

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO CIÊNCIA E TECNOLOGIA GOIANO –  
CAMPUS RIO VERDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS - AGRONOMIA

ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Psidium guajava*: CONTROLE  
DE *Sclerotinia sclerotiorum* EM SOJA, ATIVIDADE BACTERICIDA E  
ANTICARIOGÊNICA

Autora: Elizabeth Aparecida Josefí da Silva

Orientador: Dr. Edson Luiz Souchie

Rio Verde, GO

Julho, 2019

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO CIÊNCIA E TECNOLOGIA GOIANO –  
CAMPUS RIO VERDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS - AGRONOMIA

ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Psidium guajava*: CONTROLE  
DE *Sclerotinia sclerotiorum* EM SOJA, ATIVIDADE BACTERICIDA E  
ANTICARIOGÊNICA

Autora: Elizabeth Aparecida Josefi da Silva

Orientador: Dr. Edson Luiz Souchie

Tese apresentada como parte das exigências para obtenção do título de DOUTOR EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS - AGRONOMIA no Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde, Área de concentração em Produção Vegetal Sustentável no Cerrado.

Rio Verde, GO

Julho, 2019

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

S5866 Silva, Elizabeth Aparecida Josefi da  
Óleo Essencial Das Folhas de Psidium guajava:  
Controle de Sclerotinia sclerotiorum em soja,  
Atividade Bactericida e Anticariogênica / Elizabeth  
Aparecida Josefi da Silva; orientador Edson Luiz  
Souchie; co-orientadora Cassia Cristina Fernandes  
Alves. -- Rio Verde, 2019.  
71 p.

Tese ( em Doutorado em Ciências Agrárias -  
Agronomia) -- Instituto Federal Goiano, Campus Rio  
Verde, 2019.

1. Atividade antifúngica. 2. mofo branco. 3.  
goiaba. 4. metabólitos secundários. I. Souchie, Edson  
Luiz, orient. II. Alves, Cassia Cristina Fernandes,  
co-orient. III. Título.

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

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

**Identificação da Produção Técnico-Científica**

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

Nome Completo do Autor: Elizabeth Aparecida Josefi da Silva

Matrícula: 2015202320140071

Título do Trabalho: ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Psidium guajava*: CONTROLE DE *Sclerotinia sclerotiorum* EM SOJA. ATIVIDADE BACTERICIDA E ANTICARIÓGENICA

**Restrições de Acesso ao Documento**

Documento confidencial:  Não  Sim, justifique: \_\_\_\_\_

Informe a data que poderá ser disponibilizado no RIIF Goiano: \_\_/\_\_/\_\_

O documento está sujeito a registro de patente?  Sim  Não

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

**DECLARAÇÃO DE DISTRIBUIÇÃO NÃO-EXCLUSIVA**

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

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

Rio Verde 02/09/19  
Local Data

Elizabeth Aparecida Josefi da Silva  
Assinatura do Autor e, ou Detentor dos Direitos Autorais

Ciente e de acordo:

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





SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SECRETARIA DE EDUCAÇÃO PROFISSIONAL E TECNOLÓGICA  
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA GOIANO  
CAMPUS RIO VERDE - GO  
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS-AGRONOMIA


## ATA Nº/56 BANCA EXAMINADORA DE DEFESA DE TESE


Aos trinta dias do mês de julho do ano de dois mil e dezenove, às 08h00min (oito horas), reuniram-se os componentes da Banca Examinadora: Dr. Edson Luiz Souchie (orientador), Prof. Dr. Alaerson Maia Geraldine (avaliador interno), Prof. Dr. Nelmicio Furtado da Silva (avaliador externo), Profa. Dra. Cássia Cristina Fernandes Alves (avaliadora externa) e Prof. Dr. José Milton Alves (avaliador externo), sob a presidência do(a) primeiro(a), em sessão pública realizada no Auditório da DPPG do IF Goiano – Campus Rio Verde, para procederem a avaliação da defesa de Tese, em nível de Doutorado, de autoria de **ELIZABETH APARECIDA JOSEFI DA SILVA**, discente do Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias – Agronomia do Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde. A sessão foi aberta pelo(a) presidente da Banca Examinadora, Prof. Dr. Edson Luiz Souchie, que fez a apresentação formal dos membros da Banca. A palavra, a seguir, foi concedida o(a) autor (a) da Tese para, em 40 min., proceder à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da banca arguiu o(a) examinado(a), tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se a avaliação da defesa. Tendo-se em vista as normas que regulamentam o Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias – Agronomia, e procedidas às correções recomendadas, a Tese foi APROVADA, considerando-se integralmente cumprido este requisito para fins de obtenção do título de **DOUTOR(a) EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS-AGRONOMIA**, na área de concentração Produção Vegetal Sustentável no Cerrado, pelo Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde. A conclusão do curso dar-se-á quando da entrega na secretaria do PPGCA-AGRO da versão definitiva da Tese, com as devidas correções. Assim sendo, esta ata perderá a validade se não cumprida essa condição, em até **60** (sessenta) dias da sua ocorrência. A Banca Examinadora recomendou a publicação dos artigos científicos oriundos dessa Tese em periódicos de circulação nacional e/ou internacional, após procedida as modificações sugeridas. Cumpridas as formalidades da pauta, a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de Tese de Doutorado, e para constar, eu, Vanilda Maria Campos, secretária do PPGCA-AGRO, lavrei a presente Ata, que, após lida e achada conforme, será assinada pelos membros da Banca Examinadora em três vias de igual teor.

  
Prof. Dr. Alaerson Maia Geraldine  
Avaliador interno  
IF Goiano – Campus Rio Verde

  
Prof. Dr. Nelmicio Furtado da Silva  
Avaliador externo  
IESRIVER – Faculdade Objetivo

  
Prof. Dr. Edson Luiz Souchie  
Presidente da banca  
IF Goiano – Campus Rio Verde

  
Profa. Dra. Cássia Cristina Fernandes Alves  
Avaliadora externa  
IF Goiano – Campus Rio Verde

  
Prof. Dr. José Milton Alves  
Avaliador externo  
IF Goiano – Campus Rio Verde

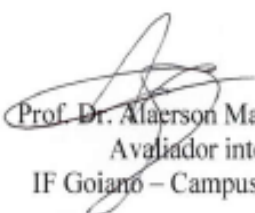
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
GOIANO – CAMPUS RIO VERDE  
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
AGRÁRIAS-AGRONOMIA


ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Psidium guajava*: CONTROLE DE  
*Sclerotinia sclerotiorum* EM SOJA, ATIVIDADE BACTERICIDA E  
ANTICARIOGÊNICA

Autora: Elizabeth Aparecida Josefi da Silva  
Orientador: Dr. Edson Luiz Souchie

TITULAÇÃO: Doutorado em Ciências Agrárias-Agronomia - Área de  
Concentração em Produção Vegetal Sustentável no Cerrado


APROVADA em 30 de julho de 2019.

  
Prof. Dr. Alcaerson Maia Geraldine  
Avaliador interno  
IF Goiano – Campus Rio Verde

  
Prof. Dr. Nelmião Furtado da Silva  
Avaliador externo  
IESRIVER – Faculdade Objetivo

  
Profa. Dra. Cassia Cristina Fernandes Alves  
Avaliadora externa  
IF Goiano – Campus Rio Verde

  
Prof. Dr. José Milton Alves  
Avaliador externo  
IF Goiano – Campus Rio Verde

  
Prof. Dr. Edson Luiz Souchie  
Presidente da banca  
IF Goiano – Campus Rio Verde

*A Deus, pelas bênçãos concedidas:*

*Aos meus pais Fernando e Nelci, por todo amor e dedicação:*

*Ao meu irmão Gustavo, por tudo que significa para mim:*

*Ao meu esposo Ernany, pelo amor, paciência e compreensão nos momentos de ausência,*

*Com Amor,*

## AGRADECIMENTOS

Desafio tão grande quanto escrever esta Tese, foi utilizar apenas duas páginas para agradecer às pessoas que fizeram parte desta minha trajetória de 4 anos (duração do doutorado), mas que completa 13 anos no Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde.

Sempre achei esta a pior parte da Tese para escrever, talvez porque a vida não se coloca em análise de regressão e não é pelo *valor p* que descobrimos a significância das pessoas em nossa trajetória.

Agradeço primeiramente a Deus, por estar comigo em todos os momentos de minha vida me guiar, iluminar e dar tranquilidade para seguir em frente com meus objetivos e não desanimar com as dificuldades. Só Ele sabe quantas vezes pensei em desistir.

Agradeço a minha família, irmão, queridos pais e queridos sogros que me incentivaram e apoiaram nos momentos difíceis e me orientaram e apoiaram nos estudos. Obrigado por entenderem minhas faltas e momentos de afastamento e reclusão. Obrigado por mostrarem o quanto era importante estudar, mesmo sem terem tido esta mesma oportunidade no passado.

Agradeço imensamente ao meu esposo Ernany, por me apoiar, incentivar e ajudar em alguns experimentos com todo carinho e amor. O tempo todo ao meu lado, incondicionalmente. Nos momentos mais difíceis, que não foram raros nestes últimos anos, sempre me fez acreditar que chegaria ao final desta difícil, porém gratificante etapa. Este período nos mostrou a verdade sobre nosso relacionamento: somos uma Família! Sou grata por cada gesto carinhoso, cada sorriso, e cada bronca também e ansiosa por estar ao seu lado, o resto da minha vida.

Ao meu querido orientador Dr. Edson Luiz Souchie, pela confiança em me orientar neste projeto que sempre acreditou em minha capacidade intelectual, confiou em meu potencial para ingressar na pesquisa e muito me ensinou com dedicação, sabedoria e, principalmente, pela sua eterna amizade.

Agradeço a minha querida Coorientadora e professora, Dr<sup>a</sup>. Cassia Cristina Fernandes Alves. Resumi-la à coorientadora é muito pouco e tenho certeza de que ela sente a importância que teve e tem para mim, não só no auxílio da condução do trabalho, mas também como conselheira e até nas horas que parece que nada está dando certo e que preciso não só de um consolo, mas de um colo. Agradeço pela amizade que completa 12 anos, desde as aulas do Técnico em Alimentos, por onde nos conhecemos.



Ao professor Dr. José Milton Alves, pela paciência, ensinamentos e colaboração.

Ao professor Dr. Alaerson Maia Geraldine, pela colaboração e ensinamentos como também a todos de seu Laboratório pela paciência e colaboração para realização dos experimentos.

À Larissa e ao Weber, meus alunos de Iniciação científica, pela imensa colaboração na coleta das folhas e extração do óleo essencial, como também pela ajuda na realização dos experimentos.

Aos meus colegas do Laboratório de Química de Produtos Naturais e do Laboratório de Microbiologia Agrícola: Ana Carolina, Josemar, Cíntia e de todos os outros que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos meus colegas de Doutorado, que não irei citar nomes para não esquecer de ninguém, obrigada pelos momentos compartilhados nessa jornada.

A todos os professores da Pós-Graduação em Ciências Agrárias - Agronomia, cujas disciplinas contribuíram para realização desta pesquisa através de inúmeras leituras, discussões e trabalhos, recebam minha admiração, respeito e meu muito obrigado. Apesar de me tirarem o sono - pensa numa Química estudando Fisiologia Vegetal – obrigado porque, ao final, deu tudo certo.

À FAPEG e CAPES, pela concessão da bolsa de estudos, providencial para viabilizar o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias - Agronomia e ao IF Goiano – Campus Rio Verde, pela oportunidade de aprimoramento profissional, intelectual e pessoal.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para mais uma etapa de minha vida.

Obrigada!

## **BIOGRAFIA DA AUTORA**

ELIZABETH APARECIDA JOSEFI DA SILVA, filha de Fernando Carlos da Silva e Nelci Maria Josefi, nasceu no dia 18 de novembro de 1988, na cidade de Uruará, Pará. Em dezembro de 2005, concluiu o ensino médio no Colégio Metropolitano em Goiânia. Em 2006, iniciou no curso Técnico em Alimentos pelo CEFET – Rio Verde, concluindo-o em 2007. No IF Goiano - Campus Rio Verde, graduou-se em Licenciatura e Bacharelado em Química (2012), tornou-se Mestre em Agroquímica (2015) e Doutora em Ciências Agrárias – Agronomia (2019). Em julho de 2014, ingressou no curso de Bacharelado em Agronomia no IF Goiano - Campus Rio Verde, com formação prevista para julho de 2020.

# ÍNDICE

	Página
AGRADECIMENTOS .....	ix
BIOGRAFIA DA AUTORA.....	xi
ÍNDICE DE TABELAS.....	xiv
ÍNDICE DE FIGURAS .....	xv
LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACÕES E UNIDADES .....	xvi
RESUMO.....	xviii
ABSTRACT .....	xx
1. INTRODUÇÃO .....	22
1.1. REVISÃO DE LITERATURA .....	24
1.2. Goiabeira ( <i>Psidium guajava</i> L.).....	24
1.3. Bioatividade dos óleos essenciais .....	26
1.4. Emulsões .....	29
1.5. Mofo Branco - <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> .....	31
1.6. Referências Bibliográficas .....	34
2. OBJETIVOS .....	46
2.1. Geral.....	46
2.2. Específicos .....	46
3. CAPÍTULO I – Ação antifúngica do óleo essencial das folhas de <i>Psidium guajava</i> <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> no controle de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> em plantas de soja .	47
RESUMO .....	47
ABSTRACT.....	48
3.1. INTRODUÇÃO .....	48
3.2. MATERIAL E MÉTODOS .....	50
O Material Vegetal .....	50
Extração do óleo essencial .....	50
Emulsão contendo óleo essencial de <i>Psidium guajava</i> .....	51
Microcápsulas contendo óleo essencial de <i>Psidium guajava</i> .....	51
Cultura do fungo <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> .....	51
Material vegetal <i>Glycine max</i> .....	51
Teste da folha destacada.....	52

Teste antifúngico <i>in vivo</i> em soja.....	52
Análise estatística.....	53
3.3.    RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
3.4.    CONCLUSÃO.....	58
3.5.    AGRADECIMENTOS.....	58
3.6.    REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58
4.    CAPÍTULO II – Anticariogenic and antiproliferative activities of the fresh leaf essential oil of <i>Psidium guajava</i> L. (Myrtaceae) .....	62
Abstract.....	62
Resumo .....	63
4.1.    Introduction.....	63
4.2.    Material and Methods .....	64
4.2.1.    Plant material.....	64
4.2.2.    Essential oil extraction .....	65
4.2.3.    Chemical analysis of essential oil.....	65
4.2.4.    Antibacterial assays .....	65
4.2.5.    Cell lines and culture conditions .....	66
4.2.6.    Antiproliferative assay.....	66
4.3.    Results and Discussion.....	67
Table 1.....	67
Table 2.....	68
Table 3.....	69
4.4.    Conclusion.....	69
4.5.    References.....	69

## ÍNDICE DE TABELAS

	Página
Tabela 1 - Constituintes do óleo essencial das folhas de <i>Psidium guajava</i> . ....	53
Table 1 - Compounds identified in the leaf essential oil of <i>P. guajava</i> (Myrtaceae).....	73
Table 2 - Anticariogenic activity of <i>P. guajava</i> leaves (PG-EO) essential oil against oral bacteria.....	73
Table 3 - IC <sub>50</sub> and selectivity index (SI) of <i>P. guajava</i> leaves (PG-EO) essential oil against diferent cell lines.....	74

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1</b> - Esquema simplificado dos tipos de emulsões.....	30
<b>Figura 2</b> - Sintomas e sinais de mofo-branco em hastes de soja, causados por <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> . .....	32
<b>Figura 3</b> - Estutura dos escleródios do mofo branco. ....	33
<b>Figura 1</b> - Percentual de inibição micelial da emulsão e das microcápsulas contendo óleo essencial de folhas de goiabeira a 300µL/mL sobre o fungo <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> . Controle 1 (controle negativo microcápsulas), controle 2 (controle negativo emulsão).....	55
<b>Figura 2</b> - Percentual de inibição micelial <i>in vivo</i> em folhas de soja da emulsão contendo óleo essencial de folhas de goiabeira sobre o fungo <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> .....	56

## LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACÕES E UNIDADES

°C .....	Graus Celsius	Temperatura
% .....	Porcentagem	Percentual
µL .....	Microlitro	Volume
m .....	Metro	Comprimento
Cm .....	Centímetro	Comprimento
µm .....	Micrômetro	Comprimento
mL .....	Mililitro	Volume
g .....	Gramas	Massa
Kg.....	Quilogramas	Massa
b.u.....	Base úmida	Umidade
C.V .....	Coefficiente de variância	Estatística
CG .....	Cromatografia gasosa	Análise
CG/EM .....	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas	
CG-DIC .....	Cromatografia gasosa acoplada ao detector de ionização de chamas	
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> .....	Diclorometano	Solvente
CO <sub>2</sub> .....	Dióxido de carbono	Gás
C-C.....	Carbono- carbono	Ligação
h.....	Horas	Tempo
m/v.....	Massa/volume	Medida
eV .....	Eletronvolt	Energia
He .....	Hélio	Gás
IK .....	Índice de Kovats	Identificação
kPa.....	Quilopascal	Pressão
m s <sup>-1</sup> .....	Metro por segundo	Tempo
m/z.....	Massa/carga	Energia
m <sup>3</sup> .....	Metro cúbico	Volume
mg .....	Miligramma	Massa
min .....	Minuto	Tempo
mL.min <sup>-1</sup> .....	Mililitro por minuto	Vazão
T.....	Temperatura	Temperatura
mm.....	Milímetro	Comprimento
PIC.....	Percentual de inibição de crescimento	
BDA.....	Batata dextrose ágar	
UR.....	Umidade relativa	
Rt.....	Tempo de retenção	
<i>P. guajava</i> .....	<i>Psidium guajava</i>	
<i>S. sclerotiorum</i> .....	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	
Ss BRM 29673, 29870.....	Código do fungo	
<i>C. albicans</i> .....	<i>Candida albicans</i>	
<i>C. Krusei</i> .....	<i>Candida kusei</i>	
<i>C. parapsilosis</i> .....	<i>Candida parapsilosis</i>	
<i>C. tropicalis</i> .....	<i>Candida tropicalis</i>	
<i>S. aureus</i> .....	<i>Staphylococcus aureus</i>	
<i>S. anatum</i> .....	<i>Staphylococcus anatum</i>	

LASA.....	Laboratório de Análise e Síntese de Agroquímicos
$\alpha$ .....	Alfa
$\beta$ .....	Beta
$\delta$ .....	Delta
$\gamma$ .....	Gama



## RESUMO

SILVA, ELIZABETH APARECIDA JOSEFI. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde – GO, julho de 2019. **Óleo essencial das folhas de *Psidium guajava*: controle de *Sclerotinia sclerotiorum* em soja, atividade bactericida e anticariogênica.** Orientador: Edson Luiz Souchie. Coorientadora: Cassia Cristina Fernandes Alves.

O gênero *Psidium* que pertence à família *Myrtaceae* abriga diversas espécies importantes, como a goiabeira (*Psidium guajava* L.). O óleo essencial (OE) das folhas desta planta tem levado a diversos estudos pela sua composição química e por suas propriedades, destacando-se sua atividade antimicrobianas, e sua ação antifúngica. Esta vem sendo comprovada sobre fungos fitopatogênicos como o *Sclerotinia sclerotiorum*, causador da doença mofo branco, que é uma das mais importantes na cultura da soja e possui difícil controle, pois uma vez instalada na lavoura é de difícil erradicação. Com este trabalho, objetivou-se testar o OE das folhas de *Psidium guajava*, na forma de emulsão, e determinar seu efeito fungicida no controle do fungo *Sclerotinia sclerotiorum* *in vivo*, na cultura da soja, bem como avaliar sua atividade anticariogênica e antitumoral. A extração do OE foi realizada por hidrodestilação e sua composição analisada por CG-EM. Para aplicação do OE sobre o micro-organismo foram utilizados dois veículos, por emulsão, e por microcápsulas a 300  $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ . O teste *in vivo* em plantas de soja foi realizado utilizando a emulsão em discos de 7 mm do fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, que foram incubadas a 22°C e 90% UR e observadas até o crescimento total do controle negativo. Como controle negativo, foi utilizado apenas o fungo sem nenhum tratamento e, como positivo, o fungicida frowcide. O teste em folha destacada foi realizado seguindo a mesma metodologia descrita para o teste *in vivo*, tanto para emulsão quanto para as microcápsulas. Foram identificados como compostos majoritários no OE o *trans*-cariofileno e  $\alpha$ -humuleno. As microcápsulas no teste da folha destacada possibilitaram taxa de inibição micelial do mofo branco de 34,6%, enquanto a emulsão possibilitou 96,4% e 92,5% no teste *in vivo* em plantas de soja, comprovando seu potencial antifúngico. Em um segundo momento foi realizada a atividade anticariogênica do OE

das folhas de *P. guajava* foi determinada em termos de suas concentrações mínimas inibitórias (MIC), usando o método de microdiluição em caldo em microplacas de 96 cavidades. O OE das folhas de *Psidium guajava* teve atividade moderada contra *Streptococcus mutans* (MIC = 200 µg / mL), *S. mitis* (MIC = 200 µg / mL), *S. sanguinis* (MIC = 400 µg / mL), *S. sobrinus* (MIC = 100 µg / mL) e *S. salivarius* (MIC = 200 µg / mL). A atividade antiproliferativa foi avaliada em linhagens de células tumorais: adenocarcinoma de mama (MCF-7), adenocarcinoma cervical humano (HeLa) e glioblastoma humano (M059J). Foi incluída uma linha celular humana normal (GM07492A, fibroblastos pulmonares). A atividade antiproliferativa foi avaliada, utilizando o ensaio XTT e os resultados expressos como IC50. As linhas MCF e M059J mostraram menores valores de IC50 que os obtidos para a linha normal, mostrando seletividade. Tais resultados sugerem que o OE de *Psidium guajava* L. tem atividades biológicas promissoras e pode ser considerado uma nova fonte de compostos bioativos.

PALAVRAS-CHAVE: Atividade antifúngica, mofo branco, goiaba, metabólitos secundários.

## ABSTRACT

SILVA, ELIZABETH APARECIDA JOSEFI. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde, July 2019. ***Psidium guajava* leaf essential oil: *Sclerotinia sclerotiorum* control in soybean, bactericidal and anticariogenic activity**  
Advisor: Edson Luiz Souchie. Co-advisor: Cassia Cristina Fernandes Alves.

The genus *Psidium* belonging to the family Myrtaceae comprises several important species, such as guava (*Psidium guajava* L.). The essential oil (EO) from leaves of this plant, has led to several studies due to its chemical composition and properties, highlighting its antimicrobial activity, and antifungal action. This has been proven on phytopathogenic fungi such as *Sclerotinia sclerotiorum*, which causes the white mold disease, which is one of the most important in soybean crop and also of difficult control. Once installed in the field, it is difficult to eradicate. The objective of this work was to test the EO of *Psidium guajava* leaves as emulsion and to determine its fungicidal effect on control of fungus *Sclerotinia sclerotiorum* *in vivo* in soybean, as well as to evaluate its anticaryogenic and antitumor activity. EO extraction was performed by hydrodistillation and its composition analyzed by GC-MS. For the EO application on the microorganism, two vehicles were used, emulsion and by microcapsules at 300  $\mu\text{l.mL}^{-1}$ . The *in vivo* test on soybean plants was performed using the emulsion over 7 mm *Sclerotinia sclerotiorum* fungus discs, which were incubated at 22 °C and 90% RH and observed until the total negative control growth. As negative control, only the untreated fungus was used and, as positive control, the frowcide fungicide. The detached leaf test was performed following the same methodology as described for the *in vivo* test for both emulsion and microcapsules. The major EO compounds were trans-caryophyllene and  $\alpha$ -humulene. The microcapsules in the detached leaf test allowed 34.6% white mold mycelial inhibition rate, while the emulsion allowed 96.4% and 92.5% *in vivo* test in soybean plants, proving its antifungal potential. Secondly, the EO anticancer activity of *P. guajava* leaves was determined in terms of their minimum inhibitory concentrations (MIC) using the broth microdilution method in 96-well microplates. The EO of *Psidium guajava* leaves had moderate activity against *Streptococcus mutans* (MIC = 200  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ), *S. mitis* (MIC =

200 µg / mL), *S. sanguinis* (MIC = 400 µg / mL), *S. sobrinus* ( MIC = 100 µg / mL) and *S. salivarius* (MIC = 200 µg / mL). Antiproliferative activity was evaluated in tumor cell lines: breast adenocarcinoma (MCF-7), human cervical adenocarcinoma (HeLa) and human glioblastoma (M059J). A normal human cell line (GM07492A, pulmonary fibroblasts) was included. Antiproliferative activity was evaluated using the XTT assay and results expressed as IC<sub>50</sub>. The MCF and MO59J lines showed lower IC<sub>50</sub> values than those obtained for the normal line, showing selectivity. These results suggest that EO *Psidium guajava* L. has promising biological activities and may be considered a new source of bioactive compounds.

**KEYWORDS:** antifungal activity, white mold, guava, secondary metabolites.

## 1. INTRODUÇÃO

Dentro do gênero *Psidium* pode-se destacar a goiabeira (*Psidium guajava* L.) que pertence à família *Myrtaceae*, que possui cerca de 3.800 espécies sendo apontada como uma das maiores famílias botânicas (LANDRUM E KAWASAKI, 1997; OLIVEIRA, 2018). A goiabeira é considerada uma planta nativa do México se estendendo por toda a América do Sul, Europa, África e Ásia (SHAH et al., 2011; ETEMADIPOOR et al., 2019). Ela cresce em todas as regiões tropicais e subtropicais do mundo, adapta-se as diferentes condições climáticas e está amplamente difundida e bem adaptada no território brasileiro, inclusive no Domínio Cerrado (AMORIM et al., 2017; ETEMADIPOOR et al., 2019).

A goiabeira é uma espécie bastante utilizada na medicina popular, suas cascas têm sido empregadas no tratamento de diarreia em crianças; as folhas são usadas para o alívio da tosse, distúrbios pulmonares, feridas, úlceras, agente hipoalergênico e analgésica e o fruto utilizado como tônico, laxante e anti-helmíntico (FLORES et al., 2015; NUNES et al., 2016). Resultados comprovam que os extratos de suas folhas possuem propriedades antimicrobianas, antimutagênica, atividade hipoglicêmica, hepatoprotetora, anti-inflamatória, antioxidante, antinociceptiva, antidiabéticos, antiproliferativa (NORA et al., 2014; SILVA et al., 2019; VASCONCELOS et al., 2017) entre outras. Ademais, seus extratos e óleos essenciais têm mostrado atividade inibitória *in vitro* para diferentes microrganismos dentre eles bactérias e fungos, incluindo *Sclerotinia sclerotiorum* (GONÇALVES et al., 2008; MENEZES, 2013; SILVA et al., 2018).

Os fungos fitopatogênicos possuem expressivo potencial para causar perdas nas lavouras já que, em sua maioria, produzem grandes quantidades de esporos, podem ser disseminados facilmente por longas distâncias, levam plantas à morte e são de difícil erradicação (VELOSO, 2016). Tais fungos são responsáveis por grandes perdas agrícolas em todo o mundo, gerando considerável impacto negativo na economia, com perdas de produtividade entre 30-60% em culturas de interesse econômico, como a soja, milho, arroz, trigo, cana-de-açúcar, café, entre outros (VELOSO, 2016).

O fungo *Sclerotinia sclerotiorum* é um fungo fitopatogênico causador de uma doença chamada mofo branco, de expressiva importância em grandes culturas, como a soja. É considerada a segunda doença mais importante nesta cultura, atrás apenas da ferrugem asiática, e que se traduz em grande desafio para ser controlada, devido ao seu desenvolvimento e resistência em culturas de interesse econômico no Brasil

(MACHADO, 2017). Há relatos de reduções de 21% na produtividade da soja que em lavouras isoladas pode chegar a 70% (MEYER et al., 2015).

Desde os primeiros relatos da agricultura, os produtores buscam por alternativas para o controle de organismos nocivos às plantas e grande quantidade de fungicidas convencionais é utilizada para combater estes fungos, sendo muitos destes compostos nocivos ao homem e ao ambiente. O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de alimentos, algodão, celulose e biocombustíveis, sendo líder no mercado do agronegócio, mas também é o maior consumidor mundial de agrotóxicos para o controle de pragas e doenças agrícolas (PIGNATI et al., 2017). Por isso, é necessária a busca de estratégias para o controle de fungos fitopatogênicos. Tendo em vista que as plantas são fontes promissoras de compostos bioativos, que podem controlar estes organismos, diversas pesquisas com óleos essenciais e extratos brutos têm sido realizadas (ALCANTARA, 2015; HAGSTRUM E PHILLIPS, 2017; RADUNZ, 2017; TAVARES et al., 2018).

Em virtude da grande diversidade de plantas presentes na flora do Cerrado brasileiro e sabendo-se que a espécie goiabeira possui compostos biologicamente ativos e com ação fungitóxica, como relatado por SILVA et al. (2018), justificam-se estudos mais detalhados sobre estes metabólitos secundários, como também de uma forma de sua aplicação *in vivo* para gerar alternativas de controle para este fungo fitopatogênico em questão.

A veiculação de óleos essenciais para sua utilização como possível biofungicida tem sido um grande desafio devido sua volatilidade, baixa solubilidade em água, oxidação e estabilidade. Uma alternativa para este fim é a microencapsulação como também a utilização de sistemas emulsionados para veicular óleos essenciais, sendo que este último apresenta algumas dificuldades de preparação pelas características dos óleos essenciais, tornando-se um desafio obter novas formulações (SONG et al., 2015; LOPES, 2016).

Desta forma, o estudo de plantas com propriedades antifúngicas é estratégico, pois pode reduzir a dependência das culturas por fungicidas convencionais, como também reduzir o efeito tóxico de suas aplicações sobre o ambiente e à saúde humana, e as folhas de goiabeira têm se mostrado com potencial para tal fim (LIMA et al., 2010; FREITAS, 2018; SILVA et al., 2018). A forma de aplicação destes produtos naturais bioativos também deve ser estudada para melhor aproveitamento de sua ação biológica. O uso de sistemas emulsionados contendo óleos essenciais pode ser uma alternativa para a veiculação do óleo essencial de *Psidium guajava* para a aplicação na cultura da soja.

## 1.1. REVISÃO DE LITERATURA

A utilização de plantas medicinais é uma das mais antigas armas empregadas no tratamento de enfermidades e combate a doenças e pragas na agricultura. Seu uso vem através da sabedoria popular, e este conhecimento vem sendo transmitido de geração em geração (BRUNING et al., 2012; LOPES, 2016).

As plantas são ricas fontes de produtos biologicamente ativos que podem gerar novos produtos. Alguns dos constituintes isolados de folhas, raízes, caule, flores e frutos são os princípios ativos responsáveis pelas ações, analgésicas, antimicrobianas, antifúngicas, antiproliferativas e antialérgicas (CARNEIRO et al., 2015). Assim, este fato instigou a pesquisa sobre plantas medicinais em diversas áreas como agronomia, botânica, farmacologia e fitoquímica, visando seu aperfeiçoamento. Contudo, o conhecimento é escasso sobre a composição química de 99,6% das plantas da flora brasileira, estimadas entre 40 a 55.000 espécies (BANDEIRA, 2011). Neste contexto, destaca-se a flora da região do Cerrado brasileiro que possui uma das maiores diversidades taxonômicas e bioquímicas do planeta (PEREIRA et al., 2009; FREITAS, 2018), para a descoberta de novos compostos químicos capazes de controlar o desenvolvimento de fitopatógenos.

O fato que gera interesse nos produtos encontrados na natureza é que esses possuem alta diversidade em termos de estrutura e propriedades físico-químicas e biológicas. A diversidade molecular dos produtos naturais é muito superior àquela derivada dos processos de síntese que, apesar dos avanços consideráveis, ainda é muito limitada. Portanto, surge a necessidade de novos estudos com plantas produtoras de óleos essenciais, como o presente estudo focado no uso do óleo essencial extraído das folhas da goiabeira e aplicado em sistema emulsionado para aplicação *in vivo* na soja como possível agente de controle para *Sclerotinia sclerotiorum*.

## 1.2. Goiabeira (*Psidium guajava* L.)

A goiabeira pertence à família *Myrtaceae*, sendo composta por mais de 70 gêneros e 2.800 espécies, distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, principalmente na América, Austrália e Peru (FENG et al., 2015; THORNHILL et al., 2015; DIAZ-DE-CERIO et al., 2016; AMORIM et al., 2017). O gênero *Psidium* apresenta cerca de 120-150 espécies, dentre as quais destacam-se *P. guajava* L.(goiaba), *P.*

*catleyanum* Sabine (araçá-doce, araçá-de-praia ou araçá-de-coroa) e *P. guineense* Swartz ou *P. araçá* Raddali (araçá-verdadeiro ou araçá-azedo) (FENG et al., 2015).

A goiabeira apresenta em forma de árvore ou arbusto pequeno, medindo entre 3 a 5 m de altura, com ramos grandes e folhas oblongas ou ovaladas, de 5 a 15 cm de comprimento, com veias pinadas proeminentes e possuem em sua estrutura canais oleríferos em que está armazenado o seu óleo essencial (SANTOS, 2017).

No Brasil, a goiabeira é cultivada em escala comercial em quase todas as regiões, com destaque para os Estados de São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Bahia, Pernambuco, Paraíba, Goiás, Rio Grande do Sul e Paraná, sendo o país o terceiro maior produtor mundial desta fruta (BATISTA et al., 2015; CARAMÊS et al., 2017; TAVARES et al., 2018). Nessas regiões, são encontradas, aproximadamente 3.024 espécies conhecidas, distribuídas e cultivadas principalmente em países de clima tropical e subtropical, pela sua capacidade de dispersão e rápida adaptação aos diferentes ambientes.

Alguns autores relatam que a goiabeira é nativa do Brasil, de onde foi levada para todas as regiões tropicais e subtropicais do mundo, em razão de sua fácil adaptação às diferentes condições edafoclimáticas, bem como da facilidade de propagação por meio de sementes (GONZAGA e SOARES, 1994).

A utilização do chá das folhas de goiabeira é popularmente conhecida, sendo utilizado contra cólica e diarreias, inflamação gastrointestinais, hipertensão, diabetes, tosse, doenças pulmonares, antitérmico, bronquite, laxante, sangramento nas gengivas, cólera, reduzir vômitos, atividade antimicrobiana, atividade anti-inflamatória, anticárie, no tratamento de feridas oculares, anticancerígenas e hepaprotetora, efeitos comprovados com inúmeros estudos a esse respeito (ALMEIDA et al., 1995; LOZOYA et al., 2002; BEGUM et al., 2002; OH et al., 2005; FERNANDES et al., 2014; FLORES et al., 2015; FENG et al., 2015; DIAZ-DE-CERIO et al., 2017; JIAO et al., 2017; BORAH et al., 2019).

A análise da composição química do extrato das folhas revelou a presença de aminoácidos, triterpenos e esteroides, ácidos, fenóis e saponinas (CUELLAR et al., 1984; SANTOS et al., 2017; BORAH et al., 2019) e de importantes carotenoides (MERCADANTE et al., 1999; SANTOS et al., 2017; BORAH et al., 2019). Estudos revelam que os óleos essenciais extraídos das folhas de goiabeira apresentam inúmeras atividades, dentre elas ação antimicrobiana contra vários micro-organismos, como *Candida albicans*, e contra algumas bactérias como *Staphylococcus aureus*



(NASCIMENTO et al., 2000; SANTOS et al., 2017; BORAH et al., 2019). Também possuem poder antioxidante, pela presença de vitaminas, carotenoides polifenóis e, principalmente, de ácido ascórbico (SANTOS et al., 2017; BORAH et al., 2019).

Nas folhas de goiabeira, também foram encontrados ácidos voláteis, (E)-ácido cinâmico e (Z)-3-ácido hexenoico (IDSTEIN et al., 1985) e ácidos graxos (OPUTE, 1978; BORAH et al., 2019). No óleo essencial, foram encontrados vários compostos como  $\alpha$ -pineno, p-9-mentenol, trans-cariofileno,  $\beta$ -bisaboleno,  $\alpha$ -humuleno,  $\alpha$ -santaleno, d-limoneno, óxido de cariofileno, eugenol, mirceno, aromadendreno,  $\beta$ -selineno e 1,8-cineol (CRAVEIRO et al., 1981; PINO et al., 2001; SILVA, 2015; ARAIN et al., 2017; BORAH et al., 2019), sendo que estudos comprovaram a eficácia do 1,8-cineol como potente antimicrobiano e antifúngico. Dessa forma, no óleo essencial das folhas de *Psidium guajava* existe um potencial antifúngico, antimicrobiano a ser estudado.

### **1.3. Bioatividade dos óleos essenciais**

As plantas medicinais produzem uma variedade de compostos orgânicos, dentre eles estão os metabólitos secundários, podendo citar os óleos essenciais (MARTINS et al., 2010; MENDES et al., 2018; VAZQUEZ et al., 2019), que são considerados fontes para o desenvolvimento de novos produtos naturais que são utilizados como antibacterianos, anticancerígenos, analgésicos, sedativos, expectorantes, estimulantes, antioxidantes, inseticidas, antiviral etc, e na composição de diversos medicamentos (PEDROSA, 2016; RAMOS et al., 2017; SOUZA et al., 2017; MENDES et al., 2017; KUMAR et al., 2019). Além de possuir atividade direta sobre fitopatógenos como bactérias, nematoides e fungos, possuem ação indireta, ativando mecanismos de defesa das plantas aos patógenos (MENDES et al., 2018; VAZQUEZ et al., 2019).

Denominado como “Quinta Essência” pelo suíço Paracelsus von Hohenheim, a palavra óleo essencial foi utilizada para referenciar um componente ativo de uma droga (GUENTHER, 1950). São compostos orgânicos de baixo peso molecular, muito voláteis e sintetizados pelo metabolismo secundário das plantas, como uma forma de defesa contra predadores e micro-organismos patogênicos. Podem ser obtidos de diversas partes da planta, como folhas, raízes, caule, flores, frutos e sementes. Os óleos essenciais apresentam qualidade, quantidade e composição de acordo com a região e clima que a planta se encontra, do órgão coletado, da idade da planta, do método de extração do

mesmo, entre outros fatores (PEDROSA et al., 2016; KUMAR et al., 2019; SOUZA et al., 2017; MENDES et al., 2018; VAZQUEZ et al., 2019).

Os constituintes dos óleos essenciais são uma mistura muito complexa em que se tem a mistura de diversos componentes com concentrações distintas, distribuída em quatro grandes grupos: terpenos, terpenoides, fenilpropanos e outros. A classe dos terpenos e terpenoides são responsáveis geralmente pela alta atividade antifúngica e antibacteriana dos óleos essenciais (DA SILVA et al., 2017; MENDES et al., 2018; KUMAR et al., 2019; VAZQUEZ et al., 2019).

A habilidade dos óleos essenciais em se difundir através da parede celular e membrana plasmática de patógenos é pela sua constituição hidrofóbica podendo alterar estruturas de polissacarídeos, ácidos graxos e fosfolípidos e com suas propriedades antioxidantes, causando a lise celular tornando plausíveis a sua utilização contra estes. Os compostos geralmente responsáveis por estas propriedades são: 1,8 cineol, timol, carvona, carvacrol (SHAO et al., 2013; MARQUES, 2014; MENDES et al., 2017).

Atualmente, as doenças de plantas são responsáveis por relevantes perdas na agricultura, podendo chegar a perdas entre 20 a 100% da safra anual. Tais perdas podem reduzir o fornecimento de alimento, gerar produtos agrícolas de baixa qualidade, elevar os preços e comprometer economicamente o produtor (CASTRO et al., 2016; MACHADO, 2017).

Como tentativa para evitar as perdas causadas pelas doenças e pragas agrícolas, o controle destas é realizado de maneira tradicional com o controle químico que nem sempre são eficazes ou economicamente viáveis, além dos riscos que oferecem ao ambiente e ao ser humano (MENDES et al., 2017). O uso indiscriminado e excessivo de agrotóxicos gera crescente resistência de doenças e pragas aos mesmos, aumentando a dependência de insumos químicos por parte de produtores (COUTINHO, 1996). A redução na utilização de agrotóxicos no controle de doenças de plantas é uma necessidade atual, econômica e ambiental (SCHWAN-ESTRADA et al., 2000), o que têm motivado pesquisas a formulação de novos princípios ativos, formando um ciclo vicioso de alto custo econômico e ambiental, contaminação e degradação de solos e águas, redução da biodiversidade e desequilíbrios ecológicos, levando à insustentabilidade dos sistemas de produção agrícola (COUTINHO, 1996; MENDES et al., 2017).

Frente a estes problemas, a necessidade de se preservar o ambiente tem instigado o estudo de produtos naturais, visando um controle alternativo de fitopatógenos. Metabólitos secundários que estão presentes no extrato bruto ou óleo essencial em plantas

medicinais podem desempenhar funções importantes em interações planta-patógeno, através da ação antimicrobiana direta, ou indireta, ativando mecanismos de defesa das plantas que venham a ser tratadas com estes compostos (SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN, 2000; VAZQUEZ et al., 2019; MENDES et al., 2017; MENDES et al., 2018). Os óleos essenciais são compostos biodegradáveis, seguros, viáveis e eficientes no controle de fitopatógenos, e contribuem para a diminuição das perdas de produtividade e redução dos custos de produção (COSER, 2018).

Dentre as plantas medicinais que apresentam características farmacológicas, pode-se destacar a família Myrtaceae. Dentre as espécies, destacam-se a goiabeira, já que suas folhas apresentam taninos, óleos essenciais, triterpenoides,  $\beta$ -sitosterol, flavonoides fenóis, saponinas, carotenoides, lectinas, vitaminas, fibras e ácidos graxos, resinas, glicosídeos etc (AJAIKUMAR et al., 2005; KARIAWASAM et al., 2017; SOUZA et al., 2018; WELI et al., 2018).

A goiabeira é uma planta de fácil acesso podendo ser encontrada em quintais residenciais e suas propriedades terapêuticas têm sido amplamente utilizadas na medicina popular, como estimulante, anti-inflamatório, antibacteriano, antidiarreico, antitumoral, antiproliferativo e seu óleo essencial extraído de suas folhas tem sido estudado como poderoso antifúngico contra patógenos e fitopatógenos (SCGWAN-ESTRADA et al., 2000; MANOSROI et al., 2006; WANG et al., 2017; QIN et al., 2017; SOUZA et al., 2018; NGBOLUA et al., 2018; NEGREIROS et al., 2019).

A variabilidade na produção e teor de óleos essenciais é conhecida por ser afetada por fatores ambientais tais como luz, temperatura, pluviosidade, vento, solo, latitude, altitude, estações do ano (CHAGAS et al., 2011; WANG et al., 2017; HANIF et al., 2018; NGBOLUA et al., 2018; NEGREIROS et al., 2019), como também fatores genéticos. Assim sendo, a padronização da composição e dos efeitos de extratos vegetais para o controle pragas e doenças, depende também do conhecimento deste metabolismo em cada espécie a ser utilizada bem como o conhecimento das alterações na sua composição como consequência das variações ambientais (WANG et al., 2017; HANIF et al., 2018; NGBOLUA et al., 2018; NEGREIROS et al., 2019).

Estudos relatam a utilização e a eficiência do óleo essencial extraídos das folhas de goiaba contra patógenos e fitopatógenos. Silva et al. (2019) relataram a utilização do óleo essencial para o controle de bactérias cariogênicas do gênero *Streptococcus* e como antiproliferativo em células tumorais indicando ação moderada contra as bactérias e uma fonte promissora de compostos com atividade anticancerígena, pela alta quantidade de

terpenos em sua composição. Outros autores relataram atividade antimicrobiana, antimutagênica, hipoglicêmica, antioxidante, antifúngica, repelente contra baratas, moderado efeito repelente contra o mosquito *Anopheles stephensi* Liston, atividade anti-inflamatória, efeito larvicida sobre *Aedes aegypti* (THAVARA et al., 2007; RAJKUMAR, JEBANESAN, 2007; RATTANACHAIKUNSOPON, PHUMKHACHORN, 2007; GONÇALVES et al., 2008; CHEN et al., 2010; BUVANESWARI et al., 2011; SHRUTHI et al., 2013; FLORES et al., 2015; KARIAWASAM et al., 2017; MENDES, 2017; QIN et al., 2017; WANG et al., 2017; WELI et al., 2018; HANIF et al., 2018; NGBOLUA et al., 2018; VAZQUEZ et al., 2019).

A bioatividade de óleos essenciais sobre fitopatógenos também tem sido estudada segundo dados da literatura em que os autores constataram ação antimicrobiana, antifúngica, bioinseticidas, pesticidas, bactericida de diversos óleos essenciais extraídos de plantas medicinais e, ou aromáticas (ALCANTARA, 2015; RADUNZ, 2017; TAVARES et al., 2018). O óleo essencial extraído das folhas de goiaba apresentou ação antifúngica *in vitro* sobre o fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum*, como relatado por Silva et al. (2018). Portanto, justificam-se estudos visando sua possível utilização *in vivo* contra este fungo fitopatogênico que ataca culturas de grande importância econômica como a soja.

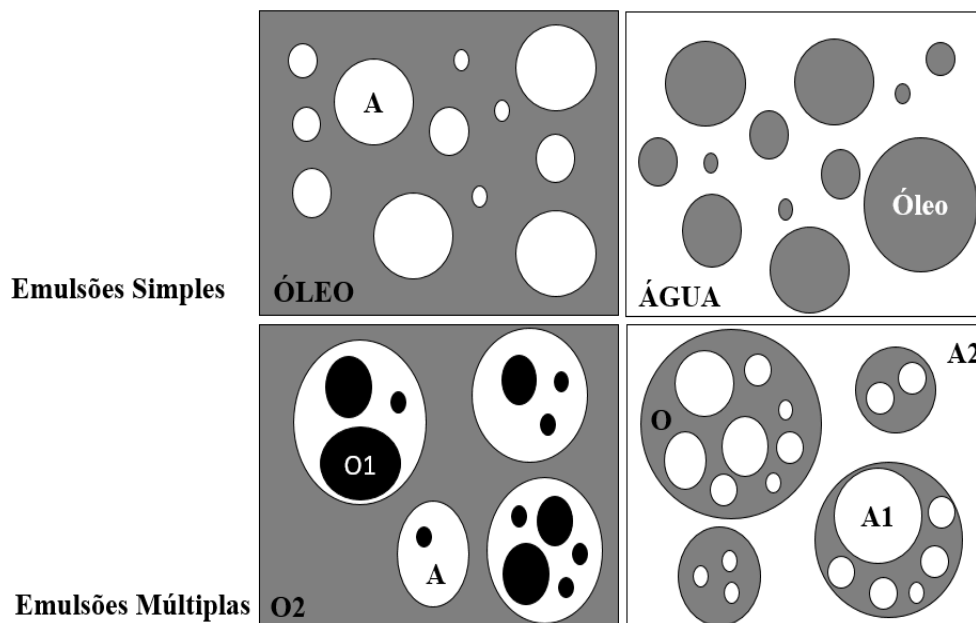
Mesmo com grande uso de plantas medicinais no Brasil, e o Domínio Cerrado apresentar alta biodiversidade e 44% da flora endêmica, essas espécies vegetais são pouco utilizadas, pela escassez de informações na literatura (CASTELO et al., 2010; PAULA et al., 2012; CORTEZ et al., 2015; CHAVES et al., 2018). Apesar de haver alguns trabalhos realizados até o momento, ainda há carência de estudos sobre as espécies de plantas medicinais no Cerrado que podem produzir óleo essencial com alto potencial antimicrobiano e antifúngico sobre fitopatógenos de importância econômica.

## **1.4.Emulsões**

Sistemas termodinamicamente instáveis e heterogêneos compostos por dois líquidos que não se misturam entre si, em que se tem uma das partes intimamente dispersa na outra em forma de gotículas esféricas são denominados emulsões, que apresentam tamanho entre 0,1 a 1 µm envolvidos por um dispersante (LI et al., 2012; LAM e NICKERSON, 2013; PEREIRA e GARCIA-ROJAS, 2015; MILLÉO et al., 2019). As

emulsões são uma alternativa para incorporar, proteger e, ou liberar compostos insolúveis ou pouco solúveis em água (PEREIRA e GARCIA-ROJAS, 2015; MILLÉO et al., 2019).

As emulsões podem ser divididas em emulsões do tipo simples e do tipo múltiplas (PEREIRA e GARCIA-ROJAS, 2015). São do tipo simples quando a emulsão contém água em óleo (A/O), e as gotículas de água estão dispersas no óleo ou quando se tem óleo em água (O/A) e as gotículas de óleo estão dispersas na água. Já as emulsões do tipo múltiplas, é quando há sistemas multicompartimentalizados, formados por três ou mais fases, como água/óleo/água (A/O/A) ou óleo/água/óleo (O/A/O) (HILL, 1996; BENICHOU et al., 2004; HERZI et al., 2014; PEREIRA e GARCIA-ROJAS, 2015; LOPES, 2016). Na Figura 1, pode-se observar a estrutura de emulsões simples e múltiplas.



**Figura 1 - Esquema simplificado dos tipos de emulsões. Fonte: Própria Autora.**

Para a estabilização das emulsões são utilizados os agentes tensoativos, que são moléculas anfífilicas que têm como a finalidade promover essa estabilidade cinética da mesma formando uma película na superfície da gotícula (PEREIRA, GARCIA-ROJAS, 2015; LOPES, 2016). A escolha desse tensoativo depende de seu EHL (Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo). Para a formação de emulsões, são utilizados geralmente tensoativos hidrofílicos com  $EHL \geq 7,0$  por terem maior afinidade para formar emulsões do tipo O/A e com  $EHL \leq 7,0$  para formar emulsões do tipo A/O, fator que influencia diretamente a estabilidade da emulsão a ser preparada (LOPES, 2016).

Os sistemas emulsionados são alternativas para liberação controlada de compostos bioativos, como a de óleos essenciais que são substâncias lipofílicas muito complexas, odoríferas, líquidos a temperatura ambiente, muito voláteis e fotodegradáveis (BRUNETON, 1999; NERIO et al., 2010; ASBAHANI et al., 2015). Para a veiculação destes compostos tão sensíveis como os óleos essenciais, a utilização de emulsões vem aumentando, pois estas são capazes de propagar o óleo essencial sem desestabilizá-lo, fornecendo maior biodisponibilidade dos compostos ativos tornando-o mais eficaz, como também, postergando o seu efeito bioativo (PEREIRA, GARCIA-ROJAS, 2015; LOPES, 2016).

### **1.5.Mofa Branco - *Sclerotinia sclerotiorum***

A soja é uma cultura de grande importância econômica mundial, e as doenças que lhe acometem são causadas por agentes bióticos e abióticos e são um dos principais empecilhos para sua produção, podendo causar danos irreversíveis à cultura e gerar grandes prejuízos aos agricultores. Para um controle eficaz dessas doenças, é necessário que se adote um manejo integrado com ações em conjunto, como o controle cultural, biológico, químico e genético (GUERRA, 2017; GOMES et al., 2017; RANJAN et al., 2019).

Dentre as principais doenças que atacam a cultura da soja, o mofa branco é a segunda mais importante, de difícil controle, ficando atrás apenas da ferrugem asiática. Desde seu surgimento em lavouras de soja brasileiras, tem causado danos, mas teve sua incidência aumentada desde a década de 1990, sendo que a infestação por escleródios deste fitopatógeno pode estar entre 23 e 100%, reduzindo a produção em até 37% (DILDEY et al., 2014; MEYER et al., 2014; GOMES, 2017). Áreas entre 100 e 300 hectares em Goiás, com incidência desta doença superior a 50%, são facilmente detectadas (FILHO, 2012; GUERRA, 2017; MACHADO et al., 2017)

O mofa branco ou podridão branca da haste que acomete a soja é causado pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, pertencente à classe dos *Ascomycetos*, subclasse *Discomycetos*, Ordem *Helotiales*, à família *Sclerotiniaceae* e ao gênero e espécie *Sclerotinia sclerotiorum*. Este é um fungo de solo, necrotrófico, cosmopolita e inespecífico que pode provocar perdas em diversas espécies, entre monocotiledôneas e dicotiledôneas (BOLAND, HALL, 1994). O ataque deste patógeno ocorre no estágio de floração da cultura, pela presença no solo dos escleródios que são as estruturas de

resistência, com tamanho de 1 a 30 mm de comprimento, geradas por este fungo e que permanecem viáveis no solo por um longo período de tempo nas condições mais adversas de temperatura, umidade, luz e nutrientes, pela presença de melanina em sua estrutura, assim conservando intacto seu poder patogênico (MC LEAN, 1958; PAVAN et al., 1997; KUHN, 2006; XIMENES, 2013; GOMES, 2017; GUERRA, 2017; WANG et al., 2018).

Quando as condições de umidade (acima de 75%) e temperatura (13 a 22 °C) estão ideais e na presença de um hospedeiro, os escleródios germinam e se reproduzem por forma miceliogênica (o próprio escleródio produz o micélio que infecta o hospedeiro) ou capogênica (ocorre a produção de apotécios que produzirão os ascósporos que se disseminam até o hospedeiro causando a infecção) (MC LEAN, 1958; PURDY, 1979; GERALDINE et al., 2010; GOMES, 2017; GUERRA, 2017; HU et al., 2018).

A doença mofo branco provoca sintomatologia que se caracteriza pelas lesões encharcadas coberta por um micélio variando de coloração de branca a parda (pardacenta), septado, muito ramificado de aspecto cotonoso na superfície dos órgãos atacados (Figura 3) (DILDEY et al., 2014; NA et al., 2018; JIA et al., 2019). Após a infecção e a formação do micélio, este produz suas estruturas de resistência que são inicialmente brancos e quando se formam totalmente, apresentam coloração preta e estrutura rígida e são denominados escleródios que se instalam tanto na superfície, como no interior das hastes e vagens infectadas, sementes infectadas tem aparência opaca e de baixo peso (Figura 4) (DILDEY et al., 2014; GUERRA, 2017; NA et al., 2018; LIU et al., 2019).



**Figura 2 - Sintomas e sinais de mofo branco em hastes de soja, causados por *Sclerotinia sclerotiorum*.  
Fonte: Arquivo pessoal**



**Figura 3 - Estrutura dos escleródios do mofo branco. Fonte: Arquivo pessoal.**

A soja é atacada pelo mofo branco, principalmente em seu estágio de floração plena e no início da formação das vagens, mas pode ser atacada em qualquer estágio de seu desenvolvimento. O que favorece sua infestação é a alta densidade de plantio, com condições favoráveis para os escleródios germinarem e, por pressão mecânica, via apressório e, ou secreção de enzimas e ácido oxálico alteram o funcionamento dos estômatos e as hifas penetram o hospedeiro. Após ocorrer a infecção nas flores de soja, os sintomas passam para as axilas das folhas, ramos e vagens, podendo afetar e levar a morte toda a planta, pois, após o aparecimento das lesões aquosas estas evoluem para podridão mole dos tecidos com crescimento do micélio branco cotonoso, assim podendo ocorrer a formação dos escleródios nas hastes e vagens da soja fora ou em seu interior, acarretando na murcha, seca e morte da planta (MC LEAN, 1958; ABAWI, GROGAN, 1979; PURDY, 1979; BOLAND, HALL, 1994; ALMEIDA et al., 2005; DILDEY et al., 2014; WUTZKI, 2017; NA et al., 2018; LIU et al., 2019).

A erradicação do mofo branco e seus escleródios uma vez instalados em uma área de cultivo é muito difícil. Desta forma, o melhor método de controle é evitar sua infestação na área de cultivo de soja. Porém, uma vez detectada a infestação deve-se tomar algumas medidas de manejo, tais como rotação de cultura, aplicação de produtos biológicos nas culturas exploradas, maior espaçamento entrelinhas, menor densidade de semeadura, cobertura do solo com palhada, época de semeadura desfavorável ao mofo branco e escolha por variedades com resistência parcial ao patógeno. Além disso, recomenda-se a aplicação de fungicidas específicos para seu controle, sendo que este último, pela sua intensiva utilização indiscriminada, tem aumentado a resistência do



patógeno aos mesmos (JACCOUD-FILHO et al., 2016; WUTZKI et al., 2016; BERGERNETO et al., 2017; NA et al., 2018; ZANATTO et al., 2018).

Os fungicidas para o mofo branco podem prevenir a infecção pelos ascósporos, mas pela alta densidade de plantio, podem não penetrar o dossel da cultura e o controle da doença não ser efetivo. Com o intensivo uso de fungicidas químicos industrializados convencionais, tem ocorrido contaminação do solo, dos alimentos, da água e do ambiente e também aumento da resistência do fitopatógeno aos mesmos (XIE et al., 2011; MEYER et al., 2015; WUTZKI et al., 2016). Isto tem favorecido a busca por métodos alternativos de controle desta doença, principalmente, com produtos vegetais, como óleos essenciais com propriedades antifúngicas que sejam eficientes e com reduzido ou isento impacto ambiental negativo (DILDEY et al., 2014, COSER, 2018).

Diversos estudos têm comprovado o efeito de metabólitos secundários, obtidos de plantas, como os óleos essenciais, demonstrando seu potencial antifúngico a fitopatógenos, incluindo *S. clerotiorum* (STANGARLIN, 1999; FERRAZ et al., 2003; ATTI-SANTOS, 2010; PANSERA et al., 2013). Por exemplo, foi comprovada a ação antifúngica do óleo essencial de *Azadirachta indica*, *Melaleuca arternifolia*, *Pongamia glabra*, *Piper aduncum*, *Psidium guajava*, *Cinnamomum* sp., *Cymbopogon* sp., *Panax ginseng*, *Salvia officinalis*, entre outros sobre o mofo branco (MARTINS et al., 2010; GARCIA et al., 2012; PANSERA et al., 2013 SILVA et al., 2018; VALADARES et al., 2018; MORAES et al., 2018).

Tendo em vista que o mofo branco é uma doença importante para a cultura da soja, no Brasil, justifica-se a busca por métodos alternativos de controle. O uso de óleo essencial, extraído das folhas de *Psidium guajava*, no controle deste fitopatógeno, motiva o desenvolvimento de pesquisas, já que sua eficácia *in vitro* foi comprovada.

## 1.6.Referências Bibliográficas

ABAWI, G.S.; GROGAN, R.G. Epidemiology of diseases caused by *Sclerotinia* species. *Phytopathology*, v.69, p.899-904. 1979.

AJAIKUMAR, K. B.; ASHEEF, M.; BABU, B. H.; PADIKKALA, J. The inhibition of gastric mucosal injury by *Punica granatum* L.(pomegranate) methanolic extract. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 96, p.171,2005.

ALCANTARA, J. M. Composição química e potencial biológico dos óleos essenciais de Annonaceae dos campi INPA e UFAM. 2015. 151f. Tese (Doutorado em Química) Universidade Federal do Amazonas – AM, 2015.

ALMEIDA, C. E.; KARNIKOWSKI, M. G.; FOLETO, R.; BALDISSEROTTO, B. *Revista Saúde Pública*, v. 29, p. 428-33, 1995.

AMORIM, A. G. N.; SOUZA, J. M. T.; SANTOS, R. C.; GULLÓN, B.; OLIVEIRA, A.; SANTOS, L. F. A. VIRGINO, A. L. E.; MAFUD, A. C.; PETRILLI, H. M.; MASCARENHAS, Y. P.; DELERUE-MATOS, C.; PINTADO, M. E.; LEITE, J. R. S. A. HPLC-DAD, ESI - MS/MS and NMR of lycopene isolated from *P. guajava* L. and its biotechnological applications. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2017.

ARAIN, A., SHERAZI, S. T. H., MAHESAR, S. A., SIRAJUDDIN. Spectroscopic and chromatographic evaluation of solvent extracted guava seed oil. *International Journal of Food Properties*, v. 20, p. 556–563, 2017.

ASBAHANI, A. E., MILADI, K., BADRI, W., SALA, M., ADDI, E. H. A., CASABIANCA, H., ELAISSARI, A. Essential oils: from extraction to encapsulation. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 483, p. 220–243, 2015.

ATTI-SANTOS, A.C.; ROSSATO, M.; SERAFINI, L.A.; BUENO, M.; CRIPPA, L.B.; SARTORI, V.; DELLACASSA, E.; MOYNA, P. *Efeito fungicida dos óleos essenciais de Schinus molle L. e Schinus terebinthifolius Raddi, Anacardiaceae, do Rio Grande do Sul. Brazilian Journal of Pharmacognosy*. v. 20, p.154-159, 2010.

BANDEIRA, J.M; BARBOSA, F. F.; BARBOSA, L. M. P.; RODRIGUES, I. C. S.; BACARIN, M. A.; PETERS, J. A.; BRAGA, E. J. B. Composição do óleo essencial de quatro espécies do gênero *Plectranthus*. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s, v.13, 2011.

BATISTA, P. F., LIMA, M. A. C., TRINDADE, D. C. G., ALVES, R. E. Quality of different tropical fruit cultivars produced in the Lower Basin of the São Francisco Valley. *Revista Ciência Agronômica*, v. 46, n. 1, p. 157-164, 2015.

BERGER-NETO, A.; JACCOUD-FILHO, D.D.S.; WUTZKI, C.R.; TULLIO, H.E.; PIERRE, M.L.C.; MANFRON, F.; JUSTINO, A. *Effect of spray droplet size, spray volume and fungicide on the control of white mold in soybeans*. *Crop Protection*, v. 92, p. 190-197, 2017.

BEGUM, S.; HASSAN, S. I.; SIDDIQUI, B. S.; SHAHEEN, F.; GHAYUR, M. N.; ANWAR H. GILANI, A. H. Triterpenoids from the leaves of *Psidium guajava*. *Phytochemistry*, v. 61, p. 399 - 403, 2002.

BENICHO, A.; ASERIN, A.; GARTI, N. Double emulsions stabilized with hybrids natural polymers for entrapment and slow release of active matters. *Advances in Colloid and Interface Science*, v.108/109, p.29-41, 2004.

BOLAND, G.J.; HALL, R. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal Plant Pathology*, v.16, p. 93–108, 1994.

BORAH, A., PANDEY, S. K., HALDAR, S., LAL, M. Chemical Composition of Leaf Essential Oil of *Psidium guajava* L. from North East India. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, v. 22, p. 248-253, 2019.

BRUNING, M. C. R.; MOSEGUI, G. B. G.; VIANNA, C. M. M., A utilização da fitoterapia e de plantas medicinais em unidades básicas de saúde nos municípios de Cascavel e Foz do Iguaçu - Paraná: a visão dos profissionais de saúde. *Ciência e Saúde Coletiva*, v.17, n.10, 2012.

BRUNETON, J. 1999. *Pharmacognosy: Phytochemistry, Medicinal Plants*. Intercept Limited, 1999.

BUVANESWARI, S.; RAADHA, C. K.; KRISHNAVENI, N.; JAYASHREE, S. *In-vitro* antimicrobial activity of *Psidium guajava* against clinically important strains, *European Journal of Legal Studies*, v.1, p. 14-22, 2011.

CARAMÊS, E. T. S.; ALAMAR, P. D.; POPPI, R. J.; PALLONE, J. A. L. Quality control of cashew apple and guava nectar by near infrared spectroscopy. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 56, p. 41-46, 2017.

CARNEIRO, F. M., M. J. P. DA SILVA, L. L. BORGES, L. C. ALBERNAZ, J. D. P. COSTA. Tendências dos estudos com plantas medicinais no brasil. *Revista Sapiência: sociedade, saberes e práticas educacionais*, v. 3, p. 44-75, 2015.

CASTELO, A. V. M.; MENSEZZI, C. H. S. D.; RESCK, I. S. Rendimento e análise espectroscópica (RMN <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C; IV) da composição química dos óleos essenciais de quatro plantas do cerrado. *Cerne*, v.16, p. 573-584, 2010.

CASTRO, L.H.S., FIGUEIRO, A. A., NOGUEIRA, A. P., CLOUGH, S. J., JULIATTI, F. C. Resistance of soybean genotypes to *Sclerotinia sclerotiorum* isolates in different incubation environments. *Genetics and Molecular Research*, v. 15, n. 4, p. 1-13, 2016.

CHAGAS, J. H.; PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V.; SANTOS, F. M., Produção de biomassa e teor de óleo essencial em função da idade e época de colheita em plantas de hortelã-japonesa, *Acta Scientiarum - Agronomy*, v. 33, p. 327-334, 2011.

CHAVES, M. R. V., OLIVEIRA, G. M. G., NETO, M. J., NEVES, F. M. L., BARBOSA, I. M. L. POTENCIAL FUNGICIDA DE PLANTAS MEDICINAIS DO CERRADO DA COSTA LESTE DO ESTADO DE MATO GROSSO DO SUL. *Resma*, v. 6, n.1, 2018.

CHEN, K.C.; PENG, C.C.; CHIU, W.T.; CHENG, Y.T.; HUANG, G.T.; HSIEH, C.L. Action mechanism and signal pathways of *Psidium guajava* L. aqueous extract in killing prostate cancer LNCaP cells, *Nutrition and Cancer*, v. 62, p. 260-270, 2010.

CORTEZ, L. E. R., YAMAGUCHI, M. U., CORTEZ, D. A. G., & PESCP, D. C. S. Avaliação da atividade antifúngica dos óleos essenciais de *Lippia alba* (Mill.) NE Brown (Verbenaceae) e *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf (Poaceae). *Mundo saúde (Impr.)*, v. 39, n. 4, p. 433-440, 2015.

COSER, E. Potencial de óleos essenciais no controle do fungo *Sclerotinia rolfsii in vitro* e em plantas de tomate. 2018. 39p. Trabalho de conclusão de curso – Agronomia- Universidade Federal de Santa Catarina – SC, 2018.

COUTINHO, H. L. C. Diversidade microbiana e desenvolvimento sustentável: diversidade microbiana e agricultura sustentável. In: **WORKSHOP SOBRE**

BIODIVERSIDADE: PERSPECTIVAS E OPORTUNIDADES TECNOLÓGICAS, 1996, Campinas, SP.

CRAVEIRO, A. A.; FERNANDES, A. G.; ANDRADE, C. H. S.; MATOS, F. J. A.; ALENCAR, J. W.; MACHADO, M. I. L. Óleos essenciais de plantas do Nordeste. [S. l.]: UFC, 1981. 210 p, 1981.

CUELLAR, A. C.; LARA, R. A.; ZAYAS, J. P. *Psidium guajava* L. Tamizaje fitoquímico y estudio del aceite esencial. Revista Cubana de Farmacia, v. 18, p. 92-99, 1984.

DÍAZ-DE-CERIO, E.; GÓMEZ-CARAVACA, A. M.; VERARDO, V.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A.; SEGURA-CARRETERO, A. Determination of guava (*Psidium guajava* L.) leaf phenolic compounds using HPLC-DAD-QTOF-MS. Journal of Functional Foods, v. 22, p. 376 - 388, 2016.

DILDEY, O.D.F.; BARBIAN, J.M.; GONÇALVES, E.D.V.; BROETTO, L.; ETHUR, L.Z.; KUHN, O.J.; BONETT, L.P. Inibição do crescimento *in vitro* de *Sclerotinia sclerotiorum*, causador de mofo branco, por isolados de *Trichoderma* spp. Revista Brasileira de Biociências, v. 12, p. 132-136, 2014.

ETEMADIPOOR, R., RAMEZANIANA, A., DASTJERDIB, A. M., SHAMOLIB, M. *The potential of gum arabic enriched with cinnamon essential oil for improving the qualitative characteristics and storability of guava (Psidium guajava L.) fruit*. Scientia Horticulturae, v. 251, p. 101-107, 2019.

FENG, X.; WANG, Z.; MENG, D.; LI, X. Cytotoxic and antioxidant constituents from the leaves of *Psidium guajava*. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, v. 25, p. 2193–2198, 2015.

FERNANDES, M. R. V.; DIAS, A. L. T.; CARVALHO, R. R.; SOUZA, C. R. F.; OLIVEIRA, W. P. Antioxidant and antimicrobial activities of *Psidium guajava* L. spray dried extracts. Industrial Crops and Products, v. 60, p. 39 – 44, 2014.

FERRAZ, L.C.L., BERGAMIN, F. A., AMORIN, L.; NASSER, L.C.B. Viabilidade de *Sclerotinia sclerotiorum* após a solarização do solo na presença de cobertura morta. Fitopatologia Brasileira, v. 28, p. 17-26, 2003.

FILHO, D.S.J. Globalizando o Problema, Fundamentando Soluções. In: ENCONTRO INTERNACIONAL DE MOFO BRANCO, 1., 2012, Ponta Grossa. Anais do 1º Encontro Internacional de Mofo Branco. Ponta Grossa: UEPG, 82 p., 2012.

FLORES, G.; WU, S.; NEGRIN, A.; KENNELLY, E. J. Chemical composition and antioxidant activity of seven cultivars of guava (*Psidium guajava*) fruits. Food Chemistry, v. 170, p. 327 - 335, 2015.

FREITAS, S. T. F. POTENCIAL DE EXTRATOS DE PLANTAS NO CONTROLE DE INSETOS-PRAGA: UM LEVANTAMENTO CIENCIOMÉTRICO E ANÁLISES DE EFEITOS BIOLÓGICOS...], 2018. 88 p. Dissertação (Mestrado em BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO) -- Instituto Federal Goiano - Campus Rio Verde, GO, 2018.

GARCIA, R.A.; JULIATTI, F.C.; BARBOSA, K.A.G.; CASSEMIRO, T.A. Antifungal activity of vegetable oils and extracts against *Sclerotinia sclerotiorum*. Bioscience Journal, v. 28, p. 48-57, 2012.

GERALDINE, A.M.; LOBO JUNIOR, M.; MARCELI, H. Influência da temperatura e da umidade do solo na germinação carpogênica e parasitismo de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum*. In: WORKSHOP DE EPIDEMIOLOGIA DE DOENÇAS DE PLANTAS, 3., 2010, Bento Gonçalves. Anais... Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, p.75, 2010.

GOMES, R. S. S., ARAUJO, A. E., NASCIMENTO, L. C., FEITOZA, E. D. A., DEMARTELAERE, A. C. F. Caracterização da *Sclerotinia sclerotiorum*, transmissão e qualidade fisiológica em sementes de algodoeiro. Acta Iguazu, v.6, p. 105-113, 2017.

GONCALVES, F.A.; ANDRADE NETO, M.; BEZERRA, J. N. S.; MACRAE, A.; SOUSA, O. V.; FONTELES-FILHO, A. A.; VIEIRA, R. H.S.F. Antibacterial activity of guava, *Psidium guajava* Linnaeus, leaf extracts on diarrhea-causing enteric bacteria isolated from seabob shrimp, *Xiphopenaeus kroyeri* (HELLER). Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, v. 50, p.11-15, 2008.

GONZAGA NETO, L.; SOARES, J.M. Goiaba para exportação: aspectos técnicos da produção. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. 49 p.

GUENTHER, E. The essential oils: Individual essential oils of the plant families Gramineae, Lauraceae, Burseraceae, Myrtaceae, Umbelliferae and Geraniaceae. Van Nostrand, v. 4, 1950.

GUERRA, R. C. Patogenicidade de isolados de *Sclerotinia sclerotiorum* sobre genótipos de soja. 2017. 56p. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Universidade Federal de Santa Maria –SC, 2017.

HAGSTRUM, D. W.; PHILLIPS, T. W. Evolution of stored-product entomology: protecting the world food supply. Annual Review of Entomology, v. 62, p. 379-397, 2017.

HANIF, M.U.; HUSSAIN, A. L.; CHATHA, S. A. S.; KAMAL, G. M.; AHMAD, T. Variation in composition and bioactivities of essential oil from leaves of two different cultivars of *Psidium guajava* L. Journal of Essential Oil Bearing Plants, v. 21, p. 65-76, 2018.

HERZI, S.; W. ESSAFI, S.; BELLAGHA, F.; LEAL-CALDERON. Influence of the inner droplet fraction on the release rate profiles from multiple W/O/W emulsions. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, v. 441, p. 489-495, 2014.

HILL, S. E. Emulsion. In: HALL, G. M. Methods of testing protein functionality. London: Blackie Academic & Professional, 1996. Cap.6, p.153-185, 1996.

HU, S.; ZHANG, J.; ZHANG, Y.; YE, S.; ZHU, F. Baseline sensitivity and toxic actions of boscalid against *Sclerotinia sclerotiorum*. Crop Protection, v.110, p.83-90, 2018.

IDSTEIN, H.; BAUER, C.; SCHREIER, P. Volatile acids in tropical fruits: cherimoya (*Annona cherimolia*, Mill.), guava (*Psidium guajava*, L.), mango (*Mangifera indica*, L., var. Alphonso), papaya (*Carica papaya*, L.). Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung, v. 180, p. 394-397, 1985.

JACCOUD-FILHO, D. S.; SARTORI, F.F.; MANOSSO-NETO, M.; VRISMAN, C.M.; PIERRE, M.L.C.; BERGER-NETO, A.; TÚLLIO, H.E.; JUSTINO, A.; FONSECA, A.; ZANON, S. Influence of row spacing and plant population density on management of “white mould” in soybean in southern Brazil. *Australian Journal of Crop Science*, v. 10, p. 161-168, 2016.

JIA, W.; HU, C.; XU, J.; MING, J.; ZHAO, Y.; CAI, M.; SUN, X.; LIU, X.; ZHAO, X. Dissolved organic matter derived from rape straw pretreated with selenium in soil improves the inhibition of *Sclerotinia sclerotiorum* growth. *Journal of Hazardous Materials*, v. 369, p. 601-610, 2019.

JIAO, Y.; ZHANG, M.; WANG, S.; YAN, C. Consumption of guava may have beneficial effects in type 2 diabetes: A bioactive perspective. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 101, p. 543 - 552, 2017.

KARIAWASAM, K. W. J. C.; PATHIRANA, R. N.; RATNASOORIVA, W. D.; HANDUNNETTI, S.; ABEYSEKERA, W. P. K. M. Phytochemical profile and *in vitro* anti-inflammatory activity of aqueous leaf extract of Sri Lankan variety of *Psidium guajava* L. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, v. 6, p. 22–26, 2017.

KUHN, O. J.; PORTZ, R. L.; STANGARLIN, J. R.; DEL ÁGUILA, R. M.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; FRANZENER, G. Efeito do extrato aquoso de cúrcuma (*Curcuma longa*) em *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. *Ciências Agrárias*, v. 27, p.13-20, 2006.

KUMAR, V.; VARSHA, S.; RANI, B.; TUSHAR, K.; SHIVANJALI, K.; NARENDRA, K. Phytochemical profile, anti-oxidant, anti-inflammatory, and antiproliferative activities of *Pogostemon deccanensis* essential oils. *3Biotech*, v.9, p.31, 2019.

LAM, R. S. AND M. T. NICKERSON. Food proteins: a review on their emulsifying properties using a structure–function approach. *Food Chemistry* v. 141, p. 975-984, 2013.

LANDRUM, L.R., KAWASAKI, M.L. The genera of Myrtaceae in Brazil: na illustrated synoptic treatment and identification Keys. *Brittonia*, v. 49, p. 509-536, 1997.

LI, Y., J. ZHENG, H. XIAO, D. J. MCCLEMENTS. Nanoemulsion-based delivery systems for poorly water-soluble bioactive compounds: Influence of formulation parameters on polymethoxyflavone crystallization. *Food Hydrocolloids* v. 27, p. 517-528, 2012.

LIMA, R.K.; CARDOSO, M.G.; ANDRADE, M.A.; NASCIMENTO, E.A.; MORAIS, S.L.; NELSON, D.L. Composition of the essential oil from the leaves of tree domestic varieties and one wild variety of the guava plant (*Psidium guajava* L., Myrtaceae) *Brazilian Journal of Pharmacognosy* v. 20, p. 41-44, 2010.

LIU, S.; JIANG, J.; CHE, Z.; TIAN, Y.; CHEN, G. Baseline sensitivity and control efficacy of fluazinam against *Sclerotinia sclerotiorum* in Henan Province, China. *Journal of Phytopathology*, v.167, p. 75-77, 2019.

LOPES, P. Q. Desenvolvimento de sistemas emulsionados para veiculação dos óleos essenciais de *Eucalyptus globulus*, *Schinus terebinthifolius* e *Plectranthus amboinicus*.

2016, 183f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de Pernambuco – PE, 2016.

LOZOYA, X.; REYES-MORALES H.; CHÁVEZ-SOTO M. A.; MARTÍNEZGARCÍA M. DEL C.; SOTO-GONZÁLEZ Y.; DOUBOVA, S. V. Intestinal anti-spasmodic effect of a phytodrug of *Psidium guajava* folia in the treatment of acute diarrheic disease Journal of Ethnopharmacology, v. 83, p. 19-24, 2002.

MACHADO, B. Q. V. Diversidade genética em soja com diferentes níveis de resistência ao *Sclerotinia sclerotiorum*, correlações, análise de trilha e população de plantas. 2017. 103 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitotecnia) – Universidade Federal de Uberlândia – MG. 2017.

MANOSROI, J., DHUMTANOM, P., MANOSROI, A., Anti-proliferative activity of essential oil extracted from Thai medicinal plants on KB and P388 cell lines. Cancer Letters, v. 235, p.114-120, 2006.

MARQUES, J. S. Compostos ativos de folhas de *Eugenia uniflora* e seus efeitos contra mofo branco causado por *Sclerotinia sclerotiorum* em plantas de feijoeiro. 2014. 81p. Dissertação (Mestrado em Biologia) – Universidade Federal de Goiás – GO. 2014.

MARTINS, A. G. L. A.; NASCIMENTO, A. R.; FILHO, J. E. M.; FILHO, N. E. M.; SOUZA, A. G.; ARAGÃO, N. E.; SILVA, D. S. V. Atividade antibacteriana do óleo essencial do manjericão frente a sorogrupos de *Escherichia coli* enteropatógênicos isolados de alfaces. Ciência Rural, v. 40, p.791-1796, 2010.

MC LEAN, D. Role of dead flower parts in infection by certain crucifers by *Sclerotinia sclerotiorum*. Plant Disease, v. 42, p. 663–666, 1958.

MENDES, L. A., MARTINS, G. F., VALBON, W. R., SOUZA, T. S., MENINI, L., FERREIRA, A., FERREIRA, M. F. S. Larvicidal effect of essential oils from Brazilian cultivars of guava on *Aedes aegypti* L. Industrial Crops and Products, v. 108, p. 684–689, 2017.

MENDES, L. A., SOUZA, T. S., MENINI, L., GUILHEN, J. H. S., BERNARDES, C. O., FERREIRA, A., FERREIRA, M. F. S. Spring alterations in the chromatographic profile of leaf essential oils of improved guava genotypes in Brazil. Scientia Horticulturae, v. 238, p. 295–302, 2018.

MENEZES, J. S. Ação Antimicrobiana *in vitro* de *Psidium guajava* L. contra *Staphylococcus aureus* isolados de leite mastítico. 2013. 64 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade José do Rosário Vellano, Alfenas- MG. 2013.

MERCADANTE, A. Z.; STECK, A.; PFANDER, H. Carotenoids from guava (*Psidium guajava* L.): isolation and structure elucidation. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 47, p. 145-15, 1999.

MEYER, M.C.; et al. Eficiência de fungicidas para controle de mofo-branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) em soja, na safra 2014/2015: resultados sumarizados dos 24 ensaios cooperativos. Londrina: Embrapa Soja, 2015. 4 p. (Embrapa Soja. Circular Técnica, 114).

- MILLÉO, J., ANTUNES, C. H., PETTRES, E. B., AYUB, R. A., FARAGO, P. V. Óleo essencial de citronela (Poaceae) e seus componentes para controle do brasileirinho (Coleoptera: Chrysomelidae) em olerícolas. *Entomo Brasiliis*, v. 12, p. 06-10, 2019.
- MORAES, S. P. C. B.; MORAES, W. B.; MORAES, W. B.; CAMARA, G. R.; MACIEL, K. S.; LIMA, P. A. M.; FERREIRA, A.; ALEXANDRE, R. S.; LOPES, J. C. Cinnamon and citronella essential oils in the *in vitro* control of the fungi *Aspergillus* sp. and *Sclerotinia sclerotiorum*. *African Journal of Agricultural Research*, v. 13, p. 1811-1815, 2018.
- NA, R.; LUO, Y.; BO, H.; ZHANG, J.; JIA, R.; MENG, Q.; ZHOU, H.; HAO, J.; ZHAO J. Responses of sunflower induced by *Sclerotinia sclerotiorum* infection. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v.102, p.113-121, 2018.
- NASCIMENTO, G. G. F.; JULIANA LOCATELLI, J.; FREITAS, P. C.; SILVA, G. L. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 31, p. 247-256, 2000.
- NEGREIROS, P. S.; COSTA, D. S.; SILVA, V. G.; LIMA, I. B. C.; NUNES, D. B.; SOUSA, F. B. M.; ARAUJO, T. S. L.; MEDEIROS, J. V. R.; SANTOS, R. F.; OLIVEIRA, R. C. M. Antidiarrheal activity of  $\alpha$ -terpineol in mice. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, v. 110, p. 631–640, 2019.
- NERIO, L.S., OLIVERO-VERBEL, J., STASHENKO, E. Repellent activity of essential oils: a review. *Bioresource and Technology*, v. 101, p. 372–378, 2010.
- NGBOLUA, K., LUFULUABO, G.L., MOKE, L.E., BONGO, G.N., LIYONGO, C.I., ASHANDE, C.M., SAPO, B.S., ZOAWA, B.G., MPIANA, P.T. A review on the phytochemistry and pharmacology of *Psidium guajava* L. (Myrtaceae) and future direction. *Discovery Phytomedicine*, v. 5, p. 7–13, 2018.
- NORA, C. D.; MULLER, C. D.; BONA, G. S.; RIOS, A. O.; HERTZ, P. F.; JABLONSKI, A.; JONG, E. V.; FLÔRES, S. H. Effect of processing on the stability of bioactive compounds from red guava (*Psidium cattleianum* Sabine) and guabiju (*Myrcianthes pungens*). *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 34, p.18-25, 2014.
- NUNES, J. C.; LAGO, M. G.; CASTELO-BRANCO, V. N.; OLIVEIRA, F. R.; TORRES, A. G.; PERRONE, D.; MONTEIRO, M. Effect of drying method on volatile compounds, phenolic profile and antioxidant capacity of guava powders. *Food Chemistry*, v. 197, p. 881-890, 2016.
- OH, W. K.; LEE, C. H.; LEE, M. S.; BAE, E. Y.; SOHN, C. B.; OH, H.; KIM, B. Y.; AHN, J. S. Antidiabetic effects of extracts from *Psidium guajava*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 96, p. 411 - 415, 2005.
- OLIVEIRA, M. L. F., 2018. Aspectos reprodutivos da goiabeira (*Psidium guajava*) e de araçazeiros (*Psidium guineense* e *Psidium cattleianum*) visando o desenvolvimento de cultivares. Tese (Doutorado em Agronomia), Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – RJ, 2018.
- OPUTE, F. I. The component fatty acids of *Psidium guajava* seed fats. *Journal of Science and Food Agriculture*, London, v. 29, p. 737-738, 1978.



- PANSERA, M.R., PAULETTI, M., FEDRIG, C.P., SARTORI, V.C. and RIBEIRO, R.T.S. Utilization of essential oil and vegetable extracts of *Salvia officinalis* L. in the control of rot sclerotinia in lettuce. *Applied Research and Agrotecnology*, v. 6, p. 83-88, 2013.
- PAULA, J. A. M.; SILVA, M. R. R.; COSTA, M. P.; DINIZ, D. G. A.; ALVES, F. S. F.; COSTA, E. A.; LINO, R. C.; PAULA, J. R. Phytochemical analysis and antimicrobial, antinociceptive, and anti-inflammatory activities of two chemotypes of pimenta pseudocaryophyllus (myrtaceae), evidence-based complementary and alternative medicine, p.15, 2012.
- PAVAN, M.A.; KUROZAWA, C. Doenças da alface (*Lactuca sativa*). KIMATI, H.; AMORIN, L.; BERGAMIN, F.A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas. São Paulo: Ed Agronômica Ceres, 1997. v.2, cap. 4, p.18-25, 1997.
- PEDROSA, F. P. C. PedBioatividade de óleos essenciais frente a bactérias fitopatogênicas (*Solanum lycopersicum* L.) 2016. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas-SP, 2016.
- PEREIRA, L. J. B., ROJAS, E. E. G. Multiple emulsions: formation and application in microencapsulation of bioactive componentes. *Ciência Rural*, v.45, p.155-162, 2015.
- PEREIRA, Z. V.; MUSSURY, R. M.; ALMEIDA, A. B.; SANGALLI, A. Medicinal plants used by Ponta Porã community, Mato Grosso do Sul State. *Acta Scientiarum - Biological Sciences*, v. 31, p. 293-299, 2009.
- PIGNATTI, W. A., SOUZA E LIMA, F. A. N., LARA, S. S., CORREA, M. L. M., BARBOSA, J. R., LEAO, L. H. C., PIGNATTI, M. G. Spatial distribution of pesticide use in Brazil: a strategy for Health Surveillance. *Ciência & Saúde Coletiva*, v. 22, p. 3281-3293, 2017.
- PINO, J. A.; AGUERO, J.; MARBOT, R.; FUENTES, V. Leaf oil of *Psidium guajava* L. from Cuba. *Journal of Essential Oil Research*, v. 31, p. 61-62, 2001.
- PURDY, L.H. Sclerotinia sclerotiorum: history, diseases and symptomatology, host range, geographic distribution, and impact. *Phytopathology*, v. 69, p. 875-880, 1979.
- QIN, X. J., YU, Q., YAN, H., KHAN, A., FENG, M. Y., LI, P. P., HAO, X. J., AN, L. K., LIU, H. Y. Meroterpenoids with Antitumor Activities from Guava (*Psidium guajava*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 65, p. 4993–4999, 2017.
- RAJKUMAR, S.; JEBANESAN, A. Repellent activity of selected plant essential oils against the malarial fever mosquito *Anopheles stephensi*. *Tropical Biomedicine*, v. 24, p. 71–75, 2007.
- RAMOS, R. R. S., RODRIGUES, A. B. L., FARIAS, A. L. F., SIMOES, R. C., PINHEIRO, M. T., DOS ANJOS, R. M. F., BARBOSA, L. M. C., SOUTO, R. N. P., FERNANDES, J.B., AS SILVAS, L. S., DA SILVA, S. S. M. A. Chemical composition and in vitro antioxidant, cytotoxic, antimicrobial, and larvicidal activities of the essential oil of *Mentha piperita* L. (Lamiaceae). *The Scientific World Journal*, v. 17, p. 1-8, 2017.

RANJAN, A., WESTRICK, N. M., JAIN, S., PIOTROWSKI, J. S., RAJAN, M., KESSENS, R., STIEGMAN, L., GRAU, C. R., CONLEY, S. P., SMITH, D. L., KABBAGE, M. Resistance against *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean involves a reprogramming of the phenylpropanoid pathway and up-regulation of antifungal activity targeting ergosterol biosynthesis. *Plant Biotechnology Journal*, v. 17, n. 8, pág. 1567-1581, 2019.

RANDUZ, M., Óleo essencial de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*, L.): extração, encapsulação, potencial antimicrobiano e antioxidante. 2017. 146 f. Dissertação (Mestrado em Nutrição e Alimentos, Universidade Federal de Pelotas –RS, 2017).

RATTANACHAIKUNSOPON, P.; PHUMKHACHORN, P. Bacteriostatic effect of flavonoids isolated from leaves of *Psidium guajava* on fish pathogens. *Fitoterapia*, v. 78, p. 434–436, 2007.

SANTOS, R. C., Atividade do extrato rico em licopeno da goiaba vermelha (*Psidium guajava* L.) em células de adenocarcinoma mamário in vitro. 2017. 115p. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Piauí – PI, 2017.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; CRUZ, M. E. Uso de extratos vegetais no controle de fungos fitopatogênicos. *Floresta*, v. 30, p. 129-137, 2000.

SHAH, A., S. BEGUM, S. HASSAN, S. ALI, B. S., GILANI, A.H. “*Pharmacological Basis for the Medicinal Use of Psidium Guajava Leave in Hyperactive Gut Disorders*”. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, v. 6, p. 100-105, 2011.

SHAO, X., CHENG, S., WANG, H., HU, D., MUNGAI, C. The possible mechanism of antifungal action of tea tree oil on *Botrytis cinerea*. *Journal of Applied Microbiology*, v. 114, p. 1642-1649, 2013.

SHURUTHI, S. D.; ROSHAN, A.; TIMILSINA, S. S.; SUNITA, S. A Review on the medicinal plant *Psidium guajava* Linn. (Myrtaceae). *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, v.3, p. 162-168, 2013.

SILVA, E. A. J. Extração de óleo essencial das folhas de *Psidium guajava*, análise da influência da secagem do material vegetal sobre o teor e a composição química do óleo essencial e avaliação antifúngica sobre *Sclerotinia sclerotiorum*. 2014. 104p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Instituto Federal Goiano Campus Rio Verde – GO. 2015.

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*, v. 79, p. 697-702, 2019.

SILVA, E. A. J., SILVA, V. P., ALVES, C. C. F., ALVES, J. M., SOUCHIE, E. L., BARBOSA, L. C. A. Chemical composition of the essential oil of *Psidium guajava* leaves and its toxicity against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 39, p. 865-874, 2018.

SONG, X.; PEI, Y.; QIAO, M.; MA, F.; REN, H.; ZHAO, Q. Preparation and characterizations of Pickering emulsions stabilized by hydrophobic starch particles. *Food Hydrocolloids*, v. 45, p. 256-263, 2015.

SOUZA, T. S., FERREIRA, M. F. S., MENINI, J., SOUZA, J. R. C. L., PARREIRA, L. A., CECON, P. R., FERREIRA, A. Essential oil of *Psidium guajava*: influence of genotypes and environment. *Scientia Horticulturae*, v. 216, p. 38–44, 2017.

SOUZA, T. S., FERREIRA, M. F. S., MENINI, J., SOUZA, J. R. C. L., BERNARDES, C. O., FERREIRA, A. Chemotype diversity of *Psidium guajava* L. *Phytochemistry*, v. 153, p. 129-137, 2018.

STANGARLIN, J.R., et al. Plantas medicinais e o controle alternativo de fitopatógenos. *Biocologia, Ciência & Desenvolvimento*, v. 11, p. 16-21, 1999.

TAVARES, L. R., ALMEIDA, P. P., GOMES, M.F. Avaliação físico-química e microbiológica de goiaba (*Psidium guajava*) revestida com cobertura comestível à base de *O*-carboximetilquitosana e óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare*). *Multi-Science Journal*, v. 1, p. 20-26, 2018.

THAVARA, U.; TAWATSIN, A.; BHAKDEENUAN, P.; WONGSINKONGMAN, P.; BOONRUAD, T.; BANSIDDHI, J.; CHAVALITTUMRONG, P.; KOMALAMISRA, N.; SIRIYASATIEN, P.; MULLA, M.S. Repellent activity of essential oils against cockroaches (Dictyoptera: Blattidae, Blattellidae, and Blaberidae) in Thailand. *Southeast Asian Journal Tropical Medicine Public Health*, v. 38, n. 4, p. 663-673, 2007.

THORNHILL, A. H., SIMON, Y. W., HO, C. K., MICHAEL, D. C. Interpreting the modern distribution of Myrtaceae using a dated molecular phylogeny. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 93, p. 29-43, 2015.

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

VASCONCELOS, A. G.; AMORIM, A. G. N.; SANTOS, R. C.; SOUZA, J. M. T.; SOUZA, L. K. M.; ARAÚJO, T. S. L.; NICOLAU, L.A. D.; CARVALHO, L.L.; AQUINO, P. E. A.; MARTINS, C. S.; ROPKE, C. D.; SOARES, P. M. G.; KUCKELHAUS, S. A. S.; MEDEIROS, J. R.; LEITE, J. R. S. A. Lycopene rich extract from red guava (*Psidium guajava* L.) displays anti-inflammatory and antioxidant profile by reducing suggestive hallmarks of acute inflammatory response in mice. *Food Research International*, p. 1-10, 2017.

VAZQUEZ, M. J. B., CHINCHILLA, F. G., MOLINA, A. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Psidium guajava* and *Cymbopogon citratus*. *Agronomía Mesoamericana*, v. 30, p.147-163, 2019.

VELOSO, R. A. Óleos essenciais como controle alternativo de fitopatógenos. 2016. 140f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus Universitário de Gurupi- TO, 2016.

WANG, L., WU, Y., HUANG, T., SHI, K., WU, Z. Chemical compositions, antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of *Psidium guajava* L. leaves from different geographic regions in China. *Chemistry and Biodiversity*, v. 114, n. 9, p. 179-189, 2017.

WANG, Z., WAN, L., XIN, Q., CHEN, Y., ZHANG, X., DONG, F., HONG, D., YANG, G. Overexpression of OsPGIP2 confers *Sclerotinia sclerotiorum* resistance in *Brassica napus* through increased activation of defense mechanisms. *Journal of Experimental Botany*, v. 69, p.3141-3155, 2018.

WELI, A., KAABI, A., JAMAL, A., SAID, S., HOSSAIN, M.A. Chemical composition and biological activities of the essential oils of *Psidium guajava* leaf. *Journal of King Saud University*, 2018.

WUTZKI, C. R. Análise espacial e quantificação de inóculo de mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Bary) na cultura da soja (*Glycine max* (L) Merrill. 2017. 76f. Tese (Doutorado em Agronomia - Área de Concentração: Agricultura), Universidade Estadual de Ponta Grossa-RS. 2017.

WUTZKI, C. R.; JACCOUD FILHO, D. S.; BERGER NETO, A.; TULLIO, H. E.; JULIATTI, F. C.; NASCIMENTO, A. J. Reduction of white mold level on soybean by fungicide management strategies. *Bioscience Journal*, v. 32, n. 3, p.642-651, 2016.

XIE, J.; XIAO, X.; FU, Y.; LIU, H.; CHENG, J.; GHABRIAL, S.A.; LI, G.; JIANG, D., A novel mycovirus closely related to hypoviruses that infects the plant pathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*, *Virology*, v. 418, p. 49–56, 2011.

XIMENES, L.R. A importância e o manejo da *Sclerotinia sclerotiorum* (Mofo Branco) em cultivos de espécies suscetíveis. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2013, 59 f. Monografia, 2013.

ZANATTO, I. B., BONALDO, S. M., PEREIRA, C. S. Fungicidas e extrato etanólico de própolis no controle de doenças de final de ciclo da cultura da soja. *Revista de Ciências Agrárias*, v. 41, p. 171-180, 2018.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Geral

Avaliar o efeito do óleo essencial das folhas de *Psidium guajava* na forma de emulsão e determinar seu efeito fungicida no controle do fungo *Sclerotinia sclerotiorum* *in vitro* e *in vivo* na cultura da soja.

### 2.2. Específicos

- Avaliar uma emulsão simples contendo óleo essencial das folhas de goiabeira;
- Avaliar o efeito antifúngico do óleo essencial extraído das folhas da goiabeira emulsionado no controle do fungo fitopatogênico *Sclerotinia sclerotiorum* causador do mofo branco *in vitro* e *in vivo* na soja;
- Avaliar a atividade bactericida, anticariogênica e antitumoral do óleo essencial extraído das folhas de *Psidium guajava*.

### 3. CAPÍTULO I

(Artigo submetido de acordo com as normas da Revista Pesquisa Agropecuária Tropical)

**Ação antifúngica do óleo essencial das folhas de *Psidium guajava* *in vitro* e *in vivo* no controle de *Sclerotinia sclerotiorum* em plantas de soja**

**Essential oil antifungal action of *Psidium guajava* leaves *in vitro* and *in vivo* on the *Sclerotinia sclerotiorum* control in soybean plants**

#### RESUMO

Mofo branco é uma das doenças mais importantes que ataca a cultura da soja, atrás apenas da ferrugem asiática. Este incide sobre várias culturas de grande importância econômica, e possui difícil controle, aumentando o uso de agrotóxicos. A busca por biofungicidas extraídos de plantas eficientes e biodegradáveis tem crescido bastante como alternativa para o controle de fitopatógenos. Com este trabalho objetivou-se avaliar a ação antifúngica do óleo essencial (OE) extraído das folhas de goiabeira *in vitro* e *in vivo* em plantas de soja sobre o mofo branco. O OE foi extraído por hidrodestilação e sua composição analisada por CG-EM. Para aplicação do OE, foi formulada uma emulsão e microcápsulas a 300  $\mu\text{l.mL}^{-1}$ . O teste *in vivo* em plantas de soja foi realizado utilizando a emulsão em 7 repetições e discos de 7 mm do fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, que foram incubadas a 22°C e UR 90% e observadas até o crescimento total do controle negativo. Como controle negativo, foi utilizado apenas o fungo sem nenhum tratamento e como positivo o fungicida frowcide. O teste em folha destacada seguiu a mesma metodologia descrita acima, tanto para emulsão quanto para as microcápsulas. Foram identificados como compostos majoritários no OE o *trans*-cariofileno e  $\alpha$ -humuleno. As microcápsulas no teste da folha destacada apresentaram taxa de inibição micelial do mofo branco de 34,62%, enquanto a emulsão possibilitou 96,4% e de 92,5% no teste *in vivo* em plantas de soja, o que comprova seu potencial antifúngico.

**Palavras-chave:** Goiabeira, fungos fitopatôgenos, *Glycine max*, metabólitos secundários.

## ABSTRACT

White mold is one of the most important diseases affecting soybean crop, behind only Asian rust. This focuses on several crops of great economic importance, and has difficult control, increasing the pesticides use. The search for biofungicides extracted from efficient and biodegradable plants has grown considerably as an alternative for phytopathogens control. The objective of this work was to evaluate the antifungal action of essential oil (OE) extracted from guava tree leaves *in vitro* and *in vivo* on soybean plants on white mold. The OE was extracted by hydrodistillation and its composition analyzed by GC-MS. For OE application, an emulsion and microcapsules were formulated at 300  $\mu\text{l.mL}^{-1}$ . The *in vivo* test on soybean plants was performed using 7 repetition emulsion and 7 mm discs of the fungus *Sclerotinia sclerotiorum*, which were incubated at 22 °C and 90% RH and observed until the total negative control growth. As negative control, only the untreated fungus was used and as positive the frowcide fungicide. The detached sheet test followed the same methodology described above for both emulsion and microcapsules. The major OE compounds were trans-caryophyllene and  $\alpha$ -humulene. The microcapsules in the detached leaf test presented 34.62% white mold mycelial inhibition rate, while the emulsion allowed 96.4% and 92.5% in the *in vivo* test in soybean plants, which proves its antifungal potential.

Keywords: guava, phytopathogenic fungi, *Glycine max*, secondary metabolites.

## 3.1.INTRODUÇÃO

O fungo *Sclerotinia sclerotiorum* é um fungo fitopatogênico causador de uma grave doença chamada mofo branco em grandes culturas como a soja, sendo a segunda doença mais importante, atrás apenas da ferrugem asiática. Acarreta perdas em diversas espécies, entre monocotiledôneas e dicotiledôneas, sendo responsável por perdas de rendimento anuais expressivas em culturas agrícolas. Representa, portanto, grande desafio para ser controlada, devido ao seu desenvolvimento e resistência (NA et al., 2018; LIU et al., 2019). Esta doença recebe essas denominações em função de sua sintomatologia que se caracteriza pelas lesões encharcadas, coberta por um micélio variando de coloração de branca a parda, septado, muito ramificado e de aspecto cotonoso na superfície dos órgãos atacados (BOLAND, HALL, 1979; JIA et al., 2019).

A erradicação do mofo branco e seus escleródios, que são suas estruturas de resistência, uma vez instalados em área de cultivo torna-se complexa. Assim, o melhor método de controle é evitar a entrada do mesmo na área de cultivo de soja. Uma vez detectada sua infestação, deve-se tomar algumas medidas de manejo para esta doença, como o controle cultural, a rotação de cultura, a adição de produtos biológicos nas culturas exploradas, maior espaçamento entre linhas, menor densidade de semeadura, escolha por variedades com resistência parcial ao patógeno, aplicação de fungicidas específicos para seu controle entre outros. Este último, pela sua utilização indiscriminada, tem aumentado a resistência do patógeno para aos fungicidas químicos convencionais (WUTZKI et al., 2016; NA et al., 2018; RANJAN et al., 2019).

Os fungicidas para o mofo branco podem prevenir a infecção pelos ascósporos, mas por causa da alta densidade de plantio este pode não penetrar no dossel da cultura e o controle torna-se ineficiente. Com o aumento da utilização do controle químico convencional, conseqüentemente, há contaminação do solo, dos alimentos, da água, do ambiente e também aumento à resistência do fitopatógeno (WUTZKI et al., 2016). Isto tem motivado a busca por métodos alternativos para seu controle, como a utilização de óleos essenciais com propriedades antifúngicas que sejam eficientes e provoquem o mínimo de impacto ambiental negativo, além de serem facilmente adquiridos e terem baixo custo (BOMFIM et al., 2015).

Diversos estudos na literatura têm provado o efeito de metabólitos secundários obtidos de plantas como os óleos essenciais, demonstrando seu potencial de controle a fungos fitopatogênicos (ATTI-SANTOS, 2010; PANSERA et al., 2013). Um exemplo, é o caso do óleo essencial extraído das folhas da *Psidium guajava*, que pertence à família *Myrtaceae*, que cresce em todas as regiões tropicais e subtropicais do mundo, adapta-se as diferentes condições climáticas e está amplamente difundida e bem adaptada no território brasileiro, inclusive no Domínio Cerrado (ETEMADIPOOR et al., 2019).

A análise da composição química das folhas revelou a presença de aminoácidos, triterpenos e esteroides, ácidos, fenóis, saponinas, carotenoides (CUELLAR et al., 1984; SANTOS et al., 2017), óleos essenciais, triterpenoides e  $\beta$ -sitosterol (CRAVEIRO et al., 1981; ARAIN et al., 2017; BORAH et al., 2019). A utilização do chá das folhas de goiabeira é popularmente conhecida, sendo utilizado contra cólica e diarreias, inflamação gastrointestinais, hipertensão, diabetes, tosse, doenças pulmonares, antitérmico, laxante, sangramento nas gengivas, cólera, reduzir vômitos, atividade antimicrobiana, atividade anti-inflamatória, anticárie, no tratamento de feridas oculares, anticancerígenas e



hepatoprotetora, efeitos comprovados com inúmeros estudos a esse respeito (FENG et al., 2015; FLORES et al., 2015; JIAO et al., 2017; SOUZA et al., 2017; BORAH et al., 2019).

No óleo essencial das folhas de goiaba, foram encontrados vários compostos como  $\alpha$ -pineno, trans-cariofileno,  $\beta$ -bisaboleno,  $\alpha$ -humuleno, d-limoneno, óxido de cariofileno, eugenol, mirceno, aromadendreno,  $\beta$ -selineno e 1,8-cineol (CRAVEIRO et al., 1981; PINO et al., 2001; ARAIN et al., 2017; SILVA et al., 2018; BORAH et al., 2019), sendo que estudos comprovaram a eficácia do 1,8-cineol como potente antimicrobiano, inseticida e antifúngico. Dessa forma, o óleo essencial das folhas de *Psidium guajava* possuem potencial bioativo a ser estudado (LIMA et al., 2010; SOUZA et al., 2017).

Tendo em vista que o mofo branco é uma doença importante para a cultura da soja no Brasil, justifica-se a busca por métodos alternativos de controle. Sendo assim, com este trabalho objetivou identificar os compostos presentes no óleo essencial das folhas de *Psidium guajava* bem como avaliar o seu efeito antifúngico *in vitro* e *in vivo* no controle de *Sclerotinia sclerotiorum* em plantas de soja.

## **3.2.MATERIAL E MÉTODOS**

### **Material Vegetal**

As coletas das folhas de *Pisidium guajava* ocorreram em março e abril de 2018, na cidade de Rio Verde, nas coordenadas S 17°47'26.43", W 50°54'49.597" a uma altitude de 682 m entre 06 e 08h da manhã. O material foi coletado da parte superior e inferior do dossel da planta e, em seguida, identificado de forma inicial por suas características morfológicas e, na sequência, confirmada pelo biólogo Marcelo Nogueira Xavier na Universidade Estadual de Montes Claros, MG, onde foi registrado (exsicata nº de adesão 4481) e depositada em seu herbário.

### **Extração do óleo essencial**

A extração do óleo essencial ocorreu por hidrodestilação utilizando um aparelho do tipo Clevenger, segundo Silva et al. (2018), em que foi utilizado um total de 20 kg de folhas *in natura*. Após a obtenção do óleo e medida sua massa em balança analítica, este fora armazenado em frasco de vidro âmbar a 4°C, para posterior análise de sua composição química, conforme Silva et al. (2018).

### **Emulsão contendo óleo essencial de *Psidium guajava***

A emulsão O/A foi preparada utilizando óleo essencial com o tensoativo de natureza hidrofílica (Tween 80, EHL= 15), segundo Kang et al. (2019). A emulsão foi preparada utilizando 20mL de água deionizada, juntamente com 1 mL de Tween 80 (quantidade definida em testes prévios) e 6 mL de óleo essencial das folhas de goiabeira, sob agitação em agitador magnético a 500 rpm, por 10 min, para se obter uma emulsão com concentração final de 300 µl/mL de óleo essencial, dose esta pré-estabelecida segundo resultados obtidos em experimento por Silva et al. (2018).

### **Microcápsulas contendo óleo essencial de *Psidium guajava***

As microcápsulas foram produzidas pelo método de coacervação simples, segundo adaptação de Sharma, Goel (2018). As microcápsulas foram preparadas utilizando 0,3 g de alginato de sódio como polímero, 6 mL de óleo essencial, 1 mL de tween 80 e 20 mL de água destilada, para se obter a mesma concentração da emulsão. Posteriormente, a solução de alginato de sódio, óleo essencial e tween 80 foram homogeneizadas com agitação a 500 rpm, por 45min, em agitador magnético. Logo após, a solução foi colocada em seringa com agulha 0,3x13 mm e gotejada em solução de cloreto de cálcio a 1,5% p/v para formação das microcápsulas que ficaram, sob agitação, por 20 min, para sua reticulação. Posteriormente, foram filtradas e lavadas com água destilada e secadas em estufa a 35°C, até peso constante. Foram então armazenadas em frasco âmbar, até a utilização no teste da folha destacada.

### **Cultura do fungo *Sclerotinia sclerotiorum***

Os isolados de *S. sclerotiorum* Ss12 (BRM 29673) e Ss 43 (BRM 29870) utilizados no experimento foram cedidos pela Embrapa Arroz e Feijão, localizada em Santo Antônio de Goiás, GO e mantidos em estufa de crescimento a 23°C, até sua utilização nos ensaios.

### **Material vegetal de soja**

Plantas de soja (cultivar NS6906 IPRO) de ciclo superprecoce foram cultivadas em vasos de 6 kg, contendo como substrato formado por solo (Latosolo Vermelho distrófico) de textura média, fertilizado com NPK (4-30-16), sendo mantidas em casa de vegetação a temperatura ambiente, com fotoperíodo de 12 h e irrigação automatizada por 15 dias.

### **Teste da folha destacada**

O teste da folha destacada foi realizado segundo Marques (2014) com algumas adaptações. Folhas com 15 dias após a emergência das plantas de soja foram destacadas, desinfetadas com água sanitária e álcool 70% e colocadas em placa de Petri com papel de filtro e água para manter a umidade. Em seguida, as folhas foram inoculadas com discos de 7 mm de diâmetro da cultura do fungo *S. sclerotiorum* crescido em meio BDA por 4 dias, e incubadas em câmara de germinação a  $22 \pm 3^\circ\text{C}$  por 24 h, com fotoperíodo de 12 h. Após o período de incubação, as folhas foram aspergidas com água destilada e tween 80, sendo o controle negativo 1 para a emulsão e com as microcápsulas contendo apenas tween 80, alginato de sódio como controle negativo 2 para as microcápsulas. O controle positivo foi realizado com o fungicida frownicide, na concentração de  $10 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$  do ingrediente ativo, e os tratamentos aplicados foram a emulsão e as microcápsulas ambos com óleo essencial de folhas de *P. guajava* a  $300 \mu\text{l}.\text{mL}^{-1}$ , concentração escolhida por testes anteriores. Logo após a pulverização dos mesmos, que se deu até o completo molhamento das folhas sem que ocorresse escorrimento dos tratamentos, as placas de Petri foram novamente incubadas à temperatura de  $22 \pm 3^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de 12 h, sendo a primeira avaliação realizada após 12 h de incubação. Avaliações foram feitas até o crescimento total dos controles negativos. A formação da lesão foi mensurada com auxílio de um paquímetro digital e o percentual de inibição calculado por valores de Percentual de Inibição do Crescimento Micelial (PIC), conforme Edginton (1971).

### **Teste antifúngico *in vivo* em soja**

Para o teste antifúngico *in vivo* foi utilizada a metodologia de Marques (2014), em que as plantas de soja, com 15 dias após emergência, foram levadas para o Laboratório de Microbiologia Agrícola da instituição, para a inoculação do fungo em suas folhas. A inoculação se deu com a inserção de discos com 7 mm de diâmetro da cultura do fungo, crescido em meio BDA por 4 dias, na porção adaxial de folhas. Após a inoculação, as plantas foram mantidas em  $22^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$  com 90% de umidade e fotoperíodo de 12 h, por 24 horas para o crescimento inicial do fungo. Após as 24 horas, o fungo já havia iniciado seu crescimento e assim as plantas de soja foram pulverizadas com o controle negativo (água + tween), controle positivo (fungicida frownicide) e com a emulsão contendo óleo essencial das folhas de goiabeira, até o molhamento completo das folhas sem ocorrer escorrimento. Logo após a aplicação dos tratamentos, as plantas foram mantidas a  $22^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$  com 90% de umidade e fotoperíodo de 12 horas. As áreas das lesões foram

mensuradas com um paquímetro digital após 24 horas da aplicação dos tratamentos até o crescimento total do fungo nas folhas das plantas do controle negativo. Os testes foram feitos com sete repetições, e cada repetição teve um conjunto de três plantas.

### **Análise estatística**

O teste com a folha destacada foi executado, segundo esquema ao acaso constituído de 5 tratamentos com 7 repetições: controle positivo (+), controle negativo (-) 1 e 2, emulsão e microcápsulas. O teste *in vivo* foi feito segundo esquema ao acaso constituído de três tratamentos: controle +, controle -, e emulsão do óleo essencial a 300µl/mL com sete repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos comparadas pelo teste Tukey (5%), por meio do *software* ASSISTAT.

## **3.3.RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A análise da composição química do óleo essencial das folhas *P. guajava* identificou 17 compostos que estão listados na Tabela 1. Dentre estes compostos, foram identificados dois compostos majoritários: o trans-cariofileno (18,18%) e o  $\alpha$ -humuleno (26,37%). Estes resultados são similares aos de Craveiro et al. (1981), Cuellar et al. (1984), Pino et al. (2001) e Silva et al. (2018), indicando a presença de importantes compostos com bioatividade, como a ação fungicida, como o 1,8- cineol, limoneno, trans-cariofileno,  $\alpha$ -humuleno, óxido de cariofileno, entre outros.

**Tabela 1 - Constituintes do óleo essencial das folhas de *Psidium guajava*.**

<b>Compostos</b>	<b>RI*</b>	<b>RA(%)</b>
Limoneno	1024	2,22 $\pm$ 0,2
1,8-cineol	1026	1,50 $\pm$ 0,3
$\alpha$ -copaeno	1374	1,05 $\pm$ 0,3
trans-cariofileno	1419	18,18 $\pm$ 0,4
$\alpha$ -humuleno	1454	26,37 $\pm$ 0,2
4,11-selinadieno	1475	1,19 $\pm$ 0,2

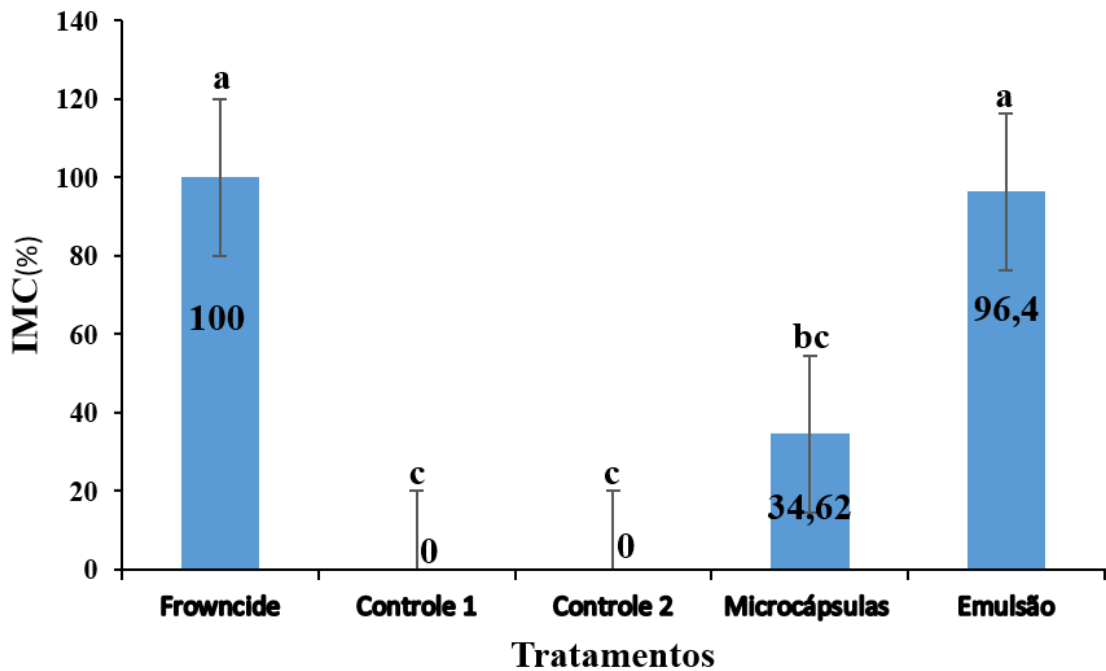
$\gamma$ -muuroleno	1478	0,83 $\pm$ 0,2
Aromadendreno	1488	7,63 $\pm$ 0,2
$\alpha$ -selineno	1497	7,35 $\pm$ 0,3
$\alpha$ -panasinseno	1517	1,21 $\pm$ 0,2
trans-Nerolidol	1566	3,38 $\pm$ 0,2
óxido de cariofileno	1585	3,79 $\pm$ 0,2
epóxido de $\alpha$ -humuleno II	1612	4,18 $\pm$ 0,3
epóxido longipineno	1620	1,61 $\pm$ 0,2
epi- $\alpha$ -muurulol	1639	2,97 $\pm$ 0,2
$\alpha$ -cadinol	1651	0,78 $\pm$ 0,3
Selin-11-en-4 $\alpha$ -ol	1662	7,20 $\pm$ 0,2
<hr/>		
Total Identificado		91,44
<hr/>		
Monoterpenos hidrocarbonados		1,8
Monoterpenos oxigenados		1,2
Sesquiterpenos hidrocarbonados		62,0
Sesquiterpenos oxigenados		14,8

\*RI – Índice de retenção obtido com referência em série homologa de n-alcenos usando coluna SPB-5. \*RA – Área relativa (área do pico em relação ao pico total no cromatograma CG-MS), média de três repetições  $\pm$  - desvio padrão.

O teste de folha destacada para verificar a atividade antifúngica da emulsão e das microcápsulas, contendo óleo essencial das folhas de goiabeira sobre o crescimento micelial de *S. sclerotiorum* foi realizado *in vitro* e resultou nos dados que podem ser observados na Figura 5. A emulsão contendo 300 $\mu$ L.mL<sup>-1</sup> de óleo essencial em estudo possibilitou inibição de crescimento micelial de 96,4%, enquanto as microcápsulas contendo a mesma concentração de óleo essencial, possibilitou apenas 34,62%.

No teste de folha destacada, ao comparar o percentual de inibição de crescimento micelial das microcápsulas com o controle positivo (fungicida frowncide) e com a emulsão (Figura 1), verifica-se que os valores diferiram entre si, indicando que as microcápsulas possibilitaram apenas 34,62% de inibição em relação ao fungicida comercial e a emulsão, que possibilitaram inibição de 100% e 96,4%, respectivamente.

Ao observar os resultados para a emulsão e comparar o percentual de inibição de crescimento micelial da mesma com o controle positivo (fungicida frowncide) (Figura 2), verifica-se que os valores não diferiram estatisticamente. Isto confirma o potencial fungicida dos compostos presentes no óleo essencial das folhas de goiabeira.



\*Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste Tukey (5%).

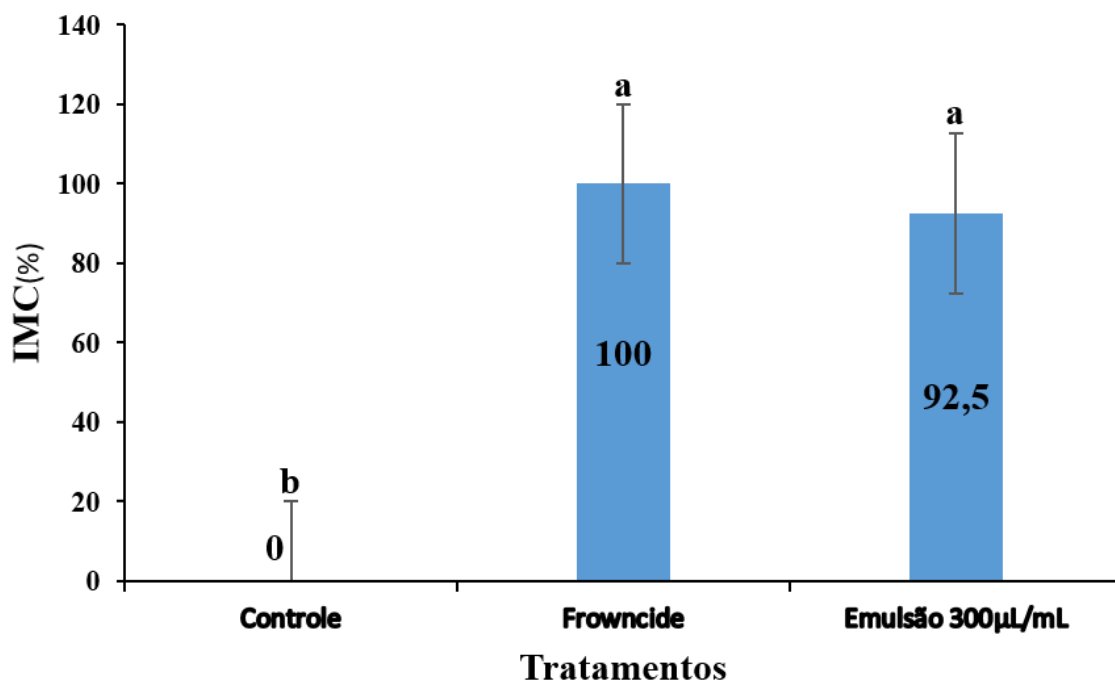
**Figura 1 - Percentual de inibição micelial da emulsão e das microcápsulas contendo óleo essencial de folhas de goiabeira a  $300\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$  sobre o fungo *Sclerotinia sclerotiorum*. Controle 1 (controle negativo microcápsulas), controle 2 (controle negativo emulsão).**

Essa discrepância nos resultados obtidos para a emulsão (PIC 96,4%) e para as microcápsulas (PIC 34,62%), ambas a uma mesma concentração de óleo essencial, pode ser por causa do polímero alginato de sódio utilizado para confecção das microcápsulas, que pode ter impedido a liberação do óleo essencial. Não foram encontrados relatos para tal fato, devendo-se realizar estudos posteriores para averiguar o ocorrido. Portanto, os estudos prosseguiram com o teste *in vivo* em plantas de soja somente com a emulsão.

Quanto ao teste *in vivo* em plantas de soja, os resultados sobre a atividade antifúngica da emulsão do óleo essencial das folhas de goiabeira sobre o crescimento micelial de *S. sclerotiorum* estão na Figura 6. A emulsão contendo  $300\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$  de óleo essencial em estudo possibilitou porcentagem de inibição de crescimento micelial *in vivo* em plantas de soja de 92,5%.

No teste antifúngico *in vivo* em plantas de soja, os resultados foram semelhantes ao teste da folha destacada que foi realizado *in vitro*, em que o percentual de inibição da

emulsão não diferiu do controle positivo realizado com o fungicida comercial frowncide, já utilizado para o controle do mofo branco em lavouras de soja.



\*Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste Tukey (5%).

**Figura 2 - Percentual de inibição micelial *in vivo* em folhas de soja da emulsão contendo óleo essencial de folhas de goiabeira sobre o fungo *Sclerotinia sclerotiorum*.**

A emulsão possibilitou percentual de inibição ao fungo de 92,5%, valor menor comparado ao percentual de 96,5% obtido com o teste da folha destacada, mas que não diferem estatisticamente. Novamente, este teste *in vivo* comprova a ação fungicida dos metabólitos secundários presentes na composição química do óleo essencial das folhas de *P. guajava*.

Na análise de composição química do óleo essencial das folhas de goiabeira, foi possível encontrar importantes metabólitos especiais com potencial fungicida como o 1,8-cineol, limoneno, *trans*-cariofileno,  $\alpha$ -humuleno, óxido de cariofileno, entre outros (CUELLAR et al., 1984; PINO et al., 2001; DE LIMA et al., 2010; KHADRIA et al., 2014; ARAIN et al., 2017; HANIF et al., 2018; BORAH et al., 2019).

Uma maior bioatividade pode ser observada em estudos com óleos essenciais com diversas plantas aromáticas que apresentam em sua composição alguns constituintes em especial (citrinal, geraniol,  $\alpha$ -pineno, 1,8-cineol, *trans*-cariofileno, furanodieno, limoneno, eugenol e carvacrol) (TANG et al., 2018; PERVEEN et al., 2018; HANIF et al., 2018; KANG et al., 2019). Ressalta-se, que pela grande complexidade da composição química de um óleo essencial, é difícil relacionar sua bioatividade com apenas estas

substâncias, sendo que essa bioatividade pode ser resultado de sinergia entre os componentes e não só apenas por um único composto químico.

Hanif et al. (2018) comprovaram a ação antifúngica do óleo essencial de *P. guajava* contra fungos fitopatogênicos como *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Fusarium solani* e *Rhizopus solani*. Igualmente, Silva et al. (2018) comprovaram a ação antifúngica *in vitro* sobre *S. sclerotiorum* com a dose de 300µL inibindo mais de 90% de sua germinação.

Não há nenhum relato sobre a ação antifúngica de emulsões contendo óleo essencial das folhas de goiabeira, há apenas para bioatividade contra fitopatógenos de outros óleos essenciais como: gerânio, orégano, canela, eucalipto, absinto, entre outros (KANG et al., 2018; PARK et al., 2018; SONG et al., 2018; RIBES et al., 2018; KANG et al., 2019). Portanto, o presente estudo é o primeiro relato sobre a atividade antifúngica de emulsão contendo o óleo essencial das folhas de goiabeira contra o fungo *S. sclerotiorum*.

De acordo com Perveen et al. (2018), a ação dos óleos essenciais sobre microorganismos pode ser atribuída à capacidade em modificar o crescimento geral dos mesmos pelo achatamento das pontas das hifas, impedindo-as de se desenvolver e podendo causar a morte do fungo. Além dos óleos essenciais possuem caráter lipofílico, que permite atravessar a parede celular e a membrana citoplasmática que são à base de lipídios, assim destruindo a estrutura celular e causando danos a essas membranas. Tal fato é uma citotoxicidade característica dos óleos essenciais, que pode causar desequilíbrio no metabolismo energético de toda a célula, levando ao acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ERO), inibindo a taxa respiratória e a fosforilação oxidativa, levando a apoptose e a necrose celular do fitopatógeno (PERVEEN et al., 2018; SONG et al., 2018; KANG et al., 2019).

Os resultados obtidos neste trabalho indicam o efeito fungicida da emulsão contendo óleo essencial de folhas de goiabeira sobre o fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, tanto *in vitro* (teste da folha destacada) como *in vivo* (teste antifúngico em plantas de soja). Dessa forma, a utilização de óleos essenciais pode se tornar uma ferramenta para o controle de pragas agrícolas. Vale ressaltar que há necessidade de estudos posteriores sobre o assunto para o desenvolvimento de um possível biofungicida que poderá ser utilizado em campo para a cultura da soja, assim como outras afetadas pelo fitopatógeno.



### 3.4. CONCLUSÕES

No óleo essencial, extraído das folhas de goiabeira, há compostos com ação antifúngica, como o 1,8-cineol, limoneno, trans-cariofileno,  $\alpha$ -humuleno e óxido de cariofileno.

A emulsão contendo óleo essencial das folhas de goiabeira, na concentração de  $300\mu\text{L.mL}^{-1}$ , demonstrou atividade antifúngica tanto *in vitro* como *in vivo* em plantas de soja, com valor de IMC acima de 90%, comprovando seu potencial fungicida contra *S. clerotiorum*.

### 3.5. AGRADECIMENTOS

À Embrapa Arroz e Feijão, pela doação dos isolados de mofo branco. À Fapeg/Capes, ao IF Goiano - Campus Rio Verde e ao PPGCA-AGRO, pelo apoio financeiro e estrutural fundamentais para realização desta pesquisa.

### 3.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAIN, A., SHERAZI, S. T. H., MAHESAR, S. A., SIRAJUDDIN. Spectroscopic and chromatographic evaluation of solvent extracted guava seed oil. *International Journal of Food Properties*, v. 20, n.1, p.556–563, 2017.

ATTI-SANTOS, A.C.; ROSSATO, M.; SERAFINI, L.A.; BUENO, M.; CRIPPA, L.B.; SARTORI, V.; DELLACASSA, E.; MOYNA, P. Efeito fungicida dos óleos essenciais de *Schinus molle* L. e *Schinus terebinthifolius* Raddi, Anacardiaceae, do Rio Grande do Sul. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 20, p.154-159, 2010.

BOLAND, G.J.; HALL, R. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal Plant Pathology*, v.16, p. 93–108, 1994.

BOMFIM, N. S.; NAKASSUGI, L. P.; OLIVEIRA, J.F.P.; KOHIYAMA, C. Y.; MOSSINI, S. A. G.; GRESPAN, R.; NERILO, S. B.; MALLMAN, C. A.; FILHO, B. A. A.; JR, M. M. Antifungal activity and inhibition of fumonisin production by *Rosmarinus officinalis* L. essential oil in *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg. *Food Chemistry*. v.166, p. 330-336, 2015.

BORAH, A., PANDAY, S. K., HALDAR, S., LAL, M. Chemical Composition of Leaf Essential Oil of *Psidium guajava* L. from North East India, *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, v. 1, p. 248-453, 2019.

CRAVEIRO, A. A.; FERNANDES, A. G.; ANDRADE, C. H. S.; MATOS, F. J. A.; ALENCAR, J. W.; MACHADO, M. I. L. Óleos essenciais de plantas do nordeste. [S. l.]: UFC, 1981. 210 p, 1981.

CUELLAR, AC, LARA RA, ZAYAS JP 1984. *Psidium guajava* L. Tamizaje fitoquímico y estudio del aceite esencial. Revista Cubana Farmacia, v. 18, p. 92-99, 1984.

LIMA, R. K. et al. Composition of the essential oil from the leaves of tree domestic varieties and one wild variety of the guava plant (*Psidium guajava* L., Myrtaceae). Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 20, p. 41-44, 2010.

EDGINTON, L.V. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. Phytopathology, v. 62, p. 42, 1971.

ETEMADIPOOR, R., RAMEZANIANA, A., DASTJERDIB, A. M., SHAMOLIB, M. The potential of gum arabic enriched with cinnamon essential oil for improving the qualitative characteristics and storability of guava (*Psidium guajava* L.) fruit. Scientia Horticulturae, v. 251, p. 101-107, 2019.

FENG, X.; WANG, Z.; MENG, D.; LI, X. Cytotoxic and antioxidant constituents from the leaves of *Psidium guajava*. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, v. 25, p. 2193–2198, 2015.

FLORES, G.; WU, S.; NEGRIN, A.; KENNELLY, E. J. Chemical composition and antioxidant activity of seven cultivars of guava (*Psidium guajava*) fruits. Food Chemistry, v. 170, p. 327 - 335, 2015.

HANIF, M. U., HUSSAIN, A. I., CHATHA, S. A. S., KAMAL, G. M., AHMAD, T. Variation in composition and bioactivities of essential oil from leaves of two different cultivars of *Psidium guajava* L. Journal of Essential Oil Bearing Plants, v. 21, p. 65–76, 2018.

JIA, W., HU, C., XU, J., MING, J., ZHAO, Y., CAI, M., SUN, X., LIU, X., ZHAO, X. Dissolved organic matter derived from rape straw pretreated with selenium in soil improves the inhibition of *Sclerotinia sclerotiorum* growth. Journal of Hazardous Materials, v. 369, p. 601-610, 2019.

JIAO, Y.; ZHANG, M.; WANG, S.; YAN, C. Consumption of guava may have beneficial effects in type 2 diabetes: A bioactive perspective. International Journal of Biological Macromolecules, v. 101, p. 543 - 552, 2017.

KANG, J. H., SONG, K. B. Inhibitory effect of plant essential oil nanoemulsions against *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, and *Salmonella typhimurium* on red mustard leaves. Innovative Food Science Emerging Technologies, v. 45, p. 445–454, 2018.

KANG, J. H., PARK, S. J., PARK, J. B., SONG, K. B. Surfactant type affects the washing effect of cinnamon leaf essential oil emulsion on kale leaves. Food Chemistry, v. 271, p. 122–128, 2019.

KHADRIA, A.; MOKNIB, R.E.; ALMEIDAC, C.; NOGUEIRA, J.M.F.; ARAUJO, E.M. Chemical composition of essential oil of *Psidium guajava* L. growing in Tunisia. Industrial Crops and Products v. 52, p.29– 31, 2014.

LIU, S., JIANG, J., CHE, Z., TIAN, Y., CHEN, G. et al., Baseline sensitivity and control efficacy of fluazinam against *Sclerotinia sclerotiorum* in Henan Province, China. *Journal of Phytopathology*, v.167, p.75-77, 2019.

MARQUES, J. S. Compostos ativos de folhas de *Eugenia uniflora* e seus efeitos contra mofo branco causado por *Sclerotinia sclerotiorum* em plantas de feijoeiro. 2014. 81p. Dissertação (Mestrado em Biologia) – Universidade Federal de Goiás – GO. 2014.

NA, R., LUO, Y., BO, H., ZHANG, J., JIA, R., MENG, Q., ZHOU, H., HAO, J., ZHAO, J. Responses of sunflower induced by *Sclerotinia sclerotiorum* infection. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v.102, p.113-121, 2018.

PANSERA, M. R., PAULETTI, M., FEDRIG, C. P., SARTORI, V. C., RIBEIRO, R. T. S. Utilization of essential oil and vegetable extracts of *Salvia officinalis* L. in the control of rot sclerotinia in lettuce. *Applied Research and Agrotecnology*, v. 6, p. 83-88, 2013.

PARK, J. B., KANG, J. H., SONG, K. B. Geranium essential oil emulsion containing benzalkonium chloride as a wash solution on fresh-cut vegetables. *Food and Bioprocess Technology*, v. 11, p. 2164-2171, 2018.

PERVEEN, K., BOKHARI, N. A., SIDDIQUE, I., AL-RASHID, S. A. I. Antifungal activity of essential oil of commiphora molmol oleo gum resin. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, v. 2, p. 667–673, 2018.

PINO, J. A.; AGUERO, J.; MARBOT, R.; FUENTES, V. Leaf oil of *Psidium guajava* L. from Cuba. *Journal Essential Oil Research*, v. 31, p. 61-62, 2001.

RANJAN, A., WESTRICK, N. M., JAIN, S., PIOTROWSKI, J. S., RAJAN, M., KESSENS, R., STIEGMAN, L., GRAU, C. R., CONLEY, S. P., SMITH, D. L., KABBAGE, M. Resistance against *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean involves a reprogramming of the phenylpropanoid pathway and up-regulation of antifungal activity targeting ergosterol biosynthesis. *Plant Biotechnology Journal*, v. 17, n. 18, p. 1567-1581, 2019.

RIBES, S., FUENTES, A., TALENS, P., BARAT, J. M. Combination of different antifungal agents in oil-in-water emulsions to control strawberry jam spoilage. *Food Chemistry*, v. 239, p. 704–711, 2018.

SANTOS, R. C. Atividade do extrato rico em licopeno da goiaba vermelha (*Psidium guajava* L.) em células de adenocarcinoma mamário *in vitro*. 2017. 115p. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Piauí – PI, 2017.

SILVA, E. A. J.; SILVA, V. P.; ALVES, C. C. F.; ALVES, J. M.; SOUCHIE, E. L.; BARBOSA, L. C. A. Chemical composition of the essential oil of *Psidium guajava* leaves and its toxicity against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 39, p. 865-874, 2018

SOUZA, T. S. S., FERREIRA, M. F. S., MENINIA, L., SOUZA, J. R. C. L., PARREIRA, L. A., CECOND, P., FERREIRA, A. Essential oil of *Psidium guajava*: influence of genotypes and environment. *Scientia Horticulturae*, v. 216, p. 38–44, 2017.

SHARMA, R., GOEL, A. Development of insect repellent finish by a simple coacervation microencapsulation technique. *International Journal of Clothing Science and Technology*, v0. 30, p.152–158, 2018.

SONG, B., ZHU, W., SONG, R., YAN, F., WANG, Y. Exopolysaccharide from *Bacillus vallismortis* WF4 as an emulsifier for antifungal and antipruritic peppermint oil emulsion. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 15, p. 436-444, 2018.

TANG, X., SHAO, Y. L., TANG, Y. J., ZHOU, W. W. Antifungal activity of essential oil compounds (geraniol and citral) and inhibitory mechanisms on grain pathogens (*Aspergillus flavus* and *Aspergillus ochraceus*). *Molecules*, v. 23, p. 3-18, 2108.

WUTZKI, C. R.; JACCOUD FILHO, D. S.; BERGER NETO, A.; TULLIO, H. E.; JULIATTI, F. C.; NASCIMENTO, A. J. Reduction of white mold level on soybean by fungicide management strategies. *Bioscience Journal*, v. 32, n. 3, p. 642-651, 2016.

## 4. CAPÍTULO II

(Artigo submetido e publicado de acordo com as normas da Revista  
Brazilian Journal of Biology)

### **Anticariogenic and antiproliferative activities of the fresh leaf essential oil of *Psidium guajava* L. (Myrtaceae).**

**Keywords:** *Psidium guajava*, essential oil, cariogenic bacteria, cancer cells

**Palavras-chave:** *Psidium guajava*, óleo essencial, bactérias cariogênicas, células cancerígenas

#### **Abstract**

This study evaluated the anticariogenic and antiproliferative activities of *Psidium guajava* leaves (PG-EO) essential oil, traditionally used in folk medicine. The essential oil was obtained from fresh leaves by hydrodistillation, using a modified Clevenger apparatus. The major PG-EO chemical constituents were identified by GC-MS and GC-FID as being  $\beta$ -caryophyllene (16.1%),  $\alpha$ -humulene (11.9%), aromadendrene oxide (14.7%),  $\delta$ -selinene (13.6%), and selin-11-en-4 $\alpha$ -ol (12.5%). The EO anticariogenic activity of *P. guajava* leaves was determined in terms of its minimum inhibitory concentrations (MIC) using the broth microdilution method in 96-well microplates. PG-EO had moderate activity against *Streptococcus mutans* (MIC = 200  $\mu$ g/mL), *S. mitis* (MIC = 200  $\mu$ g/mL), *S. sanguinis* (MIC = 400  $\mu$ g/mL), *S. sobrinus* (MIC = 100  $\mu$ g/mL), and *S. salivarius* (MIC = 200  $\mu$ g/mL). The antiproliferative activity was evaluated against different tumor cell lines: breast adenocarcinoma (MCF-7), human cervical adenocarcinoma (HeLa), and human glioblastoma (M059J). A normal human cell line (GM07492A, lung fibroblasts) was included. The antiproliferative activity was evaluated using the XTT assay and the results were expressed as IC<sub>50</sub>. The MCF and MO59J lines showed significantly lower IC<sub>50</sub> values than that obtained for the normal line, showing selectivity. Our results suggest that the essential oil of *Psidium guajava* L. has promising biological activities and can be considered a new source of bioactive compounds.

Atividades anticariogênicas e antiproliferativas do óleo essencial de folhas frescas de *Psidium guajava* L. (Myrtaceae).

## Resumo

Este estudo avaliou as atividades anticariogênicas e antiproliferativas do óleo essencial das folhas de *Psidium guajava* (PG-EO), tradicionalmente utilizadas na medicina popular. O óleo essencial foi obtido a partir de folhas frescas por hidrodestilação, utilizando um aparelho Clevenger modificado. Os principais constituintes químicos de PG-EO foram identificados por GC-MS e GC-FID como  $\beta$ -cariofileno (16,1%),  $\alpha$ -humuleno (11,9%), óxido de aromadendreno (14,7%),  $\delta$ -selineno (13,6%) e selin-11-en-4 $\alpha$ -ol (12,5%). A atividade anticariogênica do óleo essencial das folhas de *P. guajava* foi determinada em termos de suas concentrações mínimas inibitórias (MIC) usando o método de microdiluição de caldo em microplacas de 96 poços. PG-EO teve atividade moderada contra *Streptococcus mutans* (MIC = 200  $\mu$ g / mL), *S. mitis* (MIC = 200  $\mu$ g / mL), *S. sanguinis* (MIC = 400  $\mu$ g / mL), *S. sobrinus* (MIC = 100  $\mu$ g / mL) e *S. salivarius* (MIC = 200  $\mu$ g / mL). A atividade antiproliferativa foi avaliada em diferentes linhagens de células tumorais: adenocarcinoma de mama (MCF-7), adenocarcinoma cervical humano (HeLa) e glioblastoma humano (M059J). Foi incluída uma linha celular humana normal (GM07492A, fibroblastos pulmonares). A atividade antiproliferativa foi avaliada utilizando o ensaio XTT e os resultados foram expressos como IC<sub>50</sub>. As linhas MCF e MO59J mostraram valores significativamente mais baixos de IC<sub>50</sub> do que os obtidos para a linha normal, mostrando seletividade. Os resultados sugerem que o óleo essencial de *Psidium guajava* L. tem atividades biológicas promissoras e pode ser considerado uma nova fonte de compostos bioativos.

## 4.1.Introduction

Essential oils are sources of natural substances with several biological activities with antioxidant, antimicrobial, anticancer, antinociceptive, antiviral, and antiphlogistic properties (Martins et al. 2015).

Tooth decay is an important public health problem that affects a large number of people in many countries in the world. More than 700 species of bacteria are identified in the oral cavity and some of them are responsible for caries and other periodontal diseases, among them we can highlight the bacteria of *Streptococcus* genus (Melo et al. 2017).

Plant-derived materials such as plant extracts, essential oils, and pure compounds have antimicrobial effects against oral pathogens and these materials have

attracted the interest of researchers worldwide. However, reports on the antimicrobial activity of natural products against oral pathogens are still scarce (Estevam et al. 2016).

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 (Oliveira et al. 2004). In this scenario, some essential oils extracted from different plants have promising antitumor potential, both *in vitro* and *in vivo* (Lesgards et al. 2014).

The species *Psidium guajava* L., common name guava, belongs to the family Myrtaceae, which is composed of more than 100 genera and 3800 species and is one of the most studied species of this family (Haida et al. 2015). The essential oils and leaf extracts of this plant have several biological activities, including antidermatophytic, anti-inflammatory, antibiotic, analgesic, hepato-protective and antioxidant properties (Bhushan et al. 2014; Ferdinand et al. 2014). However, this is the first study reporting the anticariogenic and antiproliferative activities of the fresh leaves essential oil of *P. guajava* occurring in the Cerrado of Goiás State, Brazil.

This work, *continuing our line of research* on chemical composition and the biological activities of essential oils (Lemes et al. 2017; Oliveira et al. 2017), analyzes the chemical composition and the anticariogenic and antiproliferative activities of the fresh leaf essential oil of *P. guajava* L. collected in the southwest region of the Goiás state.

## **4.2. Material and Methods**

### **4.2.1. Plant material**

The experiment was conducted at the Laboratory of Natural Products Chemistry of the Instituto Federal Goiano - Campus Rio Verde, GO. In March 2014, fresh *P. guajava* leaves were collected at 4:00 p.m from a native population in the Rio Verde region. Collection took place at coordinates 17°48'12.006"S and 50°54'19.083"W, 715m altitude. Plant material was identified, and the samples were deposited as desiccated specimens in the Herbarium of the Universidade Estadual de Montes Claros, state of Minas Gerais, Brazil under identification number 4481.

#### **4.2.2. Essential oil extraction**

The essential oil was extracted from fresh leaves of *P. guajava* (100 g) ground in a knife mill by the hydrodistillation method using a Clevenger type apparatus at 100 °C for 4 h (Xavier et al. 2016). Thereafter, the hydrolate was subjected to liquid-liquid partition in a separatory funnel and three washes with three 10 mL portions of dichloromethane. Essential oil samples were stored at -4 °C until further chemical and biological tests.

#### **4.2.3. Chemical analysis of essential oil**

Essential oil chemical composition was analyzed at the Laboratory of Analysis and Synthesis of Agrochemicals of the Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais. Quantitative analysis of the essential oil components was performed in a Shimadzu GC-17A gas chromatograph equipped with a flame ionization detector (FID) and SPB-5 fused silica capillary column (30 m×0.25 mm; 0.25-µm film thickness). Nitrogen was used as the carrier gas (1.8 mL min<sup>-1</sup>), split 1/10, and injector and detector temperatures were 220 and 240 °C, respectively. The initial column temperature was 40 °C isothermal for 4 minutes, followed by heating at 3 °C min<sup>-1</sup> up to 240 °C; 1 µL of the essential oil was injected for analysis. Essential oil components were identified using a gas chromatograph (CG-EM Shimadzu, QP-5050A) equipped with a mass-selective detector, operating by electronic ionization (70 eV), with an RTX-5 fused silica column (30m×0.25mm; 0.25-µm film thickness). Chromatographic conditions were identical to the conditions applied to the CG-FID, except for the carrier gas, which in this case was helium at a 1mL min<sup>-1</sup> flow. The constituents identification was based on retention indices relative to C<sub>9</sub>–C<sub>22</sub> alkanes and by comparing the mass spectra with a computer databank (Wiley 7 and Nist 62) and with published data (Adams 2007).

#### **4.2.4. Antibacterial assays**

Bacteria were acquired from the American Type Culture Collection (ATCC) and kept in the culture collection of the Laboratory of Research on Applied Microbiology (LaPeMA) at Universidade de Franca, state of São Paulo, Brazil, at -80 °C. The following microorganisms were used: *Streptococcus salivarius* (ATCC 25975), *Streptococcus*



*mutans* (ATCC 25175), *Streptococcus mitis* (ATCC 49452), *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556) and *Streptococcus sobrinus* (ATCC 33478).

Minimum Inhibitory Concentrations (MIC) of essential oils were determined by the broth microdilution method in 96-well microplates, following the methodology of CLSI (2006). Samples were dissolved in 125  $\mu$ L tryptic soy broth (TSB) to yield compound concentrations between 50 and 400  $\mu$ g/mL. The inoculum was adjusted to 625 nm for every microorganism in a spectrophotometer to obtain cell concentration of  $5 \times 10^5$  colony-forming units (CFU/mL) (CLSI 2006). Chlorhexidine digluconate (Sigma-Aldrich), at concentrations from 0.115 to 59.0  $\mu$ g/mL, was used as positive control. The microplates were incubated at 37 °C for 24 h; then, 30  $\mu$ L 0.02 % resazurin (Sigma-Aldrich) aqueous solution was added to every well (Sarker et al. 2007). Resazurin is an oxireduction probe that enables microbial growth to be immediately observed. Blue and red colors represent the absence and the presence of microbial growth, respectively.

#### **4.2.5. Cell lines and culture conditions**

In this study, we used three different tumor 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.

#### **4.2.6. Antiproliferative assay**

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 ( $10^4$  cells/well) were plated onto 96-well microplates. Each well received 100  $\mu$ L HAM-F10/DMEM medium containing essential oil at concentrations ranging from 3.91 to 500  $\mu$ g/mL. Negative (no treatment), solvent

(0.02 % DMSO, dimethylsulfoxide, Sigma-Aldrich) and positive (doxorubicin, DXR, Pharmacia Brasil Ltda.,) controls were included. After incubation at 36.5 °C for 24 h, the culture medium was removed. The cells were washed with 100 µL of PBS (phosphate buffered saline) to remove the treatments and exposed to 100 µL of culture medium HAM-F10 without phenol red. Then, 25 µL of XTT was added, and the cells were incubated at 36.5 °C for 17 h. The samples absorbance 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 IC<sub>50</sub>, the concentration able 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 ( $p \leq 0.05$ ). The experiments were performed in triplicate. The selectivity index was calculated by dividing the IC<sub>50</sub> value of the essential oil obtained for GM07492A cells by the IC<sub>50</sub> value obtained for the cancer cell line.

### 4.3. Results and Discussion

The fresh leaves essential oil of *P. guajava* is composed mainly by hydrocarbon sesquiterpenes (62.0%), followed by oxygenated sesquiterpenes (14.8%), hydrocarbons monoterpenes (1.8%), and oxygenated monoterpenes (1.2%) (Table 1). Seventeen compounds were identified in the essential oil of *P. guajava*, which corresponded to 94.1% of the total oil analyzed and the main components are:  $\beta$ -caryophyllene (16.1%),  $\alpha$ -humulene (11.9%), aromadendrene oxide (14.7%),  $\delta$ -selinene (13.6%), and selin-11-en-4 $\alpha$ -ol (12.5%) (Table I).

#### Table 1

The chemical composition of the essential oil extracted from fresh leaves of *P. guajava*, collected in the Goiás state, showed little similarity to other oils reported in the literature for species occurring in other countries. For example, the major constituents identified in the leaf essential oil of *P. guajava* from Nepal were *E*-nerolidol (35.6%) and *E*-caryophyllene (15.8%) (Satyal et al. 2015), whereas in Tunisia, the major constituents were viridiflorol (36.4%) and *trans*-caryophyllene (5.9%) (Khadhri et al. 2014) and, in Nigeria, the predominant constituents were limonene (42.1%) and  $\beta$ -caryophyllene (21.3%) (Ogunwande et al. 2003). The essential oil chemical composition of *P. guajava*

occurring in Lavras, a municipality in the southern region of Minas Gerais, showed similarity with the chemical composition found in the present study, especially the compound selin-11-en-4 $\alpha$ -ol was present in both (Lima et al. 2010).

Regarding the antibacterial activity, several papers have reported the antimicrobial potential of plant essential oils against oral pathogens over the last decade (Sousa et al. 2015). Table 2 shows the anticariogenic activity of the fresh leaf essential oil of *P. guajava* against a representative panel of oral pathogens, with MIC values ranging from 400 to 100  $\mu\text{g/mL}$ .

### **Table 2**

According to Holetz et al. (2002), the antimicrobial activity can be considered good when MIC values are below 100  $\mu\text{g/mL}$ ; moderate from 500 to 100  $\mu\text{g/mL}$ ; weak from 1000 to 500  $\mu\text{g/mL}$ ; and inactive above 1000  $\mu\text{g/mL}$ .

The PG-EO showed moderate anti-bacterial activity against all bacteria of the genus *Streptococcus* assessed in this work. These promising data can be explained by the chemical constituents of known antibacterial activity such as caryophyllene oxide (4.1%),  $\beta$ -caryophyllene (16.1%), and  $\alpha$ -humulene (11.9%) present in the oil (Moreira et al. 2014).

Several mechanisms are proposed to explain the essential oils antimicrobial activity. It is believed that microbial growth inhibition by essential oils is due to the direct damage to cell membrane integrity caused by their lipophilic components, which affects cell pH maintenance and inorganic ion balance. According to the literature, the essential oils inhibitory effects are consistent with the action of monoterpene and sesquiterpene constituents on cell membrane, and the damage to membrane produces different effects on microorganisms (Oliveira et al. 2016).

The PG-EO cytotoxicity was assessed against the GM07492A normal cell line, with an  $\text{IC}_{50}$  of  $126.4 \pm 11.8 \mu\text{g/mL}$ , and against the MCF-7, HeLa, and MO59J tumor lines with  $\text{IC}_{50}$  of  $96.9 \pm 8.4$ ;  $128.7 \pm 1.5$ ; and  $103.6 \pm 5.1 \mu\text{g/mL}$ , respectively (Table 3). The  $\text{IC}_{50}$  of the lines MCF-7 and MO59J were significantly lower than that of the normal line, with selectivity indices of 1.2 and 1.3, respectively. The  $\text{IC}_{50}$  values of PG-EO are lower and have higher antiproliferative activity than the  $\text{IC}_{50}$  values of the leaf essential oil of *Rosmarinus officinalis* against the cell lines MCF-7 ( $\text{IC}_{50} = 190.1 \mu\text{g/mL}$ ) and LNCaP ( $\text{IC}_{50} = 180.9 \mu\text{g/mL}$ ) (Hussain et al. 2010). Hussain et al. (2010) classified  $\text{IC}_{50}$

values < 10 µg/mL as potentially very toxic, IC<sub>50</sub> from 10 to 100 µg/mL as potentially toxic, IC<sub>50</sub> from 100 to 1000 µg/mL as potentially harmful, and IC<sub>50</sub> > 1000 µg/mL as potentially non-toxic.

### **Table 3**

The evidence from this study, the high amount of terpenes, known for their anticancer activity such as β-caryophyllene (16.1 %), aromadendrene oxide (14.7 %), δ-selinene (13.6 %), selin-11-en-4α-ol (12.5 %), α-humulene (11.9 %), β-caryophyllene oxide (4.1 %), and α-cadinol (1.6 %) (Table 1), suggests that *P. guajava* essential oil 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 (1.8%) and oxygenated monoterpenes (1.2%) in the essential oil of *P. guajava* (Table 1), this class of compounds deserves special attention for its important antitumor activity (Sobral et al. 2014). Furthermore, it is worth mentioning that the anticariogenic and antiproliferative activities of the leaf essential oil of *P. guajava* occurring in the southwestern region of Goiás can also be explained by the synergistic effect among all its chemical constituents (Lesgards et al. 2014; Casanova and Costa 2017).

## **4.4. Conclusion**

The GC-MS analysis of the essential oil of *P. guajava* revealed the presence of 17 compounds, among which β-caryophyllene, α-humulene, aromadendrene oxide, δ-selinene, and selin-11-en-4α-ol were the major components. With respect to testing the antibacterial activity, the essential oil showed moderate anti-bacterial activity against all bacteria of the genus *Streptococcus* assessed in this work. Regarding the anticancer activity the essential oil is a significant potential source of pure compounds with promising anticancer activity, for presenting in its chemical composition the high amount of terpenes with anticancer properties.

## **4.5. 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.

BHUSHAN, G., SHARMA, S.K., KUMAR, S., TANDON, R. and SING, A.P., 2014. In-vitro antidermatophytic activity of essential oil of *Psidium guajava* (L.). Indian Journal of Pharmaceutical and Biological Research, vol. 2, n.2, pp. 57-59.

CASANOVA, L.M. AND COSTA, S.S., 2017. Interações sinérgicas em produtos naturais: potencial terapêutico e desafios. Revista Virtual de Química. vol. 9, n. 2, pp. 575-595.

CLSI – CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. 2006. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved Standard Seventh Edition. Clinical and Laboratory Standards Institute document M7-A7.

ESTEVAM, E.B.B., MIRANDA, M.L.D., ALVES, J.M., EGEA, M.B., PEREIRA, P.S., MARTINS, C.H.G., ESPERANDIM, V.R., MAGALHÃES, L.G., BOLELA, A.C., CAZAL, C.M., SOUZA, A.F. and 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, n. 6, pp. 1842-1854.

FERDINAND, N., CHRISTIANE, N.S., AUGUSTAVE, K., ALEX, T.C.D., RAPHAEL, K.J., JEAN-MARC, K., BORICE, T., HERMAN, N.V., MARYVONE, N.T., HERMAN, A., DJALIL, O.I.A., PIERRE, K., GALEOTTI, M. and JOSEPH, T., 2014. Effect of Guava (*Psidium guajava*) leaves essential oil on some reproductive parameters in male guinea pig (*Cavia porcellus*). Biological Systems: Open Access. vol.3, n.1, pp. 1-4.

FIDYT, K., FIEDOROWICZ, A., STRZADALA, L. and SZUMNY, A., 2016.  $\beta$ -Caryophyllene and  $\beta$ -Caryophyllene oxide – natural compounds of anticancer and analgesic properties. Cancer Medicine. vol. 5, no. 10, p. 3007-3017.

GUERRINI, A., SACCHETTI, G., GRANDINI, A., SPAGNOLETTI, A., ASANZA, M. and SCALVENZI, L., 2016. Cytotoxic effect and TLC bioautograph-guided approach to detect health properties of Amazonian *Hedyosmum sprucei* essential oil. Evidence Based Complementary and Alternative Medicine. vol. 1, no. 1, pp. 1-8.

HAIDA, K.S., HAAS, J., MELLO, S.A., HAIDA, K.S., ABRÃO, R.M. and SAHD, R., 2015. Compostos fenólicos e atividade antioxidante de goiaba (*Psidium guajava* L.) fresca e congelada. Revista Fitos. vol. 9, no. 1, pp. 37-44.

HOLETZ, F.B., PESSINI, G.L., SANCHES, N.R., CORTEZ, D.A.G., NAKAMURA, C.V. and DIAS FILHO, B.P., 2002. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. Memories the Instituto Oswaldo Cruz. vol. 97, no. 1, pp. 1027-1031.

HUSSAIN, A.I., ANWAR, F., CHATHA, S.A.S., JABBAR, A., MAHBOOB, S. and NIGAM, O.S., 2010. Rosmarinus officinalis essential oil: antiproliferative, antioxidant and antibacterial activities. Brazilian Journal of Microbiology. vol. 41, no. 4, pp. 1070-1078.

KHADHRI, A., MOKNI, R.E., ALMEIDA, C., NOGUEIRA, J.M.F. and ARAÚJO, M.E.M., 2014. Chemical composition of *Psidium guajava* L. growing in Tunisia. Industrial Crops and Products. vol. 52, no. 1, pp. 29-31.

LEMES, R.S., COSTA, G.C.S., SILVA, D.C.S., BECCENERI, A.B., BICALHO, K.U., MIRANDA, M.L.D., DINIZ, V.S.S. and CAZAL, C.M., 2017. Óleos essenciais dos frutos e folhas de *Kielmeyera coriacea*: atividade antitumoral e estudo químico. Revista Virtual de Química. vol. 9, no. 3, pp.1245-1257.

LESGARDS, J.F., BALDOVINI, N., VIDAL, N. and PIETRI, S., 2014. Anticancer activities of essential oils constituents and synergy with conventional therapies: review. Phytotherapy Research. vol. 28, no. 10, pp. 1423-1446.

LIMA, R.K., CARDOSO, M.G., ANDRADE, M.A., NASCIMENTO, E.A., MORAIS, S.A.L. and NELSON, D.L., 2010. Composition of the essential oil from leaves of tree domestic varieties and one wild variety of the guava plant (*Psidium guajava* L., Myrtaceae). Revista Brasileira de Farmacognosia. vol. 20, no. 1, pp. 41-44.

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., SILVA, C.V. and AQUINO, F.J.T., 2015. Chemical constituents and evaluation of antimicrobial and cytotoxic activities of *Kielmeyera coriacea* Mart. & Zucc. Essential oils. Evidence Based Complementary Alternative Medicine. vol. 1, no. 1, pp. 1-9.

MELO, D.C., MIRANDA, M.L.D., JÚNIOR, W.G.F., ANDRADE, P.M., ALCOBA, A.E.T., SILVA, T.S., CAZAL, C.M. and MARTINS, C.H.G., 2017. Anticariogenic and antimycobacterial activities of the essential oil of *Siparuna guianensis* Aublet (Siparunaceae). Orbital: The Electronic Journal of Chemistry. vol. 9, no. 1, pp. 55-60.

MOREIRA, R.R.D., MARTINS, G.Z., BOTELHO, V.T., SANTOS, L.E., CAVALEIRO, C., SANTOS, L.E., CAVALEIRO, C., SALGUEIRO, L., ANDRADE, G. and MARTINS, C.H.G., 2014. Composition and activity against oral pathogens of the essential oil *Melampodium divaricatum* (Rich.) DC. Chemistry and Biodiversity. vol. 11, no. 3, pp. 438-444.

OGUNWANDE, I.A., OLAWORE, N.O., ADELEKE, K.A., EKUNDAYO, O. and KOENING, W.A., 2003. Chemical composition of the leaf volatile oil of *Psidium guajava* L. growing in Nigeria. Flavour and Fragrance Journal. vol. 18, no. 2, pp. 136-138.

OLIVEIRA, L.R.A., MACHADO, R.D. and RODRIGUES, A.J.L., 2014. Levantamento sobre o uso de plantas medicinais com a terapêutica anticâncer por pacientes da unidade oncológica de Anápolis. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais. vol. 16, no. 1, pp. 32-40.

OLIVEIRA, J.D., ALVES, C.C.F., MIRANDA, M.L.D., MARTINS, C.H.G., SILVA, T.S., AMBROSIO, M.A.L.V., ALVES, J.M., SILVA, J.P. 2016. Rendimento, composição química e atividades antimicrobiana e antioxidante do óleo essencial de folhas de *Campomanesia adamantium* submetidas a diferentes métodos de secagem. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais. vol. 18, no. 2, pp.502-510.

OLIVEIRA, J.D., ALVES, D.K.M., MIRANDA, M.L.D., ALVES, J.M., XAVIER, M.N., CAZAL, C.M. and ALVES, C.C.F., 2017. Chemical composition of essential oil extracted from leaves of *Campomanesia adamantium* subjected to different hydrodistillation times. Ciência Rural. vol. 47, no. 1, pp. 1-7.

QUASSINTI, L., LUPIDI, G., MAGGI, F., SAGRATINI, G., PAPA, F., VITTORI, S., BIANCO, A. and BRAMUCCI, M., 2013. Antioxidant and antiproliferative activity of *Hypericum hircinum* L. subsp. *Majus* (Aiton) N. Robson essential oil. *Natural Product Research*. vol. 27, no. 10, pp. 862-868.

SARKER, S.D., NAHAR, L. and KUMARASAMY, Y., 2007. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. *Methods*. vol. 42, no. 4, pp. 321-324.

SALVADOR, M.J., CARVALHO, J.E., WISNIEWSKI-JR, A., KASSUYA, C.A.L., SANTOS, E.P., RIVA, D. and STEFANELLO, M.E.A., 2011. Chemical composition and cytotoxic activity of the essential oil from the leaves of *Casearia lasiophylla*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. vol. 21, no. 5, pp. 864-868.

SOBRAL, M.V., XAVIER, A.L., LIMA, T.C. and SOUSA, D.P., 2014. Antitumor activity of monoterpenes found in essential oils. *The Scientific World Journal*. vol. 1, no. 1, pp.1-35.

SOUSA, R.M.F., MORAIS, S.A.L., VIEIRA, R.B.K., NAPOLITANO, D.R., GUZMAN, V.B., MORAES, T.S., CUNHA, L.C.S., MARTINS, C.H.G., CHANG, R., AQUINO, F.J.T., NASCIMENTO, E.A. and OLIVEIRA, A., 2015. Chemical composition, cytotoxic, and antibacterial activity of the essential oil from *Eugenia calycina* Cambess. leaves against oral bacteria. *Industrial Crops and Products*. vol. 65, no. 1, pp. 71-78.

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., EGEEA, M.B., ALVES, C.C.F. and 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.

**TABLE 1** - Compounds identified in the leaf essential oil of *P. guajava* (Myrtaceae)**Table 1 - Compounds identified in the leaf essential oil of *P. guajava* (Myrtaceae)**

<b>Compound</b>	<b>RI*</b>	<b>%RA</b>
Limonene	1024	1.8
1,8-Cineole	1026	1.2
$\alpha$ -Copaene	1374	1.3
$\beta$ -Caryophyllene	1419	16.1
$\alpha$ -Humulene	1454	11.9
4,11-Selinadiene	1475	1.3
$\gamma$ -Muurolene	1478	1.4
Aromadendrene oxide	1488	14.7
$\delta$ -Selinene	1499	13.6
$\alpha$ -Panasinsene	1517	1.3
<i>trans</i> -Nerolidol	1566	3.3
$\beta$ -Caryophyllene oxide	1585	4.1
Humulene epoxide II	1612	1.4
Longipinene epoxide	1620	1.8
epi- $\alpha$ -Muurolol	1639	4.0
Selin-11-en-4 $\alpha$ -ol	1645	12.5
$\alpha$ -Cadinol	1660	1.6
Total identified		94.1
Hydrocarbon monoterpenes		1.8
Oxygenated monoterpenes		1.2
Hydrocarbon sesquiterpenes		62.0
Oxygenated sesquiterpenes		14.8

**RI\***: Retention index from the literature. **%RA**: Relative area (peak area relative to the total peak in the GC-MS chromatogram), average of three replicates.

**Table 2** - Anticariogenic activity of essential oil of *P. guajava* leaves (PG-EO) against oral bacteria

<b>Minimum inhibitory concentration (MIC) - <math>\mu</math>g/mL</b>		
<b>Species</b>	<b>CHD*</b>	
<i>Streptococcus salivarius</i>	400	0.922
<i>S. mutans</i>	200	0.922
<i>S. mitis</i>	200	3.688
<i>S. sanguinis</i>	400	0.922
<i>S. sobrinus</i>	100	0.922

<sup>a</sup>Aerobic Gram-positive bacteria; \*CHD: chlorhexidine dihydrochloride (positive control).



**Table 3** - IC<sub>50</sub> and selectivity index (SI) of essential oil of *P. guajava* leaves (PG-EO) against different cell lines.

Cell line	Treatment (µg/mL)			
	PG-EO		DXR	
	IC <sub>50</sub>	SI	IC <sub>50</sub>	SI
GM07492A	126.4 ± 11.8	-	0.5 ± 0.2	-
MCF-7	96.9 ± 8.4a	1.3	62.1 ± 2.0	-
HeLa	128.7 ± 1.5	-	5.3 ± 1.3	-
MO59J	103.6 ± 5.1a	1.2	16.2 ± 2.5	-

Doxorubicin (DXR) was used as positive controls. GM07492A (human lung fibroblasts), MCF-7 (human breast adenocarcinoma), HeLa (human cervical adenocarcinoma) and MO59J (human glioblastoma). The selectivity index is the ratio between the IC<sub>50</sub> value of the PG-EO obtained for GM07492A cells and the value found for the tumor cell line. Values are mean ± SD, n = 3. <sup>a</sup>Significantly different from the normal cell line (GM07492A) ( $p \leq 0.05$ ).