary and *Colletotrichum gloeosporioides*. The leaves were collected in dry and rainy seasons. To obtain the essential oils, the leaves were submitted to hydrodistillation in a Clevenger apparatus. The essential oils contents were determined in % and the chemical composition by GC-MS. There were no statistically significant differences in the OE content between rainy season (0.34%) and dry (0.47%) by Tukey test at 5% probability. The essential oils were characterized by the presence of monoterpenes and sesquiterpenes during the analyzed times. The major compounds common in rainy and dry season were  $\beta$ -caryophyllene (20.0 and 32.9%) and *cis*-prenyl-limonene (12.4 and 17.8%). Other representative compounds in relation to the percentage were:  $\alpha$ -copaene,  $\beta$ -bisabolene, globulol, *epi*- $\alpha$ -bisabolol (rainy season) and  $\delta$ -amorphene and 7-*epi*- $\alpha$ -selinene (dry season). The *in vitro* antifungal activity showed a percentage of inhibition for all OE concentrations against the fungi tested, but at the concentrations of 225 and 450 mg mL<sup>-1</sup> on the fungus *C.gloeosporioides* did not differ statistically from commercial fungicide Frowncide 500 SC. The results of this study contribute to identify the chemical variation of *Psidium myrtoides* essential oil in relation to the two characteristic time of this region, as well as to demonstrate the antifungal potential of this species.



**KEYWORDS:** Seasonality; essential oil; *Sclerotinia sclerotiorum*; *Colletotrichum gloeosporioides*.

## 4.1 INTRODUÇÃO

Fungos patogênicos provocam inúmeras perdas em culturas. Por exemplo, a colza, cenoura, girassol, soja, feijão e o amendoim são suscetíveis a *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary, já o *Colletotrichum gloeosporioides* infecta espécies como a manga, mamão, caju e cacau (OJAGHIAN et al., 2016; HU et al., 2013; BOLTON et al., 2006; FENG et al., 2019).

Os fungicidas sintéticos são utilizados para o controle das doenças provocadas por esses fungos. Porém, a utilização destes fungicidas podem trazer potenciais riscos ao meio ambiente, aos consumidores e ainda contribuir para a resistência desses patógenos (OLIVEIRA et al., 2019). Desta forma, são necessários estudos para a descoberta e identificação de novas substâncias ativas que podem ser utilizadas como fungicidas naturais.

Os óleos essenciais (OEs) são alternativas promissoras, pois apresentam propriedades bactericidas, fungicidas, antioxidante e antinociceptiva. Os componentes presentes nos óleos essenciais são formados de três vias biossintéticas: a via do fosfato metileritritol (mono- e diterpenos), via do ácido mevalônico (sesquiterpenos) e via do ácido chiquímico (fenilpropanoides). Essas substâncias são variáveis e apresentam diversas funções biológicas na planta (JACOB., 2016).

A variação química dos compostos é influenciada por fatores externos, como o clima por exemplo, alguns compostos podem ser acumulados em um período específico para responder as mudanças ambientais. Desta forma, a composição química dos óleos essenciais está sujeita a variações qualitativa e quantitativa dos seus compostos (HUSSAIN., 2010).

O gênero *Psidium* apresenta diversas atividades comprovadas *in vitro* e *in vivo*, dentre elas, o efeito antifúngico (BEZERRA et al., 2018). Sendo assim, dando continuidade aos estudos da espécie *Psidium myrtoides* O. Berg, ainda escassa na literatura, este trabalho teve como objetivo avaliar pela primeira vez a influência da

variação sazonal sobre o teor e a composição química do óleo essencial extraído das folhas *in natura* de *P. myrtooides*, bem como avaliar o potencial antifúngico deste óleo.

## 4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.2.1 Material vegetal

O material vegetal de *Psidium myrtooides* O. Berg foi coletado no setor de fruticultura do Instituto Federal Goiano - Campus Rio Verde, localizado na cidade de Rio Verde situado nas coordenadas geográficas latitude 16°06'20" S e longitude 51°17'11" W, Estado de Goiás, Brasil. Segundo a classificação de Köppen-Geiger(1961) o clima no Estado de Goiás enquadra-se no tipo Cwa no Sudoeste, clima temperado úmido com inverno seco e verão quente. A tabela 1 demonstra as condições ambientais nos meses em que as amostras foram coletadas.

**TABELA 1-** Valores mensais da precipitação e umidade relativa em Rio Verde, no período de abril de 2017 a março de 2018. Fonte: Inmet.

Meses	Precipitação total (mm)	UR (%)
Abril	128,6	76,6
Maio	60	72,6
Junho	0	62,9
Julho	0	51,9
Agosto	1,5	43,9
Setembro	23,5	34,05
Outubro	85,6	51,4
Novembro	289,7	74,5
Dezembro	243,9	81,1
Janeiro	266,5	78,1
Fevereiro	136,2	78,5
Março	133,1	76,3

**UR:** Umidade relativa em porcentagem.

As folhas foram coletadas em todas as partes da planta: Ápice, parte intermediária e base.

## 4.2.2 Variação sazonal e obtenção do óleo essencial

As folhas de *P. myrtooides* foram coletadas mensalmente nas estações sazonais seca (abril a 1ª quinzena de outubro/2017) e chuvosa (2ª quinzena de outubro a março/2018), entre o horário das 07 e 08 horas. A extração do óleo essencial foi realizada pelo método de hidrodestilação em aparelho de Clevenger, por um período de 3 horas a partir da ebulição. Foram utilizados 100 gramas de amostras *in natura* em triplicata para determinação do rendimento expresso em (% p/p).

Decorrido o tempo de extração, o hidrolato foi recolhido em um funil de separação, no qual foram adicionados 30 mL de diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) com três repetições (Partição líquido-líquido). Logo em seguida, foi adicionado sulfato de sódio anidro PA ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) para retirada da água que, eventualmente, passou no funil de separação. Os óleos essenciais foram acondicionados em vidro âmbar, e mantidos sob refrigeração a  $-4\text{ }^\circ\text{C}$  até posterior análise da composição química e atividade biológica.

## 4.2.3 Teor do óleo essencial

O rendimento dos óleos essenciais (estação chuvosa e seca) foram calculados utilizando a fórmula  $T\% = \text{Massa do óleo (g)}/\text{massa das folhas (in natura)} * 100$ . Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, utilizando o Teste F, e as médias comparadas a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Para as análises estatísticas dos dados empregou-se o *software* estatístico SISVAR versão 5.6.

## 4.2.4 Análise de CG-EM do óleo de *Psidium myrtooides* O. Berg

As análises da composição química dos óleos essenciais de *P. myrtooides* foram realizadas por cromatografia a gás acoplado ao espectrômetro de massas sequencial (CG-EM), equipado com injetor automático CombiPAL (AOC-5000, Shimadzu), uma coluna Restek Rtx-5ms (30 m x 0.25 mm x 0.25  $\mu\text{m}$ ) foi utilizada com as seguintes características operacionais: temperatura inicial foi mantida a  $60\text{ }^\circ\text{C}$  por 3 min, seguido de um acréscimo de  $3\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$  até atingir  $200\text{ }^\circ\text{C}$  e posteriormente foi programada para um aumento de temperatura de  $15\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$  até  $280\text{ }^\circ\text{C}$ , permanecendo nessa temperatura por mais 1 min. As análises foram realizadas utilizando o gás (He) como carreador.

A identificação dos componentes foi realizada por comparação dos seus índices de retenção (IR) utilizando uma solução padrão de *n*-alcanos ( $\text{C}_8\text{-C}_{31}$ ) e por comparação

dos espectros de massas do banco de dados da biblioteca do NIST/EPA/NHI e de literatura (ADAMS, 2007).

#### **4.2.5 Ensaios da atividade antifúngica *in vitro***

O ensaio biológico foi realizado no laboratório de microbiologia vegetal do Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde. Os fungos fitopatogênicos *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary e *Colletotrichum gloeosporioides* foram cedidos pela Embrapa Arroz e Feijão, localizada em Santo Antônio de Goiás para o desenvolvimento da atividade biológica. No ensaio, reuniram-se os óleos essenciais extraídos das folhas de *P. myrtoides* (estação chuvosa e seca) para avaliar o crescimento micelial dos fungos fitopatogênicos.

##### **4.2.5.1 *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary**

Seguindo a metodologia de difusão em disco de GARCIA et al., 2012 com algumas adaptações, o óleo essencial de *P. myrtoides* foi avaliado sobre o crescimento micelial de *S. Sclerotiorum*, em concentrações de 18, 45, 90, 180 e 270 mg ml<sup>-1</sup> do OE em estudo. Utilizou-se o controle negativo (ausência do óleo essencial + água destilada estéril) como testemunha e como controle positivo, o fungicida frownicide 500 SC, na concentração de 10 µg ml<sup>-1</sup> do ingrediente ativo (fluazinam). Como adjuvante, utilizou-se Tween 80, a 0,05%, para homogeneização dos óleos e a água.

O óleo essencial em diferentes concentrações foi adicionado após a solidificação do meio de cultura, discos de BDA de 8 mm de diâmetro, contendo o micélio com 7 dias de idade, foram depositados no centro da placa Petri contendo 9 cm de diâmetro. As placas foram incubadas sob fotoperíodo de 12 h, à temperatura de 27 ± 2 °C. As medições foram realizadas quando houve o crescimento total da testemunha. O ensaio foi realizado com 4 repetições para cada tratamento.

##### **4.2.5.2 *Colletotrichum gloeosporioides***

Para avaliação do crescimento micelial do *C. gloeosporioides* considerou-se a densidade do óleo essencial de *P. myrtoides* a 0,9 g/ml para obtenção das diluições em série de acordo com o método descrito por ALIGIANNIS et al. (2001) e LIMA et al. (2006) com algumas adaptações. O óleo essencial foi diluído inicialmente em água

destilada estéril para obtenção da concentração da solução-padrão inicial a 50%, equivalente a 450 mg ml<sup>-1</sup>, utilizando Tween 80 a 0,05% como surfactante. Em seguida, o óleo essencial foi diluído de forma seriada.

A determinação da atividade antifúngica do OE foi realizada pelo método da difusão em disco em meio sólido para as concentrações em 450, 225 e 113 mg ml<sup>-1</sup>, sendo utilizado também o controle positivo e negativo conforme descrito no item 4.2.5.1.

#### 4.2.5.3 Determinação da inibição do crescimento micelial

A inibição do crescimento dos fungos *S. Sclerotiorum* e *C. gloesporioides* foi determinada pela média das repetições para cada concentração em relação ao crescimento da testemunha, utilizando valores de PIC (Percentual de Inibição do Crescimento Micelial), cuja fórmula é:

$$\text{PIC: } \frac{(\text{diâmetro da testemunha} - \text{diâmetro da concentração}) \times 100}{\text{Diâmetro da testemunha}}$$

Os dados obtidos nesse estudo foram submetidos à análise de variância, e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o *software* estatístico SISVAR versão 5.6.

### 4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 4.3.1 Rendimento e composição química dos óleos essenciais

Os teores dos óleos essenciais obtidos das folhas de *P. myrtooides* através do método de hidrodestilação, permitiu os rendimentos de 0,34% para a época chuvosa e 0,47% época da seca. Pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade essas amostras não diferiram entre si. Porém, o rendimento desses OEs foi superior ao relatado por DA SILVA et al. (2018) para as espécies *Plinia cauliflora* (Mart.) (0,05%) e *Syzygium cumini* (L.) (0,03%) também pertencentes à família Myrtaceae.

Foram identificados 47 compostos na época chuvosa e 41 na época seca nos óleos essenciais estudados, que compreende 90,1% e 93,8% da composição total. Os compostos majoritários de ambas épocas estão destacados em negrito (Tabela 2). Estudos relatam a variação da composição química dos OEs quando são submetidos a variação

sazonal, pois resulta em alterações na biossíntese e perfil fitoquímico (GASPARETTO et al., 2017; JÊEMA et al., 2012; DE ALMEIDA et al., 2016).

**TABELA 2** – Composição química dos óleos essenciais de folhas frescas de *Psidium myrtoides* coletadas na época chuvosa e seca.

Compostos	IR*	Área (%)	
		Estação chuvosa	Estação seca
Monoterpenos hidrocarbonados			
tricicleno	921	-	0,21
$\alpha$ -pineno	932	0,8	-
sabineno	969	0,1	-
limoneno	1024	0,1	0,06
Monoterpenos oxigenados			
linalol	1095	0,1	-
$\alpha$ -terpineol	1186	0,1	-
Sesquiterpenos hidrocarbonados			
$\delta$ -elemeno	1335	-	0,1
$\alpha$ -cubebeno	1345	0,1	-
$\alpha$ -longipineno	1350	0,1	0,1
<b><math>\alpha</math>-ylangeno</b>	1373	-	<b>8,4</b>
$\alpha$ -copaeno	1374	7,5	-
$\beta$ -elemeno	1389	0,1	-
7- <i>epi</i> -sesquithujeno	1390	0,2	-
$\alpha$ -funebreno	1402	0,4	0,2
<b><i>trans</i>-<math>\beta</math>-cariofileno</b>	1417	<b>20,0</b>	<b>32,9</b>
$\alpha$ -gurjuneno	1409	0,1	0,4
$\alpha$ -cedreno	1410	-	0,4
<i>trans</i> - $\alpha$ -bergamoteno	1432	1,0	1,1
isobazzanene	1436	1,2	-
$\alpha$ -guaiano	1437	0,1	-
<b><i>cis</i>-prenil-limoneno</b>	1443	<b>12,4</b>	<b>17,8</b>
<i>epi</i> - $\beta$ -santaleno	1445	0,1	2,0
$\alpha$ -patchouleno	1454	0,1	0,1

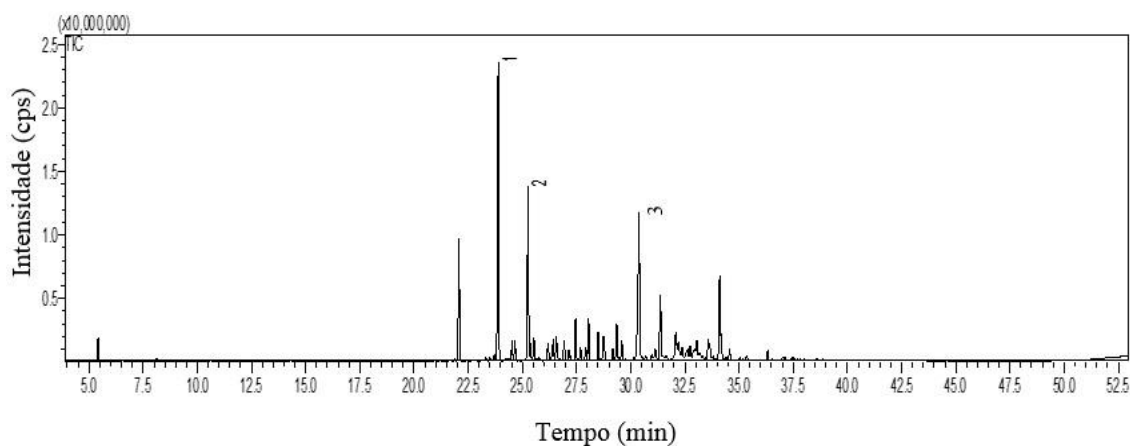
$\beta$ -santaleno	1457	1,5	0,3
allo-aromadendreno	1460	-	1,4
$\alpha$ -acoradieno	1464	0,1	0,2
<i>cis</i> -muurolo-4(14),5- dieno	1465	1,3	-
$\beta$ -acoradieno	1469	-	0,6
4,5-di- <i>epi</i> - aristolocheno	1471	1,4	1,8
$\gamma$ -gurjuneno	1475	1,4	2,6
$\gamma$ -muroleno	1478	-	0,4
$\alpha$ -curcumeno	1479	1,3	0,2
$\alpha$ -amorphenno	1483	0,9	0,5
$\gamma$ -amorphenno	1495	0,9	-
$\beta$ -himachaleno	1500	-	0,2
$\beta$ -bisaboleno	1505	2,6	1,4
$\delta$ -amorphenno	1511	2,2	5,5
$\gamma$ -cadineno	1513	0,6	0,8
7- <i>epi</i> - $\alpha$ -selineno	1520	1,7	4,7
$\delta$ -cadineno	1522	-	0,8
zonarene	1528	-	0,5
dauca-4(11),8-dieno	1530	-	-
<i>trans</i> -cadinina-1,4-dieno	1533	0,8	2,8
$\alpha$ -cadineno	1537	2,0	-
selina-3,7(11) - dieno	1545	-	0,7
Sesquiterpenos oxigenados			
<i>trans</i> -nerolidol	1561	1,2	-
espatulenol	1577	0,1	0,5
<b>óxido de cariofileno</b>	<b>1582</b>	<b>12,0</b>	0,7
globulol	1590	4,1	0,1
viridiflorol	1592	0,8	-
1,10-di- <i>epi</i> -cubenol	1618	0,6	1,4
1- <i>epi</i> -cubenol	1627	1,4	0,6



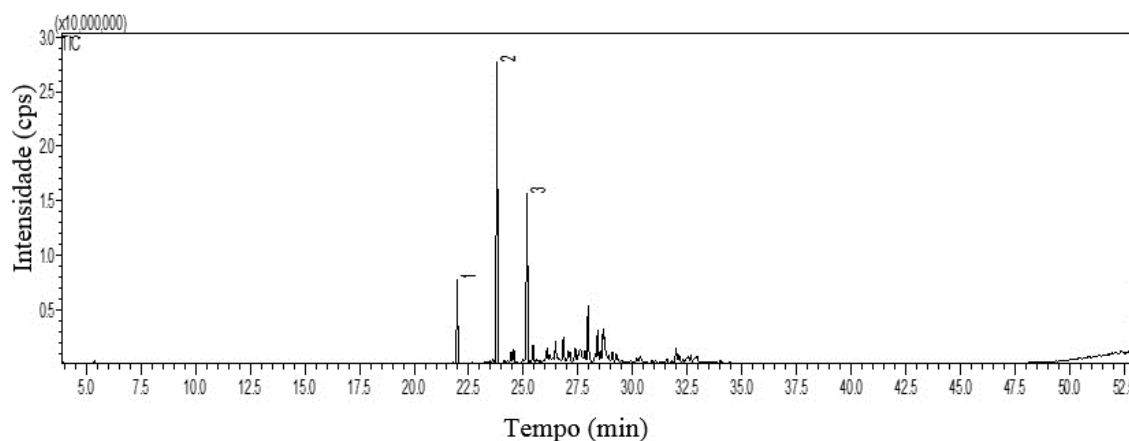
$\gamma$ -eudesmol	1630	0,1	0,1
<i>cis</i> -cadin-4-en-7-ol	1635	0,7	-
cedrelanol	1638	-	0,6
epi- $\alpha$ -muurolol	1640	-	-
hinesol	1640	0,9	0,2
$\alpha$ -muurolol	1644	0,6	-
patchoulol	1656	0,7	-
selin-11-en-4- $\alpha$ -ol	1658	-	0,3
epi- $\alpha$ -bisabolol	1683	3,7	0,1
nootkatol	1714	0,2	-
Total identificado		90,1	93,8
Monoterpenos hidrocarbonados		1,0	0,27
Monoterpenos oxigenados		0,2	-
Sesquiterpenos hidrocarbonados		61,9	88,9
Sesquiterpenos oxigenados		27,0	4,63

IR: Índice de retenção;

Os cromatogramas que evidenciam a composição química e os compostos majoritários de ambas as épocas são mostrados nas Figuras 1 e 2, respectivamente.



**Figura 1** – Cromatograma do óleo essencial extraído da época chuvosa de *Psidium myrtooides*. Picos: (1) *trans*- $\beta$ -cariofileno; (2) *cis*-prenil-limoneno; (3) óxido de cariofileno.



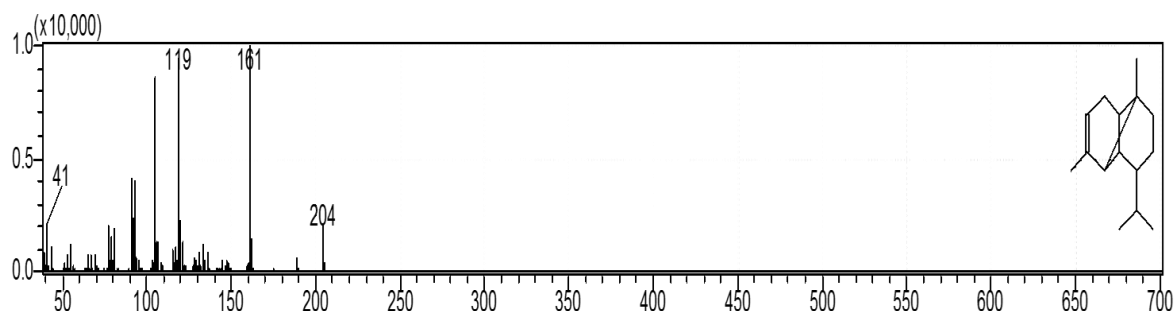
**Figura 2** – Cromatograma do óleo essencial extraído da época seca de *Psidium myrtilloides*. Picos: (1)  $\alpha$ -ylangeno; (2) *trans*- $\beta$ -cariofileno; (3) *cis*-prenil-limoneno

Os cromatogramas da época chuvosa e seca demonstraram dois compostos majoritários em comum, o *trans*- $\beta$ -cariofileno (20,0% e 32,9%) e *cis*-prenil-limoneno (12,4% e 17,8%). Esses compostos sofreram variação sazonal em suas concentrações, sendo que na época da seca as proporções foram maiores para os dois compostos. Segundo de ALENCAR et al. (2017), compostos pertencentes à classe dos sesquiterpenos são obtidos em maiores proporções quando as temperaturas estão elevadas, pois a perda ao meio ambiente ocorre mais lentamente devido ao seu peso molecular.

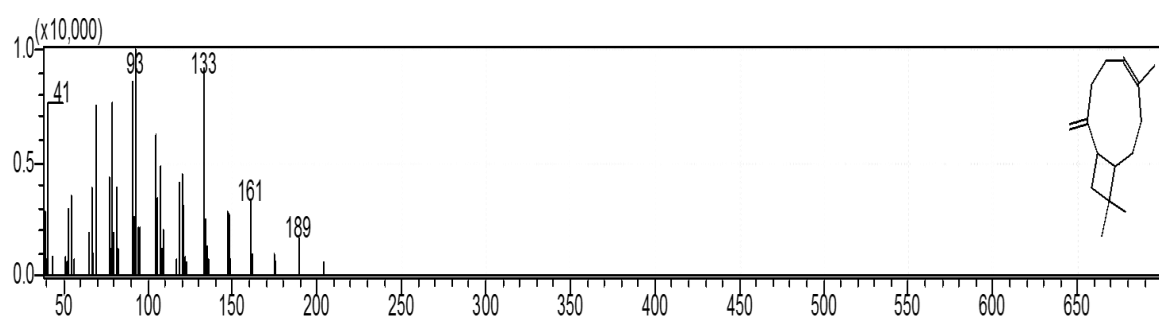
Dentre os compostos presentes nas duas estações e também classificados como sesquiterpenos, verificou-se que as concentrações de alguns componentes foram maiores na época chuvosa, por exemplo, o óxido de cariofileno. A explicação é que os metabólitos secundários podem ser produzidos advindos dos estímulos do meio ambiente, desta forma a via metabólica é redirecionada, levando à biossíntese de compostos e proporções diferentes (DE MORAIS., 2009). Seguindo esta linha, observa-se que  $\alpha$ -ylangeno foi produzido somente na época da seca.

Diante disto, o estudo do óleo essencial de *P. myrtilloides* demonstrou que houve variação dos componentes na época da chuva e seca, como também apresentaram variação da área percentual relativa dos seus picos mostrados nos cromatogramas. Os compostos majoritários deste estudo foram determinados cuja representação da área foi maior que 8% (STEFANELLO et al., 2010). Os sesquiterpenos foram a classe mais

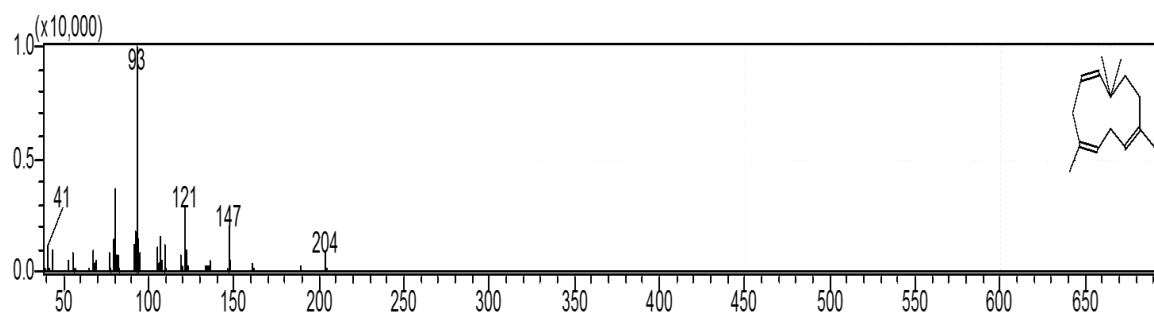
representada, tanto os hidrocarbonados quanto os oxigenados. Os espectros de massas destes compostos estão representados nas Figuras 3, 4, 5 e 6.



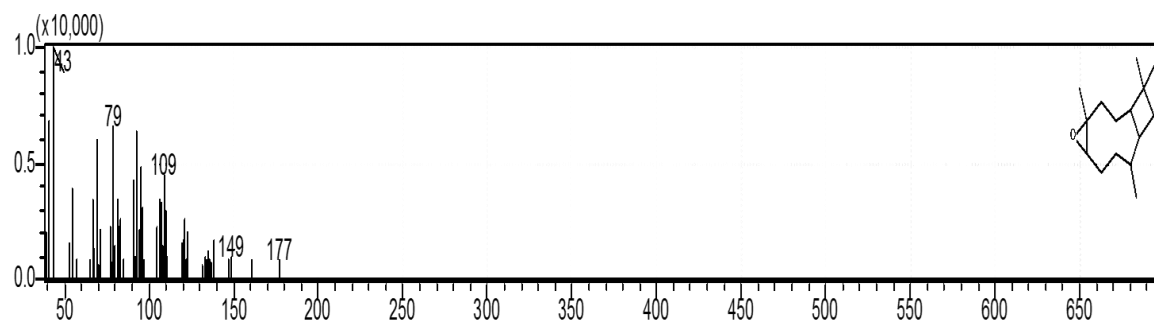
**Figura 3** – Espectro de massas do  $\alpha$ -ylangeno. Abundâncias relativas para os íons  $m/z$  característicos do  $\alpha$ -ylangeno.



**Figura 4** – Espectro de massas do *trans*- $\beta$ -cariofileno. Abundâncias relativas para os íons  $m/z$  característicos do *trans*- $\beta$ -cariofileno.



**Figura 5** – Espectro de massas do *cis*-Prenil-limoneno. Abundâncias relativas para os íons  $m/z$  característicos do *cis*-Prenil-limoneno.



**Figura 6** – Espectro de massas do óxido de cariofileno. Abundâncias relativas para os íons  $m/z$  característicos do óxido de cariofileno.

Outros compostos representativos em relação à porcentagem nas amostras foram o  $\alpha$ -copaeno,  $\beta$ -bisaboleno,  $\delta$ -amorphenol, 7-*epi*- $\alpha$ -selineno, globulol, *epi*- $\alpha$ -bisabolol (Tabela 2).

Vários trabalhos relatam atividades biológicas do gênero *Psidium*, dentre elas o efeito antifúngico (CAMACHO-HERNÁNDEZ et al., 2004; LAPENNA et al., 2003; SUWANMANEE et al., 2014; WEN et al., 2011).

Os compostos encontrados no óleo essencial de *Psidium myrtooides* como o linalol,  $\alpha$ -pineno,  $\alpha$ -terpineol,  $\delta$ -cadineno, óxido de cariofileno,  $\beta$ -cariofileno, espatulenol, limoneno e o *trans*-nerolidol são relatados na literatura com potencial antifúngico (POLICEGOUDRA et al., 2012; NGAMPRASERTSITH et al., 2018; DEUS et al., 2011; RAHMAN et al., 2011; Teixeira et al., 2012).

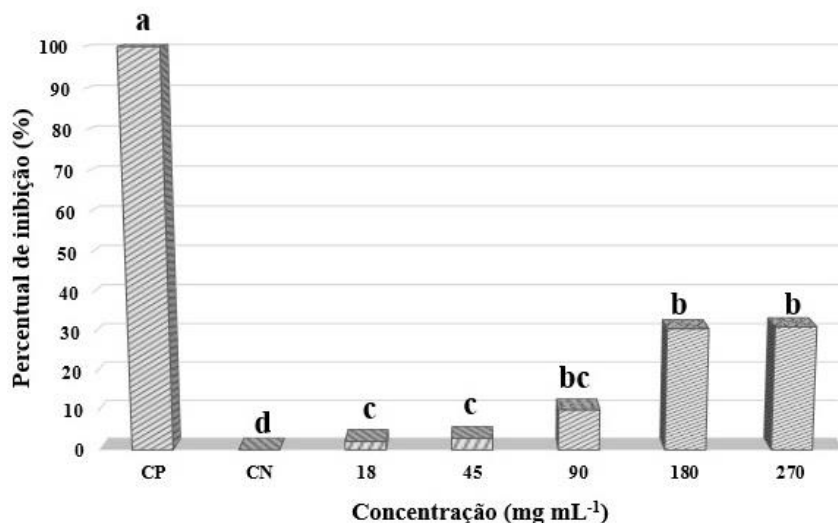
### 4.3.2 Atividade antifúngica

Seguindo com os estudos da atividade biológica do óleo essencial de *Psidium myrtooides* O. Berg, a qual apresentou resultados promissores em relação a atividade antimicrobiana e antiproliferativa. O potencial antifúngico também foi avaliado pela primeira vez frente a *Sclerotinia sclerotiorum* e *Colletotrichum gloeosporioides*.

#### 4.3.2.1 *Sclerotinia sclerotiorum*

Todas as concentrações do óleo essencial inibiram o crescimento micelial do fungo *S. Sclerotiorum* (Figura 7). As concentrações de 270 (PIC: 31,4%) e 180 mg mL<sup>-1</sup> (PIC: 31,0%) não diferiram estatisticamente com a concentração de 90 mg mL<sup>-1</sup> (PIC: 10%), assim como esta também não diferiu das concentrações menores de 45 (PIC: 3,0%) e 18 mg mL<sup>-1</sup> (PIC: 2,2%). Porém, percebeu-se que as concentrações maiores de 270 e 180mg.mL<sup>-1</sup> diferiram significativamente das concentrações de 45 e 18 mg mL<sup>-1</sup> de OE.

Neste ensaio todos os resultados de PIC foram comparados com o controle positivo, fungicida Frowncide 500 SC, com concentração de 0,01 mg mL<sup>-1</sup>, que apresentou inibição micelial de 100%.



**Figura 7** - Percentual de inibição micelial do óleo essencial de folhas *in natura* de *Psidium myrtooides* sobre o fungo *Sclerotinia sclerotiorum*. CP: Controle positivo-frownicide 500 SC; CN: Ausência do óleo essencial + água destilada estéril; \*Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Outros trabalhos com óleo essencial de espécies pertencentes a família Myrtaceae relataram também atividade parcial ou completa contra *Sclerotinia sclerotiorum*. DAVARI et al. (2017) avaliaram o potencial fungicida do óleo essencial de *Eucalyptus sp.*, neste estudo houve variação da inibição em relação as concentrações, sendo que na maior concentração (1500  $\mu\text{L mL}^{-1}$ ) o OE inibiu 100% e nas concentrações mais baixas (75, 150, 300 e 600  $\mu\text{L mL}^{-1}$ ) não houve inibição do fungo fitopatogênico.

Da mesma forma, DIÁNEZ et al. (2018) descreveram atividade do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* e *Eucalyptus globulus*, no qual houve inibição em todas as concentrações testadas 5, 10, 15, 20 e 30%, esta última apresentou a maior atividade frente a *S. sclerotiorum*, com 84 % de inibição. Foram testados em outros fungos também como *Fusarium oxysporum*, *Pythium aphanidermatum*, *Alternaria brassicae* e *Phytophthora parasitica*, neste detectou-se 100% de inibição micelial.

Este estudo mostra que atividade do óleo essencial de *P. myrtooides* foi dependente da concentração. O fungo testado apresentou sensibilidade maior nas concentrações mais elevadas do OE. A variação dos resultados do experimento e da literatura está relacionado a natureza volátil e hidrofóbica dos óleos (LANG e BUCHBAUER., 2012). ULTEE et al. (2000) e LAMBERT et al. (2001) acreditam que a natureza lipofílica dos OEs facilita a penetração na membrana fúngica constituída de uma bicamada lipídica, causando assim a ruptura da mesma.

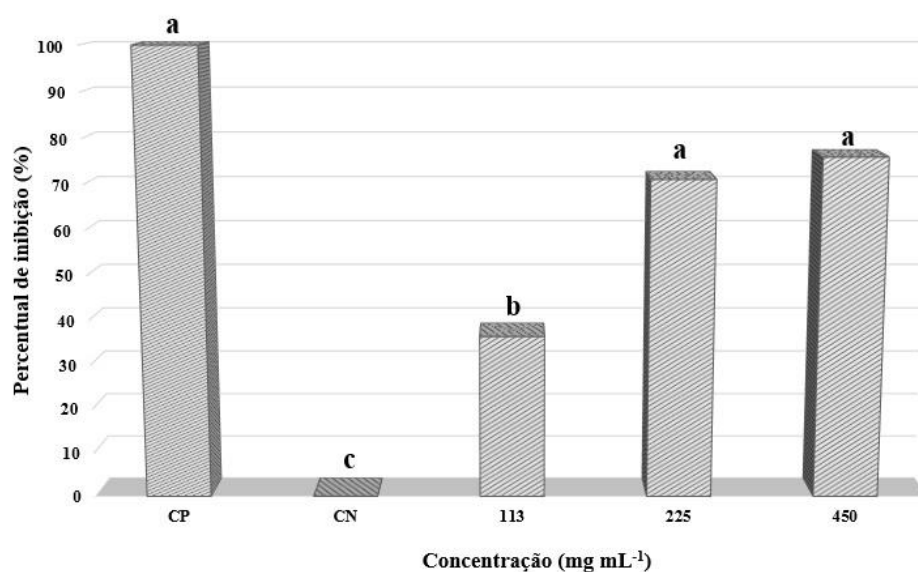
Embora o custo e a eficácia da aplicação do óleo em estudo devam ser levados em consideração, este estudo justifica pesquisas adicionais sobre o uso de óleos essenciais no controle de fitopatógenos.

#### 4.3.2.2 *Colletotrichum gloeosporioides*

Neste ensaio o percentual de inibição de crescimento micelial foi avaliado frente ao *C. gloeosporioides* através das diluições do OE obtidas em série de acordo com o método descrito por ALIGIANNIS et al. (2001) e LIMA et al. (2006).

Os resultados do teste (Figura 8) demonstraram que o óleo essencial de *P. myrtoides* foi eficaz na inibição do *Colletotrichum gloeosporioides*. Nas concentrações de 450 e 225 mg mL<sup>-1</sup> obteve-se inibição micelial de 75,9% e 71,1%, estas não diferiram estatisticamente entre si, já a concentração menor de 113 mg mL<sup>-1</sup> (36,4%) de OE, diferiu estatisticamente das demais, resultando em menor inibição.

Assim como no ensaio antifúngico frente a *S. sclerotiorum*, todas as concentrações de OE utilizadas neste ensaio frente ao *C. gloeosporioides* apresentaram PIC.



**Figura 8** - Percentual de inibição micelial do óleo essencial de folhas *in natura* de *Psidium myrtoides* sobre o fungo *Colletotrichum gloeosporioides*. CP: Controle positivo-frownicide 500 SC; CN: Ausência do óleo essencial + água destilada estéril; \*Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O estudo das médias encontradas pelo teste de Tukey revelou que as concentrações de 225 e 450 mg mL<sup>-1</sup> não diferiram estatisticamente do fungicida comercial Frownicide 500 SC, que foi utilizado como controle positivo (Figura 8).

A literatura descreve atividades biológicas do gênero *Psidium*. O óleo essencial das folhas de *Psidium guajava* e *Psidium cattleianum* exibiram atividade antibacteriana contra *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Neisseria gonorrhoeae*. Apresentou também moderada atividade antifúngica a *Candida albicans* (42,86%), porém ambas espécies foram inativas contra *Aspergillus flavus* (SOLIMAN et al., 2016).

O OE de *Psidium guajava* também está relacionado a propriedades biológicas, como anticonvulsivantes, analgésicos, antidiarreicos, antidiabéticos, hipoglicemiante, antitussígeno e inseticida. Isto se deve a diversidade de compostos bioativos presente (DE SOUZA et al., 2017).

DE OLIVEIRA et al. (2017) atribuiu aos monoterpenos e aos compostos como o limoneno, atividade antifúngica do óleo essencial de *Mentha piperita* L. ( $5 \mu\text{L mL}^{-1}$ ) contra *C. gloesporioides* (PIC: 100%), segundo este trabalho os monoterpenos causam desorganização das estruturas da membrana celular, induzindo alterações físicas e/ou químicas e perturbação das atividades metabólicas fúngicas.

Há na literatura diversos OEs que apresentaram PIC do fitopatógeno em estudo (JÚNIOR et al., 2009, SILVA et al., 2009, ROMERO et al., 2015, SELLAMUTHU et al., 2013b, BILL et al., 2014). Porém, não foram encontrados relatos do potencial antifúngico do OE de *Psidium myrtoides* O. Berg.

Desta forma, a eficácia da aplicação do óleo essencial das folhas deve ser levada em consideração, uma vez que nos últimos anos têm crescido as pesquisas com os OEs, sendo estes, apresentados como método alternativo ou contribuir no desenvolvimento de novos agentes no controle de pragas e doenças na agricultura.

#### 4.4 CONCLUSÃO

O teor do óleo essencial de *Psidium myrtoides* O. Berg não revelou diferença em função da sazonalidade, porém houve variação sobre os constituintes químicos presentes na amostra da época chuvosa e seca. Todos os compostos majoritários e minoritários apresentaram variação da área percentual relativa dos seus picos, assim como também houve a obtenção de compostos somente em uma época do ano. Os compostos majoritários obtidos em ambas estações sazonais foram o *trans*- $\beta$ -cariofileno (20,0-32,9%), *cis*-prenil-limoneno (12,4 - 17,8%) e óxido de cariofileno (12,0-0,7%), sendo que o  $\alpha$ -ylangeno (8,4%) foi produzido somente na época da seca. O OE-PM demonstrou

potencial antifúngico contra *Sclerotinia sclerotiorum* e *Colletotrichum gloesporioides* em todas as concentrações utilizadas. Portanto, o óleo essencial de *P. myrtoides* é uma fonte promissora de novos agentes antifúngicos naturais, sendo que estes variam em decorrência da variação sazonal.

#### 4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R. P. Identification of essential oil components by Gas Chromatography/ Mass Spectroscopy. Illinois: Allured Publishing Corporation, 2007. 468p.

ALIGIANNIS, N.; et al. Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils of Two *Origanum* Species. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 49, n. 9, p. 4168-4170, 2001.

BEZERRA, C. F.; et al. Analysis by UPLC-MS-QTOF and antifungal activity of guava (*Psidium guajava* L.). **Food and Chemical Toxicology**, p. 122-132, 2018.

BILL, M.; et al. The efficacy of combined application of edible coatings and thyme oil in inducing resistance components in avocado (*Persea americana* Mill.) against anthracnose during post-harvest storage. **Crop Protection**, v. 64, p. 159-167, 2014.

BOLTON, M. D.; et al. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. **Molecular plant pathology**, v. 7, n. 1, p. 1-16, 2006.

CAMACHO-HERNÁNDEZ, I. L.; et al. Antifungal activity of fruit pulp extract from *Psidium sartorianum*. **Fitoterapia**, v. 75, n. 3-4, p. 401-404, 2004.

DA SILVA, V. P.; et al. Chemical composition and *in vitro* leishmanicidal, antibacterial and cytotoxic activities of essential oils of the Myrtaceae family occurring in the Cerrado biome. **Industrial Crops and Products**, v. 123, p. 638-645, 2018.

DAVARI, M.; EZAZI, R. Chemical composition and antifungal activity of the essential oil of *Zhumeria majdae*, *Heracleum persicum* and *Eucalyptus sp.* against some important phytopathogenic fungi. **Journal de mycologie medicale**, v. 27, n. 4, p. 463-468, 2017.

DE ALENCAR FILHO, J. M.; et al. Chemical composition and antibacterial activity of essential oil from leaves of *Croton heliotropifolius* in different seasons of the year. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 27, v. 4, p. 440-444, 2017.

DE ALMEIDA, L. F. R.; et al. Non-oxygenated sesquiterpenes in the essential oil of *Copaifera langsdorffii* Desf. increase during the day in the dry season. **PloS one**, v. 11, n. 2, p. e0149332, 2016.

DE MORAIS, L. A. S. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura Brasileira**, v. 27, p. S3299-S3302, 2009.



DE OLIVEIRA, K. Á. R.; et al. Synergistic mixtures of chitosan and *Mentha piperita* L. essential oil to inhibit *Colletotrichum* species and anthracnose development in mango cultivar Tommy Atkins. **Food microbiology**, v. 66, p. 96-103, 2017.

DE SOUZA, T. D. S.; et al. Essential oil of *Psidium guajava*: Influence of genotypes and environment. **Scientia horticulturae**, v. 216, p. 38-44, 2017.

DEUS, R. J. A.; et al. Avaliação do efeito antifúngico do óleo resina e do óleo essencial de copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 1, p. 1-7, 2011.

DIÁNEZ, F.; et al. Screening of antifungal activity of 12 essential oils against eight pathogenic fungi of vegetables and mushroom. **Letters in applied microbiology**, v. 67, n. 4, p. 400-410, 2018.

FENG, G.; et al. Fungicidal activities of camptothecin semisynthetic derivatives against *Colletotrichum gloeosporioides* *in vitro* and in mango fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 147, p. 139-147, 2019.

GARCIA, R.A. et al. Atividade antifúngica de óleo e extratos vegetais sobre *Sclerotinia sclerotiorum*. **Bioscience Journal**, v.28, p.48-57, 2012.

GASPARETTO, A.; et al. Seasonal variation in the chemical composition, antimicrobial and mutagenic potential of essential oils from *Piper cernuum*. **Industrial crops and products**, v. 95, p. 256-263, 2017.

HU, X.; et al. *Bacillus megaterium* A6 suppresses *Sclerotinia sclerotiorum* on oilseed rape in the field and promotes oilseed rape growth. **Crop protection**, v. 52, p. 151-158, 2013.

HUSSAIN, A. I.; et al. Seasonal variation in content, chemical composition and antimicrobial and cytotoxic activities of essential oils from four *Mentha* species. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90, n. 11, p. 1827-1836, 2010.

Instituto Nacional De Meteorologia (INMET). Disponível em: <[www.inmet.gov.br](http://www.inmet.gov.br)> Acesso em 10 dez de 2018.

JACOB, R. G. Óleos Essenciais como matéria-prima sustentável para o preparo de produtos com maior valor agregado. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 1, 2016.

JEMÂA, J. M. B.; et al. Seasonal variations in chemical composition and fumigant activity of five *Eucalyptus* essential oils against three moth pests of stored dates in Tunisia. **Journal of Stored Products Research**, v. 48, p. 61-67, 2012.

JÚNIOR, I.T.S. et al. Efeito fungitóxico de óleos essenciais sobre *Colletotrichum gloeosporioides*, isolado do maracujazeiro amarelo. **Biotemas**, v. 22, n. 3, p. 77-83, 2009.

KOPPEN W.; GEIGER, R. (eds). Handbuck der Klimatologie: Berlin, 1961.

LAMBERT, R. J. W.; et al. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of applied microbiology**, v. 91, n. 3, p. 453–462, 2001.

LANG, G.; BUCHBAUER, G. A review on recent research results (2008–2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. A review. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 27, n. 1, p. 13-39, 2012.

LAPENNA, E. A.; et al. Actividad bactericida y fungicida de algunas plantas utilizadas en la medicina tradicional venezolana. **Revista del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel**, v. 34, n.1, p. 6-9, 2003.

LIMA I. O.; et al. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 16, n. 2, p. 197-201, 2006.

NGAMPRASERTSITH, S.; et al. Caryophyllene oxide extraction from lemon basil (*Ocimum citriodorum* Vis.) straw by hydrodistillation and supercritical CO<sub>2</sub>. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 138, p. 1-6, 2018.

OJAGHIAN, M. R.; et al. Inhibitory effect and enzymatic analysis of E-cinnamaldehyde against *sclerotinia* carrot rot. **Pesticide biochemistry and physiology**, v. 127, p. 8-14, 2016.

OLIVEIRA, J.; et al. Antifungal activity of essential oils associated with carboxymethylcellulose against *Colletotrichum acutatum* in strawberries. **Scientia Horticulturae**, v. 243, p. 261-267, 2019.

POLICEGOUDRA, R. S.; et al. Bioactive constituents of *Homalomena aromatica* essential oil and its antifungal activity against dermatophytes and yeasts. **Journal de Mycologie Médicale/Journal of Medical Mycology**, v. 22, n. 1, p. 83-87, 2012.

RAHMAN, A.; et al. Antifungal activity of essential oil and extracts of *Piper chaba* Hunter against phytopathogenic fungi. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 88, n. 4, p. 573-579, 2011.

ROMERO, A. L.; et al. Composição química e atividade do óleo essencial de *Origanum vulgare* sobre fungos fitopatogênicos. **Journal of Health Sciences**, v. 14, n. 4, 2015.

SELLAMUTHU, P. S.; et al. Essential oil vapours suppress the development of anthracnose and enhance defence related and antioxidant enzyme activities in avocado fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 81, p. 66-72, 2013.

SILVA, A.C.; et al. Efeito *in vitro* de compostos de plantas sobre o fungo *Colletotrichum gloeosporioides*: Isolado do maracujazeiro. **Ciência e Agrotecnologia**, v.33, n. esp, p.1853-60, 2009.

SOLIMAN, F. M.; et al. Comparative study of the volatile oil content and antimicrobial activity of *Psidium guajava* L. and *Psidium cattleianum* Sabine leaves. **Bulletin of Faculty of Pharmacy**, v. 54, n. 2, p. 219-225, 2016.

STEFANELLO, M. E. A.; et al. Composição e variação sazonal do óleo essencial de *Myrcia obtecta* (O. Berg) Kiaersk. var. *obtecta*, Myrtaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 1, p. 82-86, 2010.

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

TEIXEIRA, M. L.; et al. Citrumelo Swingle: Caracterização química, atividade antioxidante e antifúngica dos óleos essenciais das cascas frescas e secas. **Magistra**, v. 24, p. 194-203, 2012.

ULTEE, A.; et al. Antimicrobial activity of carvacrol toward *Bacillus cereus* on rice. **Journal of food protection**, v. 63, n. 5, p. 620-624, 2000.

WEN, L.; et al. Actividad antifúngica de cuatro plantas usadas en la medicina tradicional peruana: aislamiento de 3'-formil-2', 4', 6'-trihidroxidihidrochalcona, principio activo de *Psidium acutangulum*. **Revista de la Sociedad Química del Perú**, v. 77, n. 3, p. 199-204, 2011.

## 5. CAPÍTULO III

(Normas de acordo com a revista *Records of Natural Products*)

### **INFLUÊNCIA DA IDADE, HABITAT E TÉCNICA DE EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Psidium myrtoides* O. Berg**

**RESUMO** – A composição dos óleos essenciais pode sofrer variação química devido a fatores externos e internos, bem como a técnica de extração aplicada na amostra. O objetivo deste trabalho foi avaliar o teor e a variação química das folhas de jovens, adultas, diferente localidade e uma técnica combinada com a hidrodestilação, visando uma extração de melhor rendimento, qualidade e maior número de compostos de interesse biológico do óleo essencial de *Psidium myrtoides* O. Berg. As folhas foram coletadas e submetidas a hidrodestilação em aparelho de Clevenger pelo período de 3 horas, exceto a amostra (3) que teve a hidrodestilação combinada com banho ultrassônico em menor tempo de extração. Após a extração, o óleo essencial foi analisado por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM). O teor de óleo essencial das folhas jovens foi o maior em comparação as outras amostras analisadas, 0,53%. Sendo que a amostra submetida ao banho ultrassônico e hidrodestilação obteve-se o maior o número de compostos, 38 no total. Os compostos majoritários deste estudo foram o eugenol,  $\alpha$ -ylangeno, *trans*- $\beta$ -cariofileno e isobazzanene. O eugenol não foi apresentado em nenhum dos estudos anteriores relacionados ao óleo essencial de *Psidium myrtoides* O. Berg. Este estudo contribui para melhor seleção dos compostos de interesse, já que os mesmos sofrem variação química e conseqüentemente podem influenciar na eficácia da atividade biológica deste óleo.

**PALAVRAS-CHAVES:** *Psidium myrtoides*; óleo essencial; variação química; eugenol.

## INFLUENCE OF AGE, HABITAT AND EXTRACTION TECHNIQUE OF *Psidium myrtoides* O. Berg ESSENTIAL OIL

**ABSTRACT** - The essential oils composition can suffer chemical variation due to external and internal factors, as well as the technique of extraction applied in the sample. The objective of this work was to evaluate the content and chemical variation of leaves of young adults, different locality and a technique combined with hydrodistillation, aiming an extraction of better yield, quality and higher number of biological interest compounds from *Psidium myrtoides* O. Berg essential oil. The leaves were collected and submitted to hydrodistillation in a Clevenger apparatus for a period of 3 hours, except the sample (3), which had hydrodistillation combined with an ultrasonic bath in a shorter extraction time. After extraction, the essential oil was analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). The essential oil content of young leaves was the highest compared to the other samples analyzed, 0.53%. Since the sample submitted to the ultrasonic bath and hydrodistillation, the largest number of compounds was obtained, 38 in total. The major compounds of this study were eugenol,  $\alpha$ -ylangene, *trans*- $\beta$ -caryophyllene and isobazzanene. Eugenol has not been reported in any of the previous studies related to *Psidium myrtoides* O. Berg essential oil. This study contributes to a better selection of the interest compounds, as they undergo to chemical variation and consequently may influence the efficacy of this oil biological activity.

**KEYWORDS:** *Psidium myrtoides*; essential oil; chemical variation; quality; eugenol.

## 5.1 INTRODUÇÃO

O conhecimento sobre a variação química dos compostos presentes nos óleos essenciais direciona a utilização da planta. Fatores fisiológicos e ambientais, como composição do solo, clima, órgão vegetal, idade, sazonalidade e entre outros, podem afetar a qualidade e quantidade dos óleos essenciais produzidos pelas plantas (De Souza et al., 2017).

Além disto, esses fatores determinam as propriedades biológicas dos constituintes presentes no óleo essencial. Esta bioatividade pode estar relacionada a compostos majoritários específicos ou estar atribuída ao sinergismo de vários compostos da amostra (RAUT E KARUPPAYIL, 2014).

Ao analisar o número baixo de produtos fabricados com base em óleos essenciais mesmo sendo muito eficientes, PAVELA e BENELLI (2016) citam que um dos problemas enfrentados é a falta de qualidade e quantidade. Diante disto, investimentos têm sido realizados recentemente com novas tecnologias, visando à eficiência, qualidade, redução no tempo de extração e um maior rendimento.

Portanto, considerando que os estudos com a espécie *Psidium myrtoides* O. Berg apresentou em estudos anteriores propriedades biológicas promissoras, este trabalho teve como objetivo avaliar o teor e a variação química das folhas jovens, adultas de diferentes localidades e uma técnica de extração combinada com a hidrodestilação, visando um melhor rendimento, qualidade e maior número de compostos de interesse biológico.

## 5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.2.1 Material vegetal e extração do óleo essencial

As folhas de *Psidium myrtoides* O. Berg foram coletadas nos meses conforme a Tabela 1, entre o horário das 07 e 08 horas. A espécie foi identificada pelos botânicos Luzia Francisca e Marcos Sobral. A exsicata sob o registro HJ998 foi depositado no

herbário Jataiense Professor Germano Guarim Neto e outro exemplar (10041) foi depositado no herbário do Instituto Federal Goiano – campus Rio Verde.

**TABELA 1** – Informações sobre o local e mês de coleta das amostras de *Psidium myrtoides* O. Berg.

Amostras	Mês da coleta	Local da coleta	Coordenadas geográficas
1	Março/18	Instituto Federal goiano - campus Rio Verde	Latitude 16° 06' Longitude oeste 51° 17'
2			
3	Maio/18	Universidade de Rio Verde	Latitude (S) 17° 48' Longitude 50° 55'
4			

(1) Folhas jovens; (2) Folhas adultas; (3) Folhas submetidas a banho ultrassônico; (4) Folhas coletadas na Unirv.

As amostras 1 (folhas jovens) e 2 (folhas adultas) foram coletadas conforme proposto por LI et al. (2013), as folhas mais próximas do ápice representa características mais juvenis e as demais são caracterizadas como adultas.

O óleo essencial (OE) das amostras 1,2 e 4 foi obtido através de hidrodestilação pelo período de 3 horas em aparelho de Clevenger. A amostra 3 foi submetida ao banho ultrassônico por 40 minutos, após este período a amostra também foi submetida a hidrodestilação com duração de 1 hora de extração. Foram utilizadas 100 g em triplicata para cada amostra.

Após a hidrodestilação, o OE foi extraído da fase aquosa com diclorometano, 30 ml com três repetições, em seguida foi adicionado sulfato de sódio anidro PA (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). O solvente foi removido por evaporação a temperatura ambiente. Os óleos essenciais das amostras foram armazenados a -4 °C até o momento da análise química dos compostos.

### 5.2.2 Teor do óleo essencial

O rendimento do óleo essencial das amostras 1, 2, 3 e 4 foi calculado através da fórmula  $T\% = \text{Massa do óleo (g)} / \text{massa das folhas (in natura)} * 100$ . Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, utilizando o Teste F, e as médias comparadas a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Para as análises estatísticas dos dados empregou-se o software estatístico SISVAR versão 5.6.



### 5.2.3 Composição química do óleo essencial de *Psidium myrtooides* O. Berg

As análises da composição química do óleo essencial das amostras 1, 2, 3 e 4 de *P. myrtooides* foram realizadas por cromatografia a gás acoplado ao espectrômetro de massas sequencial (CG-EM), equipado com injetor automático CombiPAL (AOC-5000, Shimadzu), uma coluna Restek Rtx-5ms (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm) foi utilizada com as seguintes características operacionais: temperatura inicial foi mantida a 60 °C por 3,0 min, seguido de um acréscimo de 3 °C/min até atingir 200 °C e posteriormente foi programada para um aumento de temperatura de 15°C/min até 280°C, permanecendo nessa temperatura por mais 1,0 min. As análises foram realizadas utilizando o gás (He) como carreador.

A identificação dos componentes foi realizada por comparação dos seus índices de retenção (IR) utilizando uma solução padrão de *n*-alcanos (C<sub>8</sub>-C<sub>31</sub>) e por comparação dos espectros de massas do banco de dados da biblioteca do NIST/EPA/NHI e de literatura (ADAMS, 2007).

## 5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados obtidos revelaram que amostra 1 (folhas jovens) de *Psidium myrtooides* apresentou o maior teor do óleo essencial, 0,53% (Tabela 2) e apresentou diferença significativa em relação as demais amostras estudadas, inclusive comparada as folhas adultas com 0,39% de OE. Segundo LI et al. (2016) a qualidade e o rendimento do óleo essencial são influenciados pelo habitat, idade da planta, folhas jovens, folhas maduras, sendo assim importante a investigação desta variação para utilização racional do material vegetal.

**TABELA 2** – Valores médios do teor de óleo essencial (%) de *Psidium myrtooides*

Amostras	Teor de óleo essencial (%)
1	0,53 a
2	0,39 b
3	0,32 b
4	0,30 b

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P > 0,05$ ). (1) Folhas jovens; (2) Folhas adultas; (3) Folhas submetidas a banho ultrassônico; (4) Folhas coletadas na Unirv.

A composição química do OE de *Psidium myrtooides* variou qualitativamente e quantitativamente (Tabela 3). Em estudos anteriores o  $\alpha$ -copaeno, *trans*- $\beta$ -cariofileno,  $\alpha$ -humuleno, óxido de cariofileno,  $\alpha$ -bisabolol,  $\alpha$ -ylangeno e *cis*-prenil-limoneno foram considerados compostos majoritários. Neste estudo os compostos majoritários que se relacionam com a composição observada anteriormente, foram o *trans*- $\beta$ -cariofileno e o  $\alpha$ -ylangeno, este não foi observado na amostra 4 (folhas da UNIRV).

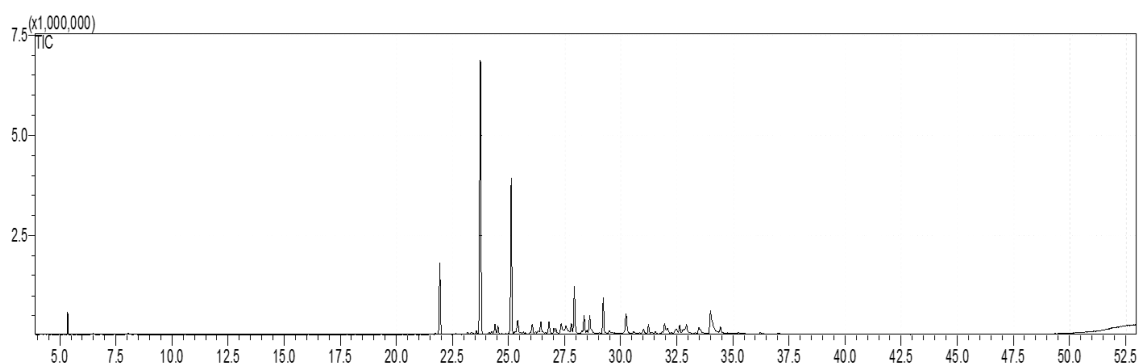
**TABELA 3** – Composição química das folhas de *P. myrtooides* submetidas as diferentes coletas e método de extração.

Compostos	IR <sub>exp</sub>	IR <sub>lit</sub>	%AR			
			1	2	3	4
triciclono	921	921	1,5	0,8	0,7	1,7
sabineno	963	969	-	-	0,1	0,1
limoneno	1017	1024	0,1	-	0,1	-
<b>eugenol</b>	1362	1362	-	-	-	<b>8,7</b>
<b><math>\alpha</math>-ylangeno</b>	1363	1373	<b>8,4</b>	<b>10</b>	<b>8,8</b>	-
sibireno	1396	1400	0,2	-	-	-
$\alpha$ -funebreno	1401	1402	0,4	0,4	0,2	0,4
$\alpha$ -cedreno	1402	1410	-	-	0,3	-
$\beta$ -ylangeno	1415	1419	-	-	-	0,2
<b><i>trans</i>-<math>\beta</math>-cariofileno</b>	1418	1417	<b>34,9</b>	<b>34,9</b>	<b>32</b>	<b>28,1</b>
<i>trans</i> - $\alpha$ -bergamoteno	1422	1432	1,1	1,2	0,9	1,2
$\beta$ -gurjuneno	1425	1431	0,9	1,2	1	-
<b>isobazzanene</b>	1440	1436	<b>18,9</b>	<b>16,8</b>	<b>16,1</b>	<b>22,3</b>
<i>epi</i> - $\beta$ -santaleno	1447	1445	1,5	1,7	1,4	2
$\alpha$ -humuleno	1451	1452	-	-	0,1	0,1
$\alpha$ -acoradieno	1453	1464	-	-	0,2	-
amorpha-4,11-dieno	1456	1449	-	-	0,1	-
allo-aromadendreno	1463	1460	1,2	1,3	1,2	1,4
4,5-di- <i>epi</i> -aristolocheno	1473	1471	1,1	1,4	1,3	2,1
$\gamma$ -gurjuneno	1481	1475	1,4	1,5	1,5	1,9
$\alpha$ -amorpheno	1487	1483	0,4	0,5	0,5	0,6
$\beta$ -selineno	1489	1489	-	-	0,3	-
$\beta$ -bisaboleno	1496	1505	1,1	0,9	1	0,5
$\gamma$ -amorpheno	1500	1495	0,4	0,6	0,5	0,7
viridifloreno	1506	1496	1	0,8	0,8	1,3
$\beta$ -himachaleno	1510	1500	5,5	4,9	4,5	6
$\beta$ -Bazzaneno	1518	1519	-	-	0,2	-
$\delta$ -amorpheno	1521	1511	2	1,8	1,4	2,2
$\delta$ -cadineno	1524	1522	0,2	-	-	0,2
7- <i>epi</i> - $\alpha$ -selineno	1525	1520	-	-	0,1	-

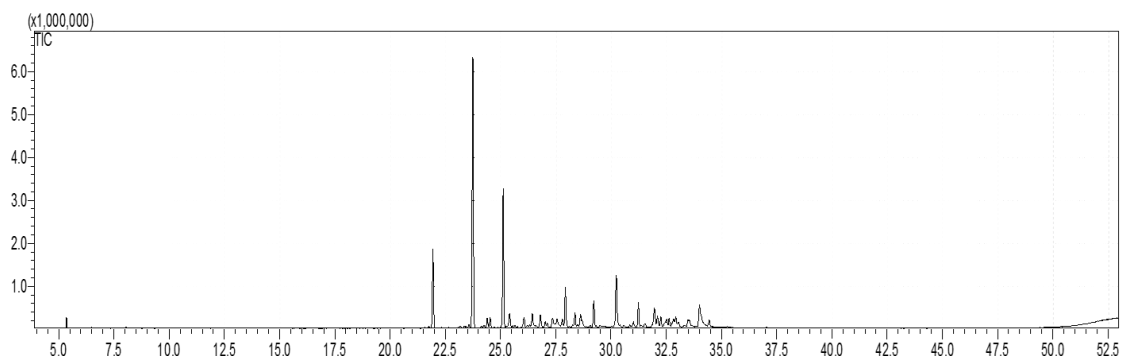
<i>trans</i> -cadin-1,4-dieno	1528	1533	1,8	1,1	2,1	1,8
dauca-4(11),8-dieno	1539	1530	-	-	0,2	0,2
selina-3,7(11)-dieno	1543	1545	4,4	2,5	3	-
<i>trans</i> -nerolidol	1564	1561	-	-	0,1	-
espatulenol	1570	1577	3,2	6	6,1	3,5
óxido de cariofileno	1586	1582	0,1	-	2,9	0,1
globulol	1590	1590	0,6	2,9	0,6	0,6
junenol	1615	1618	1	2	2,2	1,4
10-epi- $\gamma$ -eudesmol	1619	1622	-	0,7	1	0,5
<i>cis</i> -cadin-4-en-7-ol	1633	1635	0,9	0,7	0,7	1,1
$\beta$ -acorenol	1637	1636	-	-	0,1	-
hinesol	1641	1640	0,7	0,6	0,6	0,7
$\alpha$ -bisabolol	1683	1685	-	-	-	1,2
Monoterpenos hidrocarbonados			1,6	0,8	0,9	1,8
Monoterpenos oxigenados			-	-	-	-
Sesquiterpenos hidrocarbonados			86,8	83,5	79,7	73,2
Sesquiterpenos oxigenados			6,5	12,9	14,3	9,1
Compostos fenólicos			-	-	-	8,7
Total			94,9	97,2	94,9	92,8

**IR<sub>exp</sub>**: Índice de retenção determinado em relação aos *n*-alcanos (C<sub>8</sub>-C<sub>20</sub>) utilizando coluna capilar OPTIMA-5 (30m x 0.25mm; 0.250 $\mu$ m); **IR<sub>lit</sub>**: Índice de retenção da literatura (Adams, 2007); **AR%**: Área relativa.

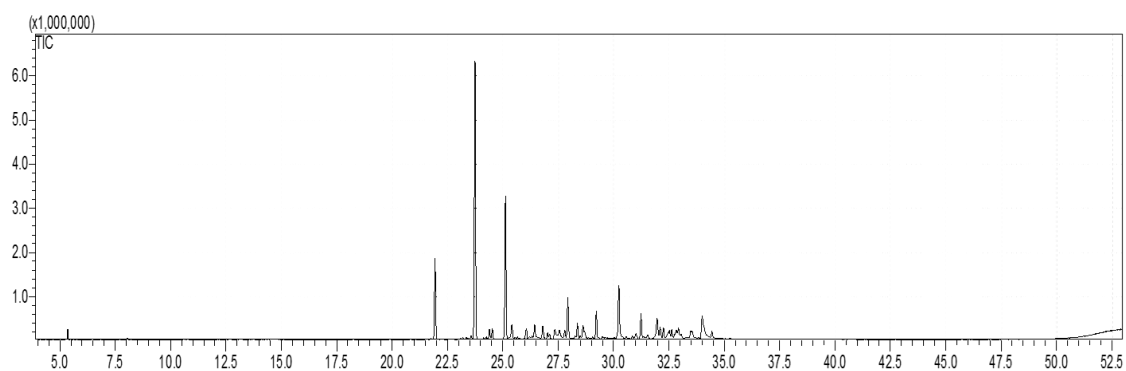
Os cromatogramas que evidenciam a composição química do óleo essencial das folhas jovens (1), folhas adultas (2), folhas submetidas ao banho ultrassônico (3), folhas coletadas na UNIV (4) estão demonstrados na Figura 1, 2, 3 e 4, respectivamente.



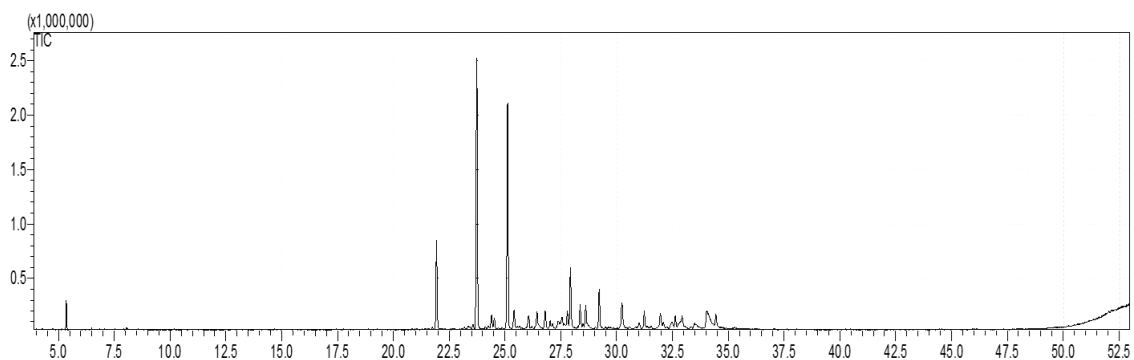
**Figura 1** – Cromatograma do óleo essencial extraído das folhas jovens de *Psidium myrtiloides* O. Berg



**Figura 2** - Cromatograma do óleo essencial extraído das folhas adultas de *Psidium myrtiloides* O. Berg

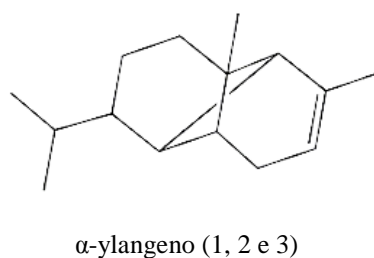
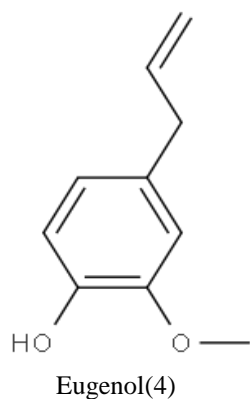


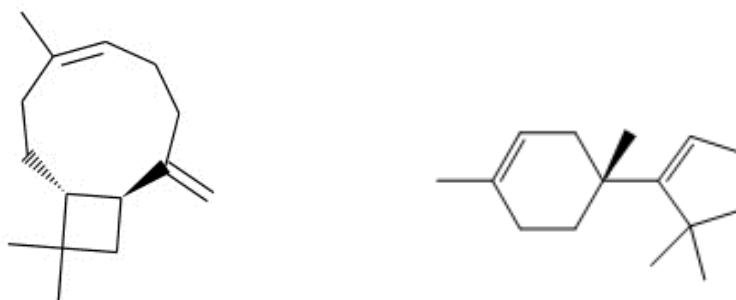
**Figura 3** - Cromatograma do óleo essencial extraído das folhas de *Psidium myrtiloides* O. Berg utilizando o banho ultrassônico combinado com a hidroddestilação



**Figura 4** - Cromatograma do óleo essencial extraído das folhas de *Psidium myrtiloides* O. Berg coletadas na UNIRV

As estruturas químicas dos principais componentes identificados nos óleos essenciais das amostras 1, 2, 3 e 4 estão ilustrados na Figura 5.





*Trans-β-cariofileno* (1, 2, 3 e 4)

*Isobazzanene* (1, 2, 3 e 4)

**Figura 5** – Estrutura química dos compostos majoritários presentes nas amostras (1) Folhas jovens, (2) Folhas adultas, (3) Folhas submetidas a banho ultrassônico, (4) Folhas UNIRV

O isobazzanene e o eugenol também foram considerados compostos majoritários. O eugenol foi detectado somente na amostra 4 com área relativa de 8,7%. A amostra 3 que utilizou o banho ultrassônico combinado com a hidrodestilação por um período de 1 hora obteve o maior número de compostos identificados neste trabalho, 38 no total. Apesar de não ter obtido o maior teor de OE, esta técnica diminuiu o tempo de hidrodestilação, conseqüentemente o consumo de energia e garantiu que o OE não sofresse reações de oxidação e hidrólise. Estas reações podem ocorrer com o óleo essencial ao ser exposto a longos períodos com altas temperaturas, conforme relatado por El ASBAHANI et al. (2015).

Atividade antifúngica, antioxidante, antimicrobiana e outras atividades biológicas podem variar em relação a variação da composição química sofrida pela espécie (EBRAHIMI et al., 2008). Os sesquiterpenos hidrocarbonados e sesquiterpenos oxigenados foram os mais representativos em todas as amostras. Os monoterpenos hidrocarbonados apresentaram menor quantidade, já os monoterpenos oxigenados não foram observados.

SOUSA et al. (2015) atribuiu a alta atividade contra bactérias gram-negativas anaeróbicas (*Prevotella nigrescens* e *Porphyromonas gingivalis*) aos sesquiterpenos hidrocarbonados, observou-se também que os compostos pertencentes aos sesquiterpenos oxigenados são promissores como agentes antimicrobianos. KHORSHIDIAN et al.

(2018) enfatizam que vários óleos essenciais podem ser utilizados como agentes antimicrobianos naturais. A maior atividade antimicrobiana é atribuída aos compostos fenólicos, dentre eles o Eugenol.

O Eugenol não foi encontrado nas amostras estudadas anteriormente de *Psidium myrtoides* O. Berg, somente na amostra 4. Ele é muito utilizado em produtos farmacêuticos, cosméticos, alimentos e embalagens ativas com propriedades antioxidantes (CHATTERJEE E BHATTACHARJEE, 2013; GOÑI et al., 2016; GUAN et al., 2016; WORANUCH E YOKSAN, 2013).

Muitos estudos *in vitro* e *in vivo* também relataram sobre o potencial anti-inflamatório, antioxidante, anticancerígeno, antinociceptivo e antidiabético do limoneno, composto pertencente aos monoterpenos hidrocarbonados (Tabela 3) (KUMMER et al., 2013; AHMAD E BEG, 2013; ZHANG et al., 2014; KAIMOTO et al., 2016; PANASKAR et al., 2013).

## 5.4 CONCLUSÃO

Os dados obtidos neste trabalho revelaram que o óleo essencial de *Psidium myrtoides* O. Berg também sofre influência quantitativa e qualitativa em seus compostos em relação à idade, habitat e técnica de extração. As folhas jovens apresentaram o maior teor do óleo essencial de *P. myrtoides*, 0,53%. O eugenol, composto majoritário do óleo essencial obtido das folhas coletadas na Universidade de Rio Verde (amostra 4) não havia sido relatado em nenhum outro trabalho relacionado à espécie em estudo. O *trans*- $\beta$ -cariofileno, isobazzanene e o  $\alpha$ -ylangeno foram identificados como compostos majoritários em todas as amostras, exceto o  $\alpha$ -ylangeno presente somente nas amostras 1, 2 e 3. A técnica combinada com a hidrodestilação foi promissora em relação a quantidade de compostos extraídos, 38 no total, além disso, o tempo de extração e o consumo de energia foram reduzidos em relação as outras amostras trabalhadas, evitando que o OE sofresse oxidação e hidrolisação. Portanto, é necessário avaliar a variação química de *Psidium myrtoides* O. Berg, pois a mesma apresenta diversos compostos relacionados à atividades biológicas. Este estudo contribui para melhor seleção dos compostos de interesse.

## 5.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, S.; BEG, Z. H. Hypolipidemic and antioxidant activities of thymoquinone and limonene in atherogenic suspension fed rats. **Food chemistry**, v. 138, n. 2-3, p. 1116-1124, 2013.

CHATTERJEE, D.; BHATTACHARJEE, P. Comparative evaluation of the antioxidant efficacy of encapsulated and un-encapsulated eugenol-rich clove extracts in soybean oil: shelf-life and frying stability of soybean oil. **Journal of Food Engineering**, v. 117, n. 4, p. 545-550, 2013.

DE SOUZA, T. D. S.; et al. Essential oil of *Psidium guajava*: Influence of genotypes and environment. **Scientia horticultrae**, v. 216, n. 38-44, 2017.

EBRAHIMI, S. N.; et al. Essential oil composition and antibacterial activity of *Thymus caramanicus* at different phenological stages. **Food chemistry**, v. 110, n. 4, p. 927-931, 2008.

EL ASBAHANI, A.; et al. Essential oils: from extraction to encapsulation. **International journal of pharmaceutics**, v. 483, n. 1-2, p. 220-243, 2015.

GOÑI, M. L.; et al. Eugenol-loaded LLDPE films with antioxidant activity by supercritical carbon dioxide impregnation. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 111, p. 28-35, 2016.

GUAN, Y.; et al. Eugenol improves physical and chemical stabilities of nanoemulsions loaded with  $\beta$ -carotene. **Food chemistry**, v. 194, p. 787-796, 2016.

KAIMOTO, T.; et al. Involvement of transient receptor potential A1 channel in algescic and analgesic actions of the organic compound limonene. *European Journal of Pain*, v. 20, n. 7, p. 1155-1165, 2016.

KHORSHIDIAN, N.; et al. Potential application of essential oils as antimicrobial preservatives in cheese. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 45, p. 62-72, 2018.

KUMMER, R.; et al. Evaluation of anti-inflammatory activity of *Citrus latifolia* Tanaka essential oil and limonene in experimental mouse models. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2013.

LI, Y. Q.; et al. Variations in essential oil yields and compositions of *Cinnamomum cassia* leaves at different developmental stages. **Industrial crops and products**, v. 47, p. 92-101, 2013.

LI, Y.; et al. Quality evaluation for essential oil of *Cinnamomum verum* leaves at different growth stages based on GC-MS, FTIR and microscopy. **Food analytical methods**, v. 9, n. 1, p. 202-212, 2016.

PANASKAR, S. N.; et al. A egle marmelos *C orrea* leaf extract prevents secondary complications in streptozotocin-induced diabetic rats and demonstration of limonene as a

potent antiglycating agent. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 65, n. 6, p. 884-894, 2013.

PAVELA, R.; BENELLI, G. Essential oils as ecofriendly biopesticides? Challenges and constraints. **Trends in plant Science**, v. 21, n. 12, p. 1000-1007, 2016.

RAUT, J. S.; KARUPPAYIL, S. M. A status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 62, p. 250-264, 2014.

SOUSA, R. M. F.; et al. Chemical composition, cytotoxic, and antibacterial activity of the essential oil from *Eugenia calycina* Cambess. leaves against oral bacteria. **Industrial Crops and Products**, v. 65, p. 71-78, 2015.

WORANUCH, S.; YOKSAN, R. Eugenol-loaded chitosan nanoparticles: II. Application in bio-based plastics for active packaging. **Carbohydrate polymers**, v. 96, n. 2, p. 586-592, 2013.

ZHANG, X. Z.; et al. Synergistic inhibitory effect of berberine and d-limonene on human gastric carcinoma cell line MGC803. **Journal of medicinal food**, v. 17, n. 9, p. 955-962, 2014.



## 6. CONCLUSÕES GERAIS

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

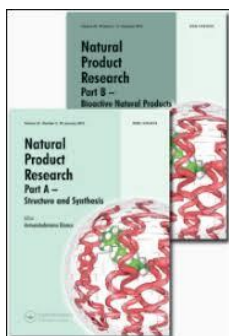
- Os compostos majoritários presentes no óleo essencial das folhas de *Psidium myrtoides* O. Berg foram o *trans*- $\beta$ -cariofileno,  $\alpha$ -humuleno,  $\alpha$ -copaeno, óxido de cariofileno, bisabolol, *cis*-prenil-limoneno,  $\alpha$ -ylangeno, eugenol e isobazzanene;
- O OE-PM apresentou atividade antibacteriana moderada frente à *Streptococcus mitis*, *S. sanguinis*, *S. sobrinus*, *S. salivarius* e uma forte atividade contra *S. mutans*;
- O óleo essencial de *P.myrtoides* exibiu atividade antiproliferativa contra linhagem de células tumorais humanas com os valores de IC<sub>50</sub> significativamente mais baixos do que o obtido para a linha celular normal, demonstrando os valores para as células: Adenocarcinoma de mama humano ( $254,5 \pm 1,6 \mu\text{g ml}^{-1}$ ), Adenocarcinoma cervical humano ( $324,2 \pm 41,4 \mu\text{g/ml}$ ) e Glioblastoma humano ( $289,3 \pm 10,9\mu\text{g ml}^{-1}$ );
- Não houve variação significativa observados pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade nos teores do OE entre a época chuvosa e seca;
- OE-PM apresentou variação dos componentes na época da chuva e seca, bem como a variação da área percentual relativa;
- Foi verificado uma atividade antifúngica promissora frente a *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary e *Colletotrichum gloeosporioides*. Sendo que nas concentrações de 225 e 450 mg ml<sup>-1</sup> sobre o patógeno *C. gloeosporioides*, não houve diferença significativa com o fungicida comercial Frowncide 500 SC;
- O óleo essencial das folhas jovens apresentou diferença significativa no teor em relação as demais amostras do trabalho, 0,53%;

- O eugenol foi encontrado somente na amostra de óleo essencial das folhas coletadas na Universidade de Rio Verde. Este composto apresenta alto valor comercial;
- A técnica do banho ultrassônico combinada com a hidrodestilação, resultou em menor tempo de extração, conseqüentemente menor consumo de energia e evitou que o óleo essencial sofresse oxidação e hidrolisação.

## APÊNDICE

**APÊNDICE A** - O primeiro capítulo da dissertação foi publicado na revista **Natural Product Research**.

A versão original da publicação segue abaixo.



ISSN: 1478-6419 (Print) 1478-6427 (Online) Journal homepage: <http://www.tandfonline.com/loi/gnpl20>

## **Chemical composition and *in vitro* antibacterial and antiproliferative activities of the essential oil from the leaves of *Psidium myrtiloides* O. Berg (Myrtaceae)**

**Alline L. B. Dias, Hellen R. F. Batista, Elisângela B. B. Estevam, Cassia C. F. Alves, Moacir R. Forim, Heloiza D. Nicolella, Ricardo A. Furtado, Denise C. Tavares, Thayna S. Silva, Carlos H. G. Martins & Mayker L. D. Miranda**

To cite this article: Alline L. B. Dias, Hellen R. F. Batista, Elisângela B. B. Estevam, Cassia C. F. Alves, Moacir R. Forim, Heloiza D. Nicolella, Ricardo A. Furtado, Denise C. Tavares, Thayna S. Silva, Carlos H. G. Martins & Mayker L. D. Miranda (2018): Chemical composition and *in vitro* antibacterial and antiproliferative activities of the essential oil from the leaves of *Psidium myrtiloides* O. Berg (Myrtaceae), *Natural Product Research*

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1457664>

 View supplementary material 

 Published online: 03 Apr 2018.

 Submit your article to this journal 

 View related articles 

 View Crossmark data 

SHORT COMMUNICATION

**Chemical composition and *in vitro* antibacterial and antiproliferative activities of the essential oil from the leaves of *Psidium myrtoides* O. Berg (Myrtaceae)**

Alline L. B. Dias<sup>a</sup>, Hellen R. F. Batista<sup>a</sup>, Elisangela B. B. Estevam<sup>a</sup>, Cassia C. F. Alves<sup>a</sup>, Moacir R. Forim<sup>b</sup>, Heloiza D. Nicolella<sup>c</sup>, Ricardo A. Furtado<sup>c</sup>, Denise C. Tavares<sup>c</sup>, Thayna S. Silva<sup>c</sup>, Carlos H. G. Martins<sup>c</sup> and Mayker L. D. Miranda<sup>d</sup>

<sup>a</sup>Instituto Federal de Educacao, Ciencia e Tecnologia Goiano, Rio Verde, Brazil;

<sup>b</sup>Departamento de Quimica, Universidade Federal de Sao Carlos, Sao Carlos, Brazil;

<sup>c</sup>Nucleo de Pesquisas em Ciencias Exatas e Tecnologicas, Universidade de Franca, Franca, Brazil;

<sup>d</sup>Instituto Federal de Educacao, Ciencia e, Tecnologia do Sul de Minas Gerais, Pouso Alegre, Brazil.

**ABSTRACT**

In this study, the chemical composition and antibacterial and antiproliferative potential of the essential oil obtained from fresh leaves of *Psidium myrtoides* (PM-EO) against oral pathogens and human tumour cell lines were investigated for the first time. GC-FID and GCMS analyses showed that *trans*- $\beta$ -caryophyllene (30.9%),  $\alpha$ -humulene, (15.9%),  $\alpha$ -copaene (7.8%), caryophyllene oxide (7.3%) and  $\alpha$ -bisabolol, (5.3%) are the major constituents of PM-EO. The antibacterial activity of PM-EO against a panel of oral pathogens was investigated in terms of their minimal inhibitory concentrations (MIC) using the broth microdilution method. PM-EO displayed moderate activity against *Streptococcus mitis* (MIC = 100  $\mu$ g/mL), *S. sanguinis* (MIC = 100  $\mu$ g/ mL), *S. sobrinus* (MIC = 250  $\mu$ g/mL), and *S. salivarius* (MIC = 250  $\mu$ g/mL), and strong activity against *S. mutans* (MIC = 62.5  $\mu$ g/mL). The antiproliferative activity in normal (GM07492A, lung fibroblasts) and tumour cell lines (MCF-7, HeLa, and M059 J) was performed using the XTT assay. PM-EO showed 50% inhibition of normal cell growth at  $359.8 \pm 6.3$   $\mu$ g/mL. Antiproliferative activity was observed against human tumour cell lines, with IC<sub>50</sub> values significantly lower than that obtained for the normal cell line, demonstrating IC<sub>50</sub> values for MCF-7 cells ( $254.5 \pm 1.6$   $\mu$ g/mL), HeLa cells ( $324.2 \pm 41.4$   $\mu$ g/mL) and M059 J cells ( $289.3 \pm 10.9$   $\mu$ g/mL). Therefore, the cytotoxicity of PM-EO had little influence on the antibacterial effect, since it showed antibacterial activity at lower concentrations. Our results suggest that PM-EO is a promising source of new antibacterial and antitumour agents.

ARTICLE HISTORY

Received 15  
December 2017  
Accepted 18 March  
2018

KEYWORDS

*Psidium myrtoides*;  
essential  
oil; *trans*- $\beta$ -  
caryophyllene;  
oral pathogens;  
antiproliferative  
activity

**CONTACT** Mayker L. D. Miranda mayker/ E-mail: [miranda@ifsuldeminas.edu.br](mailto:miranda@ifsuldeminas.edu.br)

The supplemental data for this article can be accessed at  
<https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1457664>.

A. L. B. DIAS ET AL.



## 1. Introduction

Essential oils from different plant sources exhibit several biological activities such as antiprotozoal, antioxidant, antifungal, antimutagenic, anti-inflammatory, anticancer and antibacterial properties (Raut and Karuppaiyl 2014). Dental caries is a major public health problem that affects many countries around the world. Acidogenic and aciduric bacteria that can form colonies in an organized biofilm cause dental plaque (Crevelin et al. 2015). The most efficient procedure for preventing dental caries is biofilm removal by brushing and flossing (Melo et al. 2017). Currently, cancer treatment is considered one of the most challenging problems in medicine and several experimental and epidemiological studies have shown that the use of some plants may promote chemopreventive and/or antineoplastic action (Mangal et al. 2013). In this scenario, some essential oils extracted from different plants have promising antitumour potential, both *in vitro* and *in vivo* (Lesgards et al. 2014). Considering that recent reports have demonstrated the antibacterial and antiproliferative potential of some essential oils (Tilaoui et al. 2011; Vieira et al. 2017), in this study we investigate the chemical composition and the *in vitro* antibacterial and antiproliferative effects of the essential oil extracted from the leaves of *Psidium myrtooides* (PM-EO) (Myrtaceae). *Psidium myrtooides* is popularly known as purple araca in Brazil and several biological properties have been reported for the extracts and essential oils from *Psidium* genus, such as anti-diabetes, anti-inflammatory, anti-fungal, anti-hypertension, anti-diarrhea, antioxidant, radical-scavenging, antibacterial and anti-protozoal activities (Ho et al. 2012; Alvarenda et al. 2015; Ukwueze et al. 2015; Charneau et al. 2016; Ouyang et al. 2016; Tuler et al. 2017). So far, the chemical composition and antibacterial and antiproliferative activities of the essential oil of *P. myrtooides* leaves have not been investigated in the literature.

## 2. Results and discussion

The major compounds of PM-EO are *trans*- $\beta$ -caryophyllene (30.9%),  $\alpha$ -humulene (15.9%),  $\alpha$ -copaene (7.8%), caryophyllene oxide (7.3%), and  $\alpha$ -bisabolol (5.3%) (Table S1), as identified by gas chromatography-flame ionization detector (GC-FID) and gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS). The compounds *trans*- $\beta$ -caryophyllene,  $\alpha$ -humulene,  $\alpha$ -copaene, caryophyllene oxide, and  $\alpha$ -bisabolol have been previously detected in the essential oils from other three *Psidium* species (Medeiros et al. 2015; Scur et al. 2016; Silva et al. 2016). The chemical composition observed in the present study was similar to the chemical composition already described in the literature for other species belonging to the same genus and Myrtaceae family (Stefanello et al. 2011).

**Table 1A.** Values of minimum inhibitory concentrations (MICs) in  $\mu\text{g/mL}$  of essential oil from leaves of *P. myrtooides* (PM-EO) against selected cariogenic bacteria.

Microorganisms	MIC	MIC
	PM-EO	CHD
<i>Streptococcus mutans</i>	62.5	0.922
<i>Streptococcus mitis</i>	100	1.844
<i>Streptococcus sanguinis</i>	100	0.922
<i>Streptococcus sobrinus</i>	250	0.922
<i>Streptococcus salivarius</i>	250	0.737

Notes: MIC: Minimum Inhibitory Concentrations ( $\mu\text{g/mL}$ ); CHD: Chlorhexidine dihydrochloride (positive control); PM-EO: essential oil from *P. myrtooides* leaves.

**Table 2A.** Concentration inhibiting 50% growth ( $\text{IC}_{50}$ ), in  $\mu\text{g/mL}$ , and selectivity index (SI) of PM-EO against different cell lines.

Cell line	$\text{IC}_{50}$	Treatment ( $\mu\text{g/mL}$ )		
		PM-EO		DXR
		SI	$\text{IC}_{50}$	SI
GM07492A	$359.8 \pm 6.3$	–	$0.5 \pm 0.2$	–
MCF-7	$254.5 \pm 1.6^a$	1.4	$62.1 \pm 2.0$	–
HeLa	$324.2 \pm 41.4^a$	1.1	$5.3 \pm 1.3$	–
M059J	$289.3 \pm 10.9^a$	1.2	$16.2 \pm 2.5$	–

Notes: Doxorubicin (DXR) was used as positive controls. GM07492A (human lung fibroblasts), MCF-7 (human breast adenocarcinoma), HeLa (human cervical adenocarcinoma) and M059J (human glioblastoma). The selectivity index is the ratio between the  $\text{IC}_{50}$  value of the PM-EO obtained for GM07492A cells and the value found for the tumor cell line. Values are mean  $\pm$  SD,  $n = 3$ .

<sup>a</sup>Significantly different from the normal cell line (GM07492A) ( $p < 0.05$ ).

Table 1 lists the minimum inhibitory concentrations from the *in vitro* antibacterial assays of PM-EO against the main cariogenic bacteria. The essential oil extracted from *P. myrtooides* leaves (PM-EO) exhibited moderate activity against *Streptococcus mitis* and *S. sanguinis* (both MIC = 100 µg/mL), and *S. sobrinus* and *S. salivarius* (both MIC = 250 µg/mL). In addition, the PM-EO exhibited strong activity against *S. mutans* (MIC = 62.5 µg/mL). According to Vieira et al. (2017), the antibacterial activity can be considered good when MIC values are below 100 µg/mL and moderate from 500 to 100 µg/mL. This is an interesting result because very few natural compounds are known to inhibit *S. mutans*, one of the primary causative agents of dental caries (Melo et al. 2017). The antibacterial activity of essential oils is associated with the lipophilicity of their chemical constituents, which can easily diffuse across the cell membranes. This is a major advantage with regard to interactions with intracellular targets (Vieira et al. 2017). In addition, possible synergistic interactions between essential oils components are beneficial for their activity (Carneiro et al. 2017). The major constituents of PM-EO have recognized antibacterial activity already described in the literature (Kasim et al. 2014; Moreira et al. 2014; Martins et al. 2015; Carneiro et al. 2017). The presence of these compounds explains the good antibacterial action of PM-EO. The PM-EO cytotoxicity was assessed against the GM07492A normal cell line, with an IC<sub>50</sub> of 359.8 ± 6.3 µg/mL, and against the MCF-7, HeLa, and M059J tumour lines with IC<sub>50</sub> of 254.5 ± 1.6; 324.2 ± 41.4; and 289.3 ± 10.9 µg/mL, respectively (Table 2). The IC<sub>50</sub> of the MCF-7, HeLa, and M059J cell lines were significantly lower than that of the normal line, with selectivity indexes of 1.4, 1.1 and 1.2, respectively. The evidence from this study, the high amount of terpenes, known for their anticancer activity such as *trans*-β-caryophyllene, δ-selinene, α-humulene, and β-caryophyllene oxide, suggests that PM-EO is a significant potential source of pure compounds with promising anticancer activity (Salvador et al. 2011; Quassinti et al. 2013; Fidy et al. 2016; Guerrini et al. 2016). Besides, despite the low concentration of hydrocarbon monoterpenes, this class of compounds deserves special attention for its important antitumour activity (Sobral et al. 2014). It is important to note that the cytotoxicity of the PM-EO had little influence on the antibacterial effect, since it revealed antimicrobial activity at lower concentrations.

### 3. Experimental

Supplementary material related to this paper is available online, alongside Table S1.



#### 4. Conclusions

This is the first time the chemical composition and antibacterial and antiproliferative activities of the essential oil from the leaves of *P. myrtooides* have been investigated against the cariogenic bacteria and human tumour cell lines. The essential oil display antibacterial activity, with moderate activity against *Streptococcus mitis*, *S. sanguinis*, *S. sobrinus*, and *S. salivarius* and very promising activity against *S. mutans*. In this sense, PM-EO may be used as a promising component of new oral care products because *S. mutans* is one of the main causative agents of oral disorders, such as dental caries. Therefore, the results reported highlight *P. myrtooides* as a potential source for the search of new antitumour agents and reinforce the importance of studies evaluating cellular mechanisms involved in the antibacterial and antiproliferative activities of essential oil from *P. myrtooides*. In sum, further studies to identify the active chemical constituents of PM-EO are underway.

#### Disclosure statement

No potential conflict of interest is reported by the authors.

#### References

- Alvarenda FQ, Royo VA, Mota BFC, Laurentiz RS, Menezes EV, Melo Junior AF, Oliveira DA. 2015. Atividade antinociceptiva e antimicrobiana da casca do caule de *Psidium cattleianum* Sabine. Rev Bras Pl Med. 17:1125–1133.
- Carneiro NS, Alves CCF, Alves JM, Egea MB, Martins CHG, Silva TS, Bretanha LC, Balleste MP, Micke GA, Silveira EV, et al. 2017. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of essential oils from leaves and flowers of *Eugenia klotzchiana* Berg (Myrtaceae). An Acad Bras Cienc. 89:1907–1915.
- Charneau S, Mesquita ML, Bastos IMD, Santana JM, Paula JE, Grellier P, Espindola LS. 2016. *In vitro* investigation of Brazilian Cerrado plant extract activity against *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma cruzi* and *T. brucei* gambiense. Nat Prod Res. 30:1320–1326.
- Crevelin EJ, Caixeta SC, Dias HJ, Groppo M, Cunha WR, Martins CHG, Crotti AEM. 2015. Antimicrobial activity of the essential oil of *Plectranthus neochilus* against cariogenic bacteria. Evid Based Complement Alternat Med. 2015:102317.

- Fidyk K, Fiedorowicz A, Strzadala L, Szumny A. 2016.  $\beta$ -caryophyllene and  $\beta$ -caryophyllene oxide – natural compounds of anticancer and analgesic properties. *Cancer Med.* 5:3007–3017.
- Guerrini A, Sacchetti G, Grandini A, Spagnoletti A, Asanza M, Scalvenzi L. 2016. Cytotoxic effect and TLC bioautograph-guided approach to detect health properties of Amazonian *Hedyosmum sprucei* essential oil. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2016:1638342.
- Ho R, Violette A, Cressend D, Raharivelomanana P, Carrupt PA, Hostettmann K. 2012. Antioxidant potential and radical-scavenging effects of flavonoids from the leaves of *Psidium cattleianum* grown in French Polynesia. *Nat Prod Res.* 26:274–277.
- Kasim LS, Olaleye KO, Fagbohun AB, Ibitoye SF, Adejumo OE. 2014. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from *Struchium sparganophora* Linn. Ktze Asteraceae *Adv Biol Chem.* 4:246–252.
- Lesgards JF, Baldovini N, Vidal N, Pietri S. 2014. Anticancer activities of essential oils constituents and synergy with conventional therapies: review. *Phytother Res.* 28:1423–1446.
- Mangal M, Sagar P, Singh H, Raghava GPS, Agarwal SM. 2013. NPACT: naturally occurring plant-based anti-cancer compound-activity-target database. *Nucleic Acids Res.* 41:D1124–D1129.
- Martins CM, Nascimento EA, Morais SAL, Oliveira A, Chang R, Cunha LCS, Martins MM, Martins CHG, Moraes TS, Rodrigues PV, et al. 2015. Chemical constituents and evaluation of antimicrobial and cytotoxic activities of *Kielmeyera coriacea* Mart & Zucc. Essential oils. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2015:842047.
- Medeiros FCM, Menezzi CHSD, Bizzo HR, Vieira RF. 2015. Scents from Brazilian Cerrado: *Psidium myrsinites* DC. (Myrtaceae) leaves and inflorescences essential oil. *J Essent Oil Res.* 27:289–292.
- Melo DC, Miranda MLD, Junior WGF, Andrade PM, Alcoba AET, Silva TS, Casal CM, Martins CHG 2017. Anticariogenic and antimycobacterial activities of the essential oil of *Siparuna guianensis* Aublet (Siparunaceae). *Orbital: Electron J Chem.* 9:55–60.
- Moreira RRD, Martins GZ, Botelho VT, Santos LE, Cavaleiro C, Salgueiro L, Andrade G, Martins CHG. 2014. Composition and activity against oral pathogens of the essential oil of *Melampodium divaricatum* (Rich.) DC. *Chem Biodivers.* 11:438–444.
- Ouyang W, Zhu X, Wang W, Chen XX, Chen YJ, Cao Y. 2016. Novel skeleton sesquiterpenoids isolated from guava leaves. *Nat Prod Res.* 30:898–903.
- Quassinti L, Lupidi G, Maggi F, Sagratini G, Papa F, Vittori S, Bianco A, Bramucci M. 2013. Antioxidant and antiproliferative activity of *Hypericum hircinum* L. subsp. Majus (Aiton) N. Robson essential oil. *Nat Prod Res.* 27:862–868.

- Raut JS, Karuppayil SM. 2014. A status review on the medicinal properties of essential oils. *Ind Crops Prod.* 62:250–264.
- Salvador MJ, Carvalho JE, Wisniewski-Jr A, Kassuya CAL, Santos EP, Riva D, Stefanello MEA. 2011. Chemical composition and cytotoxic activity of the essential from the leaves of *Casearia lasiophylla*. *Rev Bras Farmacogn.* 21:864–868.
- Scur MC, Pinto FGS, Pandini JA, Costa WF, Leite CW, Temponi LG. 2016. Antimicrobial and antioxidante activity of essential oil and different plant extracts of *Psidium cattleianum* Sabine. *Braz J Biol.* 76:101–108.
- Silva EAJ, Silva VP, Alves CCF, Alves JM, Souchie EL, Barbosa LCA. 2016. Effect of natural and artificial drying of leaf biomass of *Psidium guajava* on the content and chemical composition of essential oil. *Semina: Cienc Agrar.* 37:3059–3068.
- Sobral MV, Xavier AL, Lima TC, Sousa DP. 2014. Antitumor activity of monoterpenes found in essential oils. *Scientific World Journal.* 2014:953451.
- Stefanello MEA, Pascoal ACRF, Salvador MJ. 2011. Essential oils from neotropical Myrtaceae: chemical diversity and biological properties. *Chem Biodivers.* 8:73–94.
- Tilaoui M, Mouse HA, Jaafari A, Aboufatima R, Chait A, Zyad A. 2011. Chemical composition and antiproliferative activity of essential oil from aerial parts of a medicinal herb *Artemisia herba-alba*. *Rev Bras Farmacogn.* 21:781–785.
- Tuler AC, Silva T, Carrijo TT, Garbin ML, Mendonca CBF, Peixoto AL, Esteves-Goncalves V. 2017. Taxonomic significance of pollen morphology for species delimitation in *Psidium* (Myrtaceae). *Plant Syst Evol.* 303:317–327.
- Ukwueze SE, Osadebe PO, Okoye FBC. 2015. A new antibacterial benzophenone glycoside from *Psidium guajava* (Linn.) leaves. *Nat Prod Res.* 29:1728–1734.
- Vieira TM, Dias HJ, Medeiros TCT, Grundmann CO, Groppo M, Heleno VCG, Martins CHG, Cunha WR, Crotti AEM, Silva EO. 2017. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Artemisia absinthium* Asteraceae leaves. *J Essent Oil Bear Pl.* 20:123–131.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

### Chemical composition and *in vitro* antibacterial and antiproliferative activities of the essential oil from the leaves of *Psidium myrtoides* O. Berg (Myrtaceae)

Alline L. B. Dias<sup>a</sup>, Hellen R. F. Batista<sup>a</sup>, Elisângela B. B. Estevam<sup>a</sup>, Cassia C. F. Alves<sup>a</sup>, Moacir R. Forim<sup>b</sup>, Heloiza D. Nicolella<sup>c</sup>, Ricardo A. Furtado<sup>c</sup>, Denise C. Tavares<sup>c</sup>, Thayna S. Silva<sup>c</sup>, Carlos H. G. Martins<sup>c</sup>, and Mayker L. D. Miranda<sup>d,\*</sup>

<sup>a</sup>Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, Rio Verde, GO, Brazil; <sup>b</sup>Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brazil; <sup>c</sup>Núcleo de Pesquisas em Ciências Exatas e Tecnológicas, Universidade de Franca, Franca, SP, Brazil; <sup>d</sup>Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais, Pouso Alegre, MG, Brazil.

\*Corresponding author

Instituto Federal do Sul de Minas Gerais, 900 – Parque Real

CEP 37550-000, Pouso Alegre, MG, Brazil

Cell phone number: (35) 99729-8492

E-mail address: mayker.miranda@ifsuldeminas.edu.br

---

### Chemical composition and *in vitro* antibacterial and antiproliferative activities of the essential oil from the leaves of *Psidium myrtoides* O. Berg (Myrtaceae)

In this study, the chemical composition and antibacterial and antiproliferative potential of the essential oil obtained from fresh leaves of *Psidium myrtoides* (PM-EO) against oral pathogens and human tumour cell lines were investigated for the first time. GC-FID and GC-MS analyses showed that *trans*- $\beta$ -caryophyllene (30.9%),  $\alpha$ -humulene (15.9%),  $\alpha$ -copaene (7.8%), caryophyllene oxide (7.3%), and  $\alpha$ -bisabolol (5.3%) are the major constituents of PM-EO. The antibacterial activity of PM-EO against a panel of oral pathogens was investigated in terms of their minimal inhibitory concentrations (MIC) using the broth microdilution method. PM-EO displayed moderate activity against *Streptococcus mitis* (MIC = 100  $\mu$ g/mL), *S. sanguinis* (MIC = 100  $\mu$ g/mL), *S. sobrinus* (MIC = 250  $\mu$ g/mL), and *S. salivarius* (MIC = 250  $\mu$ g/mL), and strong activity against *S. mutans* (MIC = 62.5  $\mu$ g/mL). The antiproliferative activity in normal (GM07492A, lung fibroblasts) and tumour cell lines (MCF-7, HeLa, and M059J) was performed using the XTT assay. PM-EO showed 50% inhibition of normal cell line growth at  $359.8 \pm 6.3$   $\mu$ g/mL. Antiproliferative activity was observed against human tumour cell lines, with IC<sub>50</sub> values significantly lower than that obtained for the normal cell line, demonstrating IC<sub>50</sub> values for MCF-7 cells ( $254.5 \pm 1.6$   $\mu$ g/mL), HeLa cells ( $324.2 \pm 41.4$   $\mu$ g/mL) and M059J cells ( $289.3 \pm 10.9$   $\mu$ g/mL). Therefore, the cytotoxicity of PM-EO had little influence on the antibacterial effect, since it showed antibacterial activity at lower concentrations. Our results suggest that PM-EO is a promising source of new antibacterial and antitumour agents.

**Keywords:** *Psidium myrtoides*; essential oil; *trans*- $\beta$ -caryophyllene; oral pathogens; antiproliferative activity

## Experimental

*Psidium myrtoides* O. Berg (Myrtaceae) were collected at “Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde” in the city of Rio Verde (16°06'20''S and 51°17'11''W), State of Goiás, Brazil, in June 2016, at 9 a.m. The plant was identified by the botanist Luzia Francisca de Souza and a voucher specimen of *P. myrtoides* (HJ998) was deposited at the Herbarium Jataiense Professor Germano Guarim Neto.

The essential oil of *P. myrtoides* (PM-EO) was extracted from fresh leaves by hydrodistillation for 2 h in a Clevenger-type apparatus. Hydrodistillation was performed in triplicate. To this end, the plant material was divided into three samples of 500 g each, and 500 mL of distilled water was added to each sample. After manual collection of the essential oil (EO), traces of water remaining in the oil were removed with anhydrous sodium sulfate, which was followed by filtration. The EO was stored in an amber bottle and kept in a refrigerator at 4°C until analysis. The EO yield was calculated from the weight of the fresh leaves. PM-EO was dissolved in ethyl ether and analyzed by Gas chromatography-flame ionization detector (GC-FID) and gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) and analyses were performed on Shimadzu QP5000 Plus and GCMS2010 Plus (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) systems. The temperature of the column used in GC-FID was programmed to rise from 60 to 240°C at 3°C/min and was then held at 240°C for 5 min; the carrier gas was H<sub>2</sub> at a flow rate of 1.0 mL/min. The equipment was set to operate in the injection mode; the injection volume was 0.1 µL (split ratio of 1:10), and the injector and detector temperatures were 240 and 280°C, respectively. The relative concentrations of the components were obtained by normalizing the peak areas (%). The relative areas were the average of triplicate GC-FID analyses. The GC-MS conditions and the identification of the PM-EO have been previously reported (Costa et al., 2017). Identification of the volatile components of PM-EO (Table S1) was based on their retention indices on an OPTIMA-5 (30 m X 0.25 mm; 0.250 µm) capillary column under the same operating conditions used for GC relative to a homologous series of *n*-alkanes (C<sub>8</sub>-C<sub>20</sub>); the structures were computer-matched with NIST/EPA/NIH, and their fragmentation patterns were compared with literature data (Adams, 2007).

The minimum inhibitory concentration (MIC) values of the EOs were calculated using the broth microdilution method in 96-well microplates. The following ATCC standard strains were used: *Streptococcus salivarius* (ATCC 25975), *Streptococcus sobrinus* (ATCC 33478), *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Streptococcus mitis* (ATCC 49456), and *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556). Individual 24-hour colonies on blood agar (Difco Labs, Detroit, Mich, USA) were suspended in 10.0 mL tryptic soy broth (Difco). Standardization of each microorganism suspension was carried out as previously described (Ferreira et al., 2010). The EOs samples were dissolved in DMSO (Merck, Darmstadt, Germany) at 1 mg/mL and diluted in tryptic soy broth (Difco) so that concentrations in the range from 4000 to 3.9 µg/mL would be achieved. The final DMSO concentration was 5% (v/v) and this solution was used as negative control. One inoculated well was included, so as to control the adequacy of the broth for organism growth. One non-inoculated well free of antimicrobial agent was also included to ensure medium sterility. Chlorhexidine dihydrochloride (CHD) (C8527 Sigma) was dissolved in tryptic soy broth (Difco) and used as positive control at concentrations ranging from 59.0 to 0.115 µg/mL. The microplates (96 well) were sealed with plastic film and incubated at 37°C for 24h as described above. After incubation, 30 µL of 0.02% resazurin (199303 Sigma, Stl Louis, MO, USA) aqueous solution were poured into each microplate well to indicate microorganism viability. The MIC values were determined as the lowest concentration of the EO capable of inhibiting microorganism growth. Three replicates assays were carried out for each microorganism.

In this study, we used three different tumour cell lines: human breast adenocarcinoma (MCF-7), human cervical adenocarcinoma (HeLa), and human glioblastoma (M059J). A normal human cell line (lung fibroblasts, GM07492A) was included to evaluate the possible selective activity of the natural product tested. The different cell lines were maintained as monolayers in plastic culture medium (HAM-F10 + DMEM, 1:1, Sigma-Aldrich) supplemented with 10 % fetal bovine serum (Nutricell), antibiotics (0.01 mg/mL streptomycin and 0.005 mg/mL penicillin; Sigma-Aldrich), and 2.38 mg/mL HEPES (Sigma-Aldrich). The cells were incubated at 36.5°C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. The antiproliferative activity was measured using the *in vitro* Toxicology Colorimetric Assay Kit (XTT; Roche Diagnostics) according to the manufacturer's instructions. For the experiments, the cells (10<sup>4</sup> cells/well) were incubated

in 96-well microplates. Each well received 100  $\mu\text{L}$  HAM-F10/DMEM medium containing essential oil at concentrations ranging from 3.91 to 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Negative (no treatment), solvent (0.02 % DMSO, dimethyl sulfoxide, Sigma-Aldrich) and positive (doxorubicin, DXR, Pharmacia Brasil Ltda.) controls were included. After incubation at 36.5  $^{\circ}\text{C}$  for 24 h, the culture medium was removed. The cells were washed with 100  $\mu\text{L}$  of PBS (phosphate buffered saline) to remove the treatments and exposed to 100  $\mu\text{L}$  of culture medium HAM-F10 without phenol red. Then, 25  $\mu\text{L}$  of XTT was added, and the cells were incubated at 36.5  $^{\circ}\text{C}$  for 17 h. The absorbance of the samples was determined using a multi-plate reader (ELISA – Tecan – SW Magellan vs 5.03 STD 2P) at the wavelength of 450 nm and reference length of 620 nm. The antiproliferative activity was assessed using  $\text{IC}_{50}$ , the concentration capable to inhibit 50 % of cell line growth as a response parameter, which was calculated with the GraphPad Prism program by plotting cell survival against the respective concentrations of the natural product tested. One-way ANOVA was used for the comparison of means ( $P < 0.05$ ). The experiments were performed in triplicate. The selectivity index was calculated by dividing the  $\text{IC}_{50}$  value of the essential oil obtained for GM07492A cells by the  $\text{IC}_{50}$  value obtained for the cancer cell line.

## References

- Adams, R.P. (2007), Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. Carol Stream, Illinois, USA: Allured Publishing Corporation.
- 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. (2017). Essential oil repellent action of plants of the genus *Zanthoxylum* against *Bemisia tabaci* biotype B (Homoptera: Aleyrodidae). *Sci Hortic.*, 226, 327-332.
- Ferreira, M.A., Carvalho, T.C., Turatti, I.C.C., Furtado, N.A.J.C., Martins, C.H.G., Lopes, N.P., Cunha, W.R., & Crotti, A.E.M. (2010). Antimicrobial activity of *Aegiphilla sellowiana* against oral pathogens. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 20, 246-249.

**Table S1A.** Chemical composition of the essential oil from the leaves of *Psidium myrtaoides* (PM-EO).

<i>RT (min)</i>	<i>Compounds</i>	<i>RI<sub>exp</sub></i>	<i>RI<sub>lit</sub></i>	<i>RA %</i>
				<i>PM-EO</i>
5.718	$\alpha$ -Pinene	934	932	1.3
6.897	Sabinene	979	978	0.2
8.503	Limonene	1029	1024	1.0
11.063	Terpinolene	1092	1090	0.2
22.608	<b><math>\alpha</math>-Copaene</b>	1372	1374	<b>7.8</b>
24.419	<b><i>trans</i>-<math>\beta</math>-Caryophyllene</b>	1423	1420	<b>30.9</b>
25.059	<i>trans</i> - $\alpha$ -Bergamotene	1439	1438	1.0
25.804	<b><math>\alpha</math>-Humulene</b>	1457	1455	<b>15.9</b>
26.082	Ishwarane	1464	1465	1.5
26.728	$\gamma$ -Muuroolene	1480	1478	1.1
26.957	$\alpha$ -Curcumene	1485	1486	0.5
27.118	$\beta$ -Selinene	1489	1489	1.5
27.488	$\delta$ -Selinene	1499	1498	1.5
27.991	$\gamma$ -cadinene	1512	1513	2.7
28.600	<i>trans</i> -Cadina-1,4-diene	1527	1525	4.3
29.050	$\alpha$ -Cadinene	1539	1537	1.6
29.310	Elemol	1546	1548	2.2
29.909	<i>trans</i> -Nerolidol	1564	1564	2.6
30.107	Spathulenol	1575	1577	1.0
30.920	<b>Caryophyllene oxide</b>	1587	1588	<b>7.3</b>
31.690	Globulol	1608	1607	0.8
32.626	Cubenol	1633	1635	1.8
32.924	Hinesol	1641	1640	1.0
33.285	$\alpha$ -Cadinol	1651	1652	1.0
33.595	14-Hydroxy-9-epi-( <i>E</i> )-caryophyllene	1669	1668	0.6



34.631	<b><math>\alpha</math>-Bisabolol</b>	1688	1685	<b>5.3</b>
35.117	Geranyl tiglate	1701	1700	1.1
<b>Total</b>				<b>97.7</b>

**RT**: Retention time; **RI<sub>exp</sub>**: Retention index determined relative to *n*-alkanes (C<sub>8</sub>-C<sub>20</sub>) on the OPTIMA-5 (30 m X 0.25 mm; 0.250  $\mu$ m) column; **RI<sub>lit</sub>**: Retention index from the literature (Adams, 2007); **RA%**: relative area (peak area relative to the total peak area in the GC-FID chromatogram), average of three replicates.

**APÊNDICE B** - O artigo científico abaixo foi um trabalho paralelo a dissertação.

Submetido e aceito pela Brazilian Journal of Biology

**Chemical composition and *in vitro* inhibitory effects of essential oils from fruit peel of three *Citrus* species and limonene on mycelial growth of *Sclerotinia sclerotiorum***

A. L. B. Dias<sup>a</sup>, W. C. Sousa<sup>a</sup>, H. R. F. Batista<sup>a</sup>, C. C. F. Alves<sup>a</sup>, E. L. Souchie<sup>a</sup>, F. G. Silva<sup>a</sup>, P. S. Pereira<sup>a</sup>, E. M. Sperandio<sup>a</sup>, C. M. Cazal<sup>b</sup>, M. R. Forim<sup>c</sup> and M. L. D. Miranda<sup>d\*</sup>

<sup>a</sup>Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano - Campus Rio Verde, Rod. Sul Goiana, S/Nº, Km 01, 75901-970, Rio Verde, GO, Brazil

<sup>b</sup>Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas – Campus Barbacena, Rua Monsenhor José Augusto, 204, São José, 36205-018, Barbacena, MG, Brazil

<sup>c</sup>Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brazil

<sup>d</sup>Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Triângulo Mineiro - Campus Uberlândia Centro, Rua Blanche Galassi, Morada da Colina, 38411-104, Uberlândia, MG, Brazil

\*E-mail address: [maykermiranda@iftm.edu.br](mailto:maykermiranda@iftm.edu.br)

**Running title:** Anti-*Sclerotinia sclerotiorum* activity of essential oils from *Citrus* peel

**Abstract**

Essential oils (EO) from aromatic and medicinal plants generally perform a diverse range of biological activities because they have several active constituents that work in different mechanisms of action. EO from *Citrus* peel have an impressive range of food and medicinal uses, besides other applications. EO from *Citrus reticulata*, *C. sinensis* and *C. deliciosa* were extracted from fruit peel and analyzed by GC-MS. The major constituent of EO under evaluation was limonene, whose concentrations were 98.54%, 91.65% and 91.27% for *C. sinensis*, *C. reticulata* and *C. deliciosa*, respectively. The highest potential of inhibition of mycelial growth was observed when the oil dose was 300 µL. *Citrus* oils inhibited fungus growth in 82.91% (*C. deliciosa*), 65.82% (*C. sinensis*) and 63.46% (*C. reticulata*). Anti-*Sclerotinia sclerotiorum* activity of 90% pure limonene and at different doses (20, 50, 100, 200 and 300 µL) was also investigated. This monoterpene showed to be highly active by inhibiting 100% fungus growth even at 200 and 300 µL doses. This is the first report of the *in vitro* inhibitory effect of natural products from these three *Citrus* species and its results show that there is good prospect of using them experimentally to control *S. sclerotiorum*, in both greenhouse and field conditions.

**Keywords:** *Citrus reticulata*; *Citrus sinensis*; *Citrus deliciosa*; white rot; limonene; white mold

## Composição química e efeito inibitório *in vitro* dos óleos essenciais das cascas dos frutos de três espécies de *Citrus* e do limoneno sobre o crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum*

### Resumo

Óleos essenciais de plantas aromáticas e medicinais geralmente possuem uma gama diversificada de atividades biológicas, pois possuem vários constituintes ativos que atuam por meio de vários mecanismos de ação. Os óleos essenciais das cascas de *Citrus* têm uma variedade impressionante de usos em alimentos, medicamentos entre várias outras aplicações. Os óleos essenciais (OE) de *Citrus reticulata*, *C. sinensis* e *C. deliciosa* foram extraídos das cascas dos frutos e analisados por CG-EM. O limoneno foi o constituinte majoritário encontrado nos óleos essenciais avaliados, nas concentrações de 98,54%, 91,65% e 91,27% para *C. sinensis*, *C. reticulata* e *C. deliciosa*, respectivamente. Os maiores potenciais de inibição do crescimento micelial foi observado na dose de 300 µL dos óleos. Os óleos de *Citrus* inibiram em 82,91% (*C. deliciosa*), 65,82% (*C. sinensis*) e 63,46% (*C. reticulata*) o crescimento do fungo. A atividade anti-*Sclerotinia sclerotiorum* do limoneno 90% puro e em diferentes doses (20, 50, 100, 200 e 300 µL) foi também investigada e este monoterpene demonstrou-se altamente ativo inibindo 100% o crescimento do fungo inclusive nas doses de 200 e 300 µL. Este é o primeiro relato sobre o efeito inibitório *in vitro* dos óleos essenciais destas três espécies de *Citrus* e os resultados deste estudo mostram que existe uma boa perspectiva de uso destes produtos naturais experimentalmente para controlar o *S. sclerotiorum* tanto em condições de estufa como em condições de campo.

**Palavras-chave:** *Citrus reticulata*; *Citrus sinensis*; *Citrus deliciosa*; podridão branca; limoneno; mofo branco.

### 1. Introduction

The fungus *Sclerotinia sclerotiorum*, one of the most common pathogens, causes white mold and severe damage to several economically important cultures, such as beans and soybeans, thus, making Brazilian producers face great losses (Haddad et al., 2017). Controlling this disease with the use of chemicals is not only ineffective but also contradictory, since it does not follow the current tendency which searches for ecologically balanced and stable agricultural systems that do not release toxic waste (Milan et al., 2015).

White mold development is favored by certain conditions, such as high humidity and low/moderate temperatures. It may be controlled, mainly by fungicide application, which depends on several factors, such as soil inoculum density, phases of the epidemic, fungicide coverage of plants, number of pulverization steps, fungitoxicity doses, application time, volume and equipment, plant spacing, besides disease incidence and severity (Silva et al., 2017).

Regarding the fungus *S. sclerotiorum*, it develops resistant structures called sclerotia, which can survive in soil for several years even if there are no hosts (Silva et al., 2011). Sclerotia play a very important role in the life cycle of this phytopathogen, since they are precursors of apothecia, where ascospores are formed. In ideal conditions, ascospores may infect cultures and start infection by spores (Silva et al., 2011). In fact, several factors, such as nutrients of the substrate in which sclerotia develop, sclerotium age and environmental factors (humidity, temperature, light, soil pH, soil aeration and burial depth), influence germination of this fungus sclerotia (Gomes et al., 2017).

Regarding problems caused by white mold, several studies have shown that natural products have promising activities, for instance, the bioactivity of essential oils (EO) against different phytopathogens, such as *S. sclerotiorum* (Al-Taisan et al., 2014). EO, mainly the ones extracted from *Citrus* species, exhibit a broad spectrum of biological activity and activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria, yeast and mycotoxigenic and deteriorating filamentous fungi (Qadir et al., 2018).

In order to keep carrying out studies of determination of chemical composition of EO and their activity against white mold (Valadares et al. 2018) and considering the interest of our research group in EO from *Citrus* species (Estevam et al., 2016; Lemes et al., 2018), the study reported by this paper addresses the chemical composition of EO extracted from *Citrus reticulata*, *C. sinensis* and *C. deliciosa* fruit peel (Figure 1) and their *in vitro* inhibitory effect on mycelial growth of *S. sclerotiorum*.



**Figure 1B.** *Citrus reticulata* (1), *Citrus sinensis* (2) and *Citrus deliciosa* (3)

## 2. Material and Methods

### 2.1. Plant material

Plant material was collected in Rio Verde (17°99.4'63.2''S and 51°05.2'44.6''W), a city located in Goiás state, Brazil, on January 2nd, 2018, at 9 a.m. The plant was identified by the botanist Luzia Francisca de Souza and voucher specimens of *Citrus reticulata*, *Citrus sinensis* and *Citrus deliciosa* were deposited in the herbarium in Rio Verde, at the Instituto Federal Goiano (IFGOIANO) under identification number #4488, #4489 and #4490, respectively.

### 2.2. Essential oil extraction

EO from *Citrus* were extracted from fruit peel by hydrodistillation – performed in triplicate – in a Clevenger-type apparatus for 2 h. The plant material was divided into three 500-g samples and 500 mL distilled water was added to each sample. After manual collection of EO, water traces which remained in the oil were removed with anhydrous sodium sulfate. The next step was filtration. EO were then stored in an amber bottle and kept in a refrigerator at 4°C until analysis. Calculation of EO yield was based on the weight of the fruit peel; it was expressed as the average of the triplicate analyses.

### 2.3. Chemical analysis of essential oils

The analysis of the chemical constituents of EO from the fruit peel of both plants was carried out using a Shimadzu QP 5000 GC gas chromatograph equipped with a fused-silica capillary column OPTIMA-5 (30 m X 0.25 mm X 0.250 µm) and a helium carrier gas (He) detector and electron impact ionization (EI) (70 eV). The initial temperature was maintained at 150 °C for 3.0 min, programmed to 280 °C at 10 °C/min and left at this temperature for an additional 4.0 min. The others parameters were as follows: injector temperature 250 °C, detector temperature 280 °C, injection pressure 100 kPa, due to Split 30, mass spectrometer detection range 43-500 *m/z*, start time (cut team solvent) 2.0 min and flow 1.1 mL/min. The identification of oil components was based on the linear retention index (Kovats Index – KI) calculated with respect to the retention times of a homologous series of *n*-alkanes (C-14 to C-26, C-28 and C-30) and the fragmentation

pattern observed in the mass spectra and by comparing these values with the literature data (Adams, 2007) and NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library (NIST 08).

#### 2.4. Antifungal assay

The isolate of *Sclerotinia sclerotiorum* Ss12 (BRM 29673) was provided by the Embrapa Arroz e Feijão, whose headquarters is in Santo Antônio de Goiás, GO, Brazil. Assays were carried out in the agricultural microbiology laboratory at IF Goiano – Campus Rio Verde and the antifungal activity of EO from fruit peel of *Citrus* species was evaluated by the disc-diffusion method described by Xavier et al., (2016), whose EO doses were 20, 50, 100, 200 and 300 µL for three *Citrus* species, respectively (Table 2). The anti-*Sclerotinia sclerotiorum* activity of limonene at the same doses of EO (20 - 300 µL) was also evaluated. In the analyses, limonene (90% purity) was purchased from Sigma-Aldrich®. Negative controls were dishes with no addition of EO (witness) whereas the positive control was the fungicide Frowncide 500 SC, at 10 µg/mL of active ingredient. Petri dishes were sterilized and prepared with PDA culture medium. After medium solidification, EO, at previously mentioned doses, were added and smeared on the surface of the dish with the help of a Drigalski spatula. Afterwards, 5 mm diameter PDA medium discs with 10-day-old mycelium were placed in the center of the dishes. Then, they were incubated at  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  and mycelial growth was measured daily, up to full growth of the fungus on control dishes. The treatment was carried out in quadruplicate and the experimental design was thoroughly randomized. Data were submitted to the analysis of variance (ANOVA) and resulting means of all treatments were evaluated by the Scott-Knott test at 5% significance by the ASSISTAT software.

Percentage of inhibition of mycelial growth (IMG) was calculated by the following formula:

$$IMG (\%) = \frac{(\text{control growth} - \text{treatment growth})}{\text{control growth}} \times 100$$

### 3. Results and Discussion

Extraction of EO from *Citrus sinensis*, *C. reticulata* and *C. deliciosa* fruit peel yielded 0.8%, 0.6% and 0.7%, respectively. GC-MS and GC-FID identified four chemical constituents of EO from *C. sinensis* (total was 99.80%), four from *C. reticulata* (total was

98.88%) and eleven from *C. deliciosa* (total was 99.14%). The major constituent of the three EO under analysis was limonene, which was found at the following concentrations: 98.54% (*C. sinensis*), 91.65% (*C. reticulata*) and 91.27% (*C. deliciosa*). Components, retention indexes and relative percentages (%) are shown in Table 1.

**Table 1B.** Chemical composition of EO from *Citrus sinensis*, *C. reticulata* and *C. deliciosa* fruit peel

Compounds	RI		RA%		
	Literature	Calculated	<i>C. sinensis</i>	<i>C. reticulata</i>	<i>C. deliciosa</i>
Tricyclene	921	921	0.25	-	-
$\alpha$ -Thujene	924	914	-	0.13	-
Sabinene	969	959	-	-	1.06
$\beta$ -Pinene	974	976	0.74	0.93	1.27
<i>n</i> -Octanal	998	993	-	-	0.19
$\delta$ -2-Carene	1001	1000	0.27	-	-
<b>Limonene</b>	<b>1024</b>	<b>1016</b>	<b>98.54</b>	<b>91.65</b>	<b>91.27</b>
( <i>E</i> )- $\beta$ -Ocimene	1044	1034	-	-	0.09
$\gamma$ -Terpinene	1054	1046	-	6.17	0.12
Linalool	1095	1087	-	-	4.04
3-Thujanol	1164	1166	-	-	0.28
$\alpha$ -Terpineol	1186	1180	-	-	0.37
<i>cis</i> -Cadina					
1(6),4-diene	1461	1468	-	-	0.39
$\beta$ -Macrocarpene	1499	1509	-	-	0.06
<b>Total</b>			<b>99.80</b>	<b>98.88</b>	<b>99.14</b>

**RI:** Retention index; **RA%:** relative area

Comparison between compounds identified and listed in Table 1 and others reported by similar studies of *Citrus* species showed that compounds of EO from *C. sinensis* and *C. reticulata* fruit peel had little chemical variability, i. e., only four constituents were identified in each oil. However, these oils exhibited a very high content of the monoterpene limonene, which was found at concentrations of 98.54% in *C. sinensis* oil and 91.65% in *C. reticulata* oil. Kamal et al., (2011) reported higher chemical variability in compounds of fruit peel of the same species, but lower concentrations of limonene, by comparison with findings of this study. Concerning the chemical composition of *C. deliciosa* oil, this study found high chemical variability, since eleven chemical constituents were identified in EO from *C. deliciosa* fruit peel. Limonene was also identified at significant concentration – 99.14% –, which is higher than the one reported by El-hawary et al., (2013), who found 77.55% in EO from fruit peel. In this study, the chemical composition was also similar to the one that was previously reported in the case of EO from twenty *Citrus* species found in China. Limonene,  $\alpha$ -pinene,

sabinene and terpinene were the characteristic compounds of metabolic profiles of all *Citrus* under evaluation (Jing et al., 2015).

*In vitro* antifungal activity of EO from *C. sinensis*, *C. reticulata* and *C. deliciosa* fruit peel was evaluated against the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. Percentages of inhibition of mycelial growth (IMG) of EO from *Citrus* fruit peel are shown in Table 2.

**Table 2B.** *In vitro* antifungal activity of EO from *Citrus* and limonene against *S. sclerotiorum*

FUNGI	Essential oils μL (doses)	Inhibition of mycelial growth (%)			
		<i>C.sinensis</i>	<i>C. deliciosa</i>	<i>C. reticulata</i>	Limonene
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	N.C	0a	0a	0a	0a
	20	2.16bA	11.00bA	50.69bB	2.21b
	50	7.47bA	12.77bA	51.67bB	3.48b
	100	14.42bcA	26.13bA	52.06bB	43.03c
	200	49.71bcA	26.72bA	52.06bA	100.00d
	300	65.82cA	82.91cA	63.46bA	100.00d

N.C: negative control. Different small letters show differences among concentrations. Different capital letters show differences among *Citrus* species. Positive control (Frownicide 500 SC) inhibited 100% of fungus development. Limonene (90% purity) showed 100% potential of inhibition.

The highest inhibitory potential against mycelial growth of the fungus *S. sclerotiorum* exhibited by oils under study was found when the oil dose was 300 μL. It inhibited 82.91%, 65.82% and 63.46% in the cases of EO from *C. deliciosa*, *C. sinensis* and *C. reticulata*, respectively (Table 2). It should be highlighted that all three EO from these three *Citrus* species, at the highest concentration under investigation, inhibited more than 50% of fungal growth. In addition, it is worth mentioning that EO from *C. deliciosa* fruit peel were the most active ones, a fact that may be explained by the high chemical variability of their compounds, which may act synergically and increase their biological activity (Sriwattanachai et al., 2018).

The antifungal activity of EO from *Citrus* found by this study may be related to the high concentration of the chemical constituent limonene, whose antifungal activity has been widely described in the literature. Chee et al., (2009) reported the promising activity of this monoterpene against the fungus *Trichophyton rubrum*. Zohra et al., (2015) studied EO of four *Citrus* species and reported their potential in the biological control of phytopathogens, such as *Fusarium oxysporum*, *Penicelium* sp., *Alternaria* sp. and



*Fusarium* sp. They also highlighted the high concentration of limonene in the oils under study.

Special attention was given to the major constituent limonene. As a result, in this study, the anti-*Sclerotinia sclerotiorum* activity of this 90% pure monoterpene and at doses of 20, 50, 100, 200 and 300  $\mu\text{L}$  was also investigated (Table 2). At all doses under evaluation, total inhibition of white mold occurred at 200 and 300  $\mu\text{L}$ , thus representing 100% of inhibition of mycelial growth. When limonene (90% pure) was tested individually, it inhibited *S. sclerotiorum* growth in 100%. It should be highlighted that limonene has already been identified at high concentrations in EO extracted from several *Citrus* species. This monoterpene – in its pure form – exhibited promising antifungal activity against other phytopathogenic fungi, such as *Aspergillus niger*, *Phytophthora digitatum*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* and *Fusarium verticillioides*, even against *S. sclerotiorum* itself (Jing et al., 2014; Ma et al., 2015). In addition, the therapeutic effects of limonene, such as anti-inflammatory, antioxidant, antinociceptive, anticancer, antidiabetic, antihyperalgesic, antiviral and gastroprotective ones, have been deeply studied (Vieira et al., 2018).

The mechanism of action of EO which exhibit some kind of biological activity is not very clear. Many studies suggest that cell membranes of microorganisms are the targets of bioactive volatile compounds since EO are complex mixtures of apolar molecules that bestow them high hydrophobicity. Therefore, EO cause degradation of the cell wall, disruption of cytoplasmic membrane, cytoplasmic leakage, cell lysis and, eventually, cell death (Jing et al., 2014). As a result, EO from *Citrus* deserve the distinction they have got lately, as well as their broad applicability to several areas, such as chemical, pharmaceutical, food and agronomical ones (Palazzolo et al., 2013).

#### 4. Conclusion

In short, EO extracted from *Citrus sinensis*, *C. reticulata* and *C. deliciosa* fruit peel exhibit antifungal activity against the phytopathogen *Sclerotinia sclerotiorum* by inhibiting fungal growth in about 50% at 300  $\mu\text{L}$ . The monoterpene limonene was the chemical constituent that was identified at high concentration in EO from *Citrus* under investigation. When limonene (90% pure) was tested in its isolated form and at doses under evaluation (20 - 300  $\mu\text{L}$ ), its high activity against white mold was proven. In addition, the antifungal activity of EO from *Citrus* species may result from synergism among the compounds that constitute the oils. Results of this study show that there is

good prospect of using these EO from *Citrus* species experimentally to control phytopathogens in both greenhouse and field conditions. In sum, the monoterpene limonene proved to be an excellent natural alternative for the control of *S. sclerotiorum*.

### Acknowledgments

The authors are grateful to FAPEG, CNPq, CAPES and IF GOIANO for their financial support.

### ORCID

A. L. B. Dias: 0000-0001-5257-7475

W. C. Sousa: 0000-0002-0405-1089

H. R. F. Batista: 0000-0002-9968-5825

C. C. F. Alves: 0000-0003-2004-3166

E. L. Souchie: [0000-0003-2338-4812](https://orcid.org/0000-0003-2338-4812)

F. G. Silva: 0000-0003-4908-2265

P. S. Pereira: 0000-0002-0155-8968

E. M. Sperandio: 0000-0002-7761-7186

C. M. Cazal: 0000-0001-5935-686X

M. R. Forim: [0000-0001-8798-2921](https://orcid.org/0000-0001-8798-2921)

M. L. D. Miranda: 0000-0003-4689-572X

### References

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

AL-TAISAN, W.A., BAHKALI, A.H., ELGORBAN, A.M., EL-METWALLY, M.A., 2014. Effective influence of essential oils and microelements against *Sclerotinia sclerotiorum*. *International Journal of Pharmacology*. vol. 10, no. 5, pp. 275-281. <https://doi.org/10.3923/ijp.2014.275.281>.

CHEE, H.Y., KIM, H., LEE, M.H., 2009. *In vitro* antifungal activity of limonene against *Trichophyton rubrum*. *Mycobiology*. vol. 37, no. 3, pp. 243-246. <https://doi.org/10.4489/MYCO.2009.37.3.243>.

EL-HAWARY, S.S., TAHA, K.F., ABDEL-MONEM, A.R., KIRILLOS, F.N., MOHAMED, A.A., 2013. Chemical composition and biological activities of peels and leaves essential oils of four cultivars of *Citrus deliciosa* var. *tangarina*. *American Journal of Essential Oils and Natural Products*. vol. 1, no. 2, pp. 1-6.

ESTEVAM, E.B.B., MIRANDA, M.L.D., ALVES, J.M., EGEEA, M.B., PEREIRA, P.S., MARTINS, C.H.G., ESPERANDIM, V.R., MAGALHÃES, L.G., BOLELA, A.C., CAZAL, C.M., SOUZA, A.F., ALVES, C.C.F., 2016. Composição química e atividades biológicas dos óleos essenciais das folhas frescas de *Citrus limonia* Osbeck e *Citrus latifolia* Tanaka (Rutaceae). *Revista Virtual de Química*. Vol. 8, no. 6, pp. 1842-1854. <https://doi.org/10.21577/1984-6835.20160124>.

GOMES, R.S.S., ARAÚJO, A.E., NASCIMENTO, L.C., FEITOSA, E.D.A., DEMARTELAERE, A.C.F., 2017. Caracterização da *Sclerotinia sclerotiorum*, transmissão e qualidade fisiológica em sementes de algodoeiro. *Acta Iguazu*. Vol. 6, no. 4, pp. 105-113.

HADDAD, P.E., LEITE, L.G., LUCON, C.M.M., HARAKAVA, R., 2017. Selection of *Trichoderma* spp. strains for the control of *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. vol. 52, no. 12, pp. 1140-1148. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2017001200002>.

JING, L., LEI, Z., LI, L., XIE, R., XI, W., GUAN, Y., SUMNER, L.W., ZHOU, Z., 2014. Antifungal activity of *Citrus* essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. vol. 62, pp. 3011-3033. <https://doi.org/10.1021/jf5006148>.

JING, L., LEI, Z., ZHANG, G., PILON, A.C., HUHMANN, D.V., XIE, R., XI, W., ZHOU, Z., SUMNER, L.W., 2015. Metabolite profiles of essential oils in citrus peels and their taxonomic implications. *Metabolomics*. vol. 11, no. 4, pp. 952-963. <http://dx.doi.org/10.1007/s11306-014-0751-x>.

KAMAL, G.M., ANWAR, F., HUSSAIN, A.I., SARRI, N., ASHRAF, M.Y., 2011. Yield and chemical composition of *Citrus* essential oils as affected by drying pretreatment of peels. *International Food Research Journal*. vol. 18, no. 4, pp. 1275-1282.

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., 2018. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from *Citrus aurantifolia* leaves and fruit peel against oral pathogenic bacteria. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*. vol. 90, no. 2, pp. 1285-1292. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201820170847>.

MA, B., BAN, X., HUANG, BO., HE, J., TIAN, J., ZENG, H., CHEN, Y., WANG, Y., 2015. Interference and mechanism of dill seed essential oil and contribution of carvone and limonene in preventing sclerotia rot of rapeseed. *PLOS ONE*. Vol. 10, no. 7, pp. e0131733. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131733>.

MILAN, M.D., BARROSO, F.M., MELLO, S.C.M., ARAÚJO, M.S., CARVALHO, D.D.C., 2015. Regimes de luz na produção de conídios de *Trichoderma harzianum* para controle do mofo branco em feijoeiro. *Pesquisa Agropecuária Tropical*. vol. 45, no. 4, pp. 434-439. <http://dx.doi.org/10.1590/1983-40632015v4537755>.

PALAZZOLO, E., LAUDICINA, V.A., GERMANÀ, M.A., 2013. Current and potential use of *Citrus* essential oils. *Current Organic Chemistry*. vol. 17, no. 1, pp. 3042-3049. <http://dx.doi.org/10.2174/13852728113179990122>.

QADIR, R., ANWAR, F., MEHMOOD, T., SHAHID, M., ZAHOOR, S., 2018. Variations in chemical composition, antimicrobial and haemolytic activities of peel essential oils from three local *Citrus* cultivars. *Pure and Applied Biology*. vol. 7, no. 1, pp. 282-291. <https://doi.org/10.19045/bspab.2018.70034>.

SILVA, F.P.M., GAVASSONI, W.L., BACCHI, L.M.A., GARCEZ, F.R., 2011. Germinação carpogênica de *Sclerotinia sclerotiorum* sob diferentes resíduos e extratos de plantas cultivadas. *Summa Phytopathologica*. vol. 37, no. 3, pp. 131-136.

SILVA, F.F., CASTRO, E.M., MOREIRA, S.I., FERREIRA, T.C., LIMA, A.E., ALVES, E., 2017. Emergência e análise ultraestrutural de plântulas de soja inoculadas com *Sclerotinia sclerotiorum* sob efeito da aplicação de *Trichoderma harzianum*. *Summa Phytopathologica*. vol. 43, no. 1, pp. 41-45. <http://dx.doi.org/10.1590/0100-5405/2212>.

SRIWATTANACHAI, S., SADIQ, M.B., ANAL, A.K., 2018. Synergistic antifungal effects of thyme essential oil and *Lactobacillus plantarum* cell-free supernatant against *Penicillium* spp. and *in situ* effects. *Journal of Food Processing and Preservation*. vol. 42, no. 1, pp. e-13400. <http://dx.doi.org/10.1111/jfpp.13400>.

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., 2018. Essential oils from *Piper aduncum* inflorescences and leaves: chemical composition and antifungal activity against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. vol. 90, no. 3, pp. 2691-2699. <http://dx.doi.org/10.1590/0001-3765201820180033>.

VIEIRA, A.J., BESERRA, F.P., SOUZA, M.C., TOTTI, B.M., ROZZA, A.L., 2018. Limonene: aroma of innovation in health and disease. *Chemico-Biological Interactions*. vol. 283, no. 1, pp. 97-106. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.02.007>.

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., 2016. Composição química do óleo essencial de *Cardiopetalum calophyllum* Schltdl. (Annonaceae) e suas atividades antioxidante, antibacteriana e antifúngica. *Revista Virtual de Química*. vol. 8, no. 5, pp. 1433-1448. <http://dx.doi.org/10.21577/1984-6835.20160101>.

ZOHRA, H.F., RACHIDA, A., MALIKA, M., BENALI, S., SAMIR, A.A., MERIEM, B., 2015. Chemical composition and antifungal activity of essential oils of Algerian citrus. *African Journal of Biotechnology*. vol. 14, no. 12, pp. 1048-1055. <http://dx.doi.org/10.5897/AJB2013.12140>.