



ALEX RODRIGUES SILVA CAETANO

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE
ÓLEOS ESSENCIAIS DE CINCO ESPÉCIES DE *Eucalyptus*
SOBRE *Hemileia vastatrix* E *Penicillium citrinum***

LAVRAS – MG

2018

ALEX RODRIGUES SILVA CAETANO

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE
CINCO ESPÉCIES DE *Eucalyptus* SOBRE *Hemileia vastatrix* E *Penicillium citrinum***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, área de concentração em Química/Bioquímica, para obtenção do título de Mestre.

Profa. Dra. Maria das Graças Cardoso

Orientadora

Prof. Dr. Mário Lúcio Vilela Resende

Coorientador

LAVRAS-MG

2018

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Caetano, Alex Rodrigues Silva.

Composição química e atividade antifúngica de óleos
essenciais de cinco espécies de *Eucalyptus* sobre *Hemileia vastatrix*
e *Penicillium citrinum* / Alex Rodrigues Silva Caetano. - 2018.

68 p. : il.

Orientador(a): Maria das Graças Cardoso.

.
Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2018.

Bibliografia.

1. Produtos naturais. 2. Óleos essenciais. 3. Atividade
antifúngica. I. Cardoso, Maria das Graça. . II. Título.

ALEX RODRIGUES SILVA CAETANO

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE
CINCO ESPÉCIES DE *Eucalyptus* SOBRE *Hemileia vastatrix* E *Penicillium citrinum***

**CHEMICAL COMPOSITION AND ANTIFUNGAL ACTIVITY OF ESSENTIAL OILS OF
FIVE SPECIES OF *Eucalyptus* ON *Hemileia vastatrix* AND *Penicillium citrinum***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, área de concentração em Química/Bioquímica, para obtenção do título de Mestre.

Aprovado em 19/2/2018

Profa. Dr. Maria das Graças Cardoso

Profa. Dr. Sara Maria Chalfoun de Souza

Prof. Dr. Luiz Gustavo de Lima Guimarães

Profa. Dra. Maria das Graças Cardoso

Orientadora

LAVRAS-MG

2018

A Deus, pela vitória, sabedoria e inteligência concedida.

Aos meus pais, familiares e namorada, pelo amor, incentivo e por estarem sempre apoiando-me em todos os momentos.

Aos meus amigos e colegas.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela oportunidade de poder fazer o curso de Pós-Graduação em Agroquímica na Universidade Federal de Lavras (UFLA) e pela sabedoria e inteligência concedida para conquistar mais essa vitória.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig), pela bolsa concedida, tornando possível a realização deste trabalho.

À minha mãe, Joquiânia, que é o alicerce da minha vida, sempre apoiando-me, incentivando-me, concedendo amor e carinho, falando frases que encorajam e fazem com que eu alcance todos os meus objetivos. A meu pai, Marcilio, pelo apoio e incentivo.

Às minhas avós, Venorina e Neli, e familiares, pelo amor, carinho e zelo, que a cada dia me apoiam mais e mais.

À Profa. Maria das Graças Cardoso, pela oportunidade concedida por fazer parte da sua equipe, pelos ensinamentos, amizade, paciência e “os puxões de orelha”, que me fizeram crescer profissionalmente e socialmente.

À minha namorada, Ariane, pelo amor, amizade, companheirismo, apoio e incentivo.

Ao Departamento de Química (DQI), por me conceder os melhores anos da minha vida. A todos os professores e funcionários do DQI/UFLA, pelos ensinamentos e amizade.

A Profa. Sara Chalfoun, Caroline, Carla e Vicentina, que abiraram as portas dos laboratórios da Epamig e tiveram muita dedicação e paciência para me ensinarem a trabalhar com microrganismo, sempre apoiando-me e incentivando-me.

Ao professor Mario Lúcio, por ter apresentado a ideia deste projeto e estar sempre à disposição para discutir ideias e trabalhos.

Ao professor Luiz Gustavo de Lima Guimarães, por aceitar o convite de participar da banca avaliadora desta dissertação.

Aos amigos do Laboratório de Óleos Essenciais: Maísa, Danúbia, Maria Luíza, Karen, Luana, Vanúzia, Rafaela Brandão, Rafaela Vieira, Jéssica, Eduarda, Túlio e Letícia. Em especial à técnica de laboratório Cleusa, pela amizade e convivência. Aos amigos do Laboratório de Análise de Qualidade de Aguardente: Allan, Richard, Franciele, Gabriel, Gustavo, Wilder, Manuel, Rafaela, Ronan e a todos os meus amigos.

RESUMO

As plantas são usadas pelos seres humanos desde a antiguidade como especiarias ou como uma forma rápida, eficaz e barata para se combater doenças e microrganismos. Os óleos essenciais são formados a partir do metabolismo secundário dos vegetais, podendo ser extraídos de todos os órgãos da planta. São misturas complexas de diversos constituintes que podem apresentar diversas atividades, dentre elas, a antifúngica. O cafeeiro *Coffea* sp. é um arbusto da família Rubiaceae do gênero *Coffea* L. A semente contida dentro do seu fruto é utilizada para fabricar o café, uma das bebidas mais consumidas em todo o mundo, influenciando diretamente na economia brasileira, visto que este país é o maior produtor de café. Dois fungos que causam prejuízos na produção desses grãos são os fungos *Hemileia vastatrix* e *Penicillium citrinum*; o primeiro é conhecido como ferrugem do cafeeiro e ataca a lavoura causando uma desfolha dos arbustos, afetando diretamente a próxima produção dos frutos, enquanto os fungos *Penicillium citrinum* atacam os grãos de café durante o período de transporte e armazenamento, mudando o aspecto visual, qualitativo e quantitativo dos grãos. Objetivou-se neste trabalho realizar a caracterização química e a atividade antifúngica *in vitro* e *in vivo* dos óleos essenciais de *Eucalyptus torrelliana*, *Eucalyptus citriodora*, *Eucalyptus camaldulensis*, *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus microcorys* sobre os fungos *Hemileia vastatrix* e *Penicillium citrinum*. Os óleos essenciais foram extraídos pela técnica de hidrodestilação, empregando-se o aparelho de Clevenger modificado; a caracterização química foi realizada por CG/EM e CG/DIC; a atividade antifúngica *in vitro* dos óleos essenciais sobre *Hemileia vastatrix* foi estudada avaliando-se a concentração mínima inibitória (CMI); enquanto a atividade antifúngica *in vitro* dos óleos essenciais sobre *Penicillium citrinum* foi estudada avaliando-se o crescimento micelial. A atividade antifúngica *in vivo* foi realizada utilizando o fungo *Hemileia vastatrix*, sendo avaliados o efeito curativo e preventivo dos óleos essenciais. Os constituintes majoritários do óleo essencial de *E. citriodora* foram (citronelal, citronelol e isopulegol), de *E. torrelliana* (α -pineno, 1,8-cineol e β -pineno), de *E. camaldulensis* (1,8-cineol, α -terpineol e α -pineno), de *E. grandis* (1,8-cineol, α -pineno e α -terpineol) e de *E. microcorys* (1,8-cineol, α -pineno e trans-pinocarveol). Todos os óleos essenciais apresentaram atividade antifúngica *in vitro* e *in vivo* sobre os dois fungos em estudo, exceto o óleo essencial de *E. microcorys*, que não apresentou atividade antifúngica *in vivo*, atuando como preventivo sobre o fungo *Hemileia vastatrix*.

Palavras-chave: produtos naturais, eucalipto, atividade microbiológica, café.

ABSTRACT

Plants have been used by humans since ancient times as spices or as a quick, effective and inexpensive way to combat diseases and microorganisms. Essential oils are formed by the secondary metabolism of plants and can be extracted from all the organs of the plant. They are complex mixtures of several constituents that can present several activities, including antifungal activity. The *Coffea sp.* coffee tree is a shrub of the Rubiaceae family of the genus *Coffea* L. The seed contained in its fruit is used to make coffee, one of the most widely consumed beverages in the world, directly influencing the Brazilian economy because this country is the largest producer of coffee. Two fungi that cause losses in the production of these grains are *Hemileia vastatrix* and *Penicillium citrinum*. The former is known as the coffee tree rust, and it attacks the crop, causing a peeling of the bushes and directly affecting the next fruit production. The *Penicillium citrinum* fungus attacks the coffee beans during the transportation and storage period, changing the visual, qualitative aspect and the quantitative analysis of the grains. The objective of this work was to characterize the in vitro and in vivo antifungal activity of the essential oils of *Eucalyptus torrelliana*, *Eucalyptus citriodora*, *Eucalyptus camaldulensis*, *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus microcorys* against *Hemileia vastatrix* and *Penicillium citrinum*. The essential oils were extracted by the hydrodistillation technique, using the modified Clevenger apparatus; the chemical characterization was performed by GC/MS and GC/FID; the in vitro antifungal activity of the essential oils against *Hemileia vastatrix* was studied by evaluating the percentage of germination; The in vitro antifungal activity of the essential oils against *Penicillium citrinum* was studied by evaluating the mycelial growth. In vivo antifungal activity was performed using the *Hemileia vastatrix* fungus, and the curative and preventive effect of the essential oils were evaluated. The principal constituents of the essential oils of *E. citriodora* (citronellal, citronellol and isopulegol); *E. torrelliana* (α -pinene, 1,8-cineol and β -pinene); *E. camaldulensis* (1,8-cineole, α -terpineol and α -pinene); *E. grandis* (1,8-cineole, α -pinene and α -terpineol) and *E. microcorys* (1,8-cineole, α -pinene and *trans*-pinocarveol) were determined. In vitro and in vivo antifungal activity against the two fungi under study was observed for all the essential oils, except the essential oil from *E. microcorys*, which did not present antifungal activity in vivo, but acted as a preventive agent against the fungus *Hemileia vastatrix*.

Keywords: natural products, eucalyptus, microbiological activity, coffee.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|--------------------|---|----|
| Figura 1 | Estrutura química do isopreno..... | 16 |
| Figura 2 | Rota metabólica para formação de monoterpenos, sesquiterpenos e diterpenos a partir do ácido mevalônico..... | 17 |
| Figura 3 | Rota metabólica para formação IPP a partir da via DXPS..... | 20 |
| Figura 4 | Rota metabólica para formação dos fenilpropanoides a partir do ácido chiquímico..... | 23 |
| Figura 5 | Estrutura molecular do eugenol, limoneno, carvacrol e geraniol | 25 |
| Figura 6 | Aspecto geral de uma espécie de <i>Eucalyptus</i> sp..... | 26 |
| Figura 7 | Constituintes químicos comumente encontrados nos óleos essenciais de <i>Eucalyptus</i> spp..... | 27 |
| Figura 8 | Aspectos geral de um cafeeiro..... | 28 |
| Figura 9 | Aspecto geral da ferrugem do cafeeiro causada pelo fungo (<i>Hemelia vastatrix</i> B.)..... | 30 |
| Figura 10 | Aspecto geral do <i>Penicillium citrinum</i> | 31 |
| Figura 11 | Cromatograma do óleo essencial extraído das folhas de <i>Eucalyptus grandis</i> | 38 |
| Figura 12 | Cromatograma do óleo essencial extraído das folhas de <i>Eucalyptus camaldulensis</i> | 39 |
| Figura 13 | Cromatograma do óleo essencial extraído das folhas de <i>Eucalyptus citriodora</i> | 40 |
| Figura 14 | Cromatograma do óleo essencial extraído das folhas de <i>Eucalyptus microcorys</i> | 42 |
| Figura 15 | Cromatograma do óleo essencial extraído das folhas de <i>Eucalyptus torreliana</i> | 43 |
| Figura 16 | Foto dos esporos de <i>Hemileia vastatrix</i> não germinados..... | 46 |
| Figura 17 a e b | Comparação do aspecto físico dos esporos de <i>Hemileia vastatrix</i> antes (a) e após (b) o tratamento com óleo essencial de <i>E. torreliana</i> | 46 |
| Figura 18 | Atividade antifúngica do óleo essencial de <i>Eucalyptus camaldulensis</i> sobre <i>Penicillium citrinum</i> | 49 |
| Figura 19 | Atividade antifúngica do óleo essencial de <i>Eucalyptus citriodora</i> sobre <i>Penicillium citrinum</i> | 49 |
| Figura 20 | Atividade antifúngica do óleo essencial de <i>Eucalyptus microcorys</i> sobre <i>Penicillium citrinum</i> | 50 |
| Figura 21 | Atividade antifúngica do óleo essencial de <i>Eucalyptus torreliana</i> sobre <i>Penicillium citrinum</i> | 50 |
| Figura 22 | Atividade antifúngica do óleo essencial de <i>Eucalyptus grandis</i> sobre <i>Penicillium citrinum</i> | 51 |
| Figura 23 | Aspecto geral de uma folha de cafeeiro após o tratamento com controle negativo (água), apresentando todas as pústulas esporuladas com <i>Hemileia vastatrix</i> | 53 |
| Figura 24 | Aspecto geral de uma folha de cafeeiro tratada com uma solução de leite em pó, com todas as pústulas esporuladas com <i>Hemileia vastatrix</i> | 54 |
| Figura 25 a e b | Aspecto geral das folhas dos cafeeiros após os tratamentos com os óleos essenciais de <i>E. camaldulensis</i> (a) e <i>E. microcorys</i> (b) que estavam infectadas por <i>Hemileia vastatrix</i> . A folha à esquerda em cada imagem é referente aos tratamentos com os óleos essenciais de <i>E. camaldulensis</i> e <i>E. microcorys</i> , respectivamente, e a folha à direita em cada imagem é referente ao controle negativo..... | 55 |

| | | |
|--------------------|---|----|
| Figura 26 | Aspecto geral dos tratamentos com <i>E. grandis</i> (a) e <i>E. citriodora</i> (b) sobre mudas de cafeeiro contendo as folhas infectadas com <i>Hemileia vastatrix</i> . A folha à esquerda de cada imagem é referente aos tratamentos com os óleos essenciais de <i>E. grandis</i> e <i>E. citriodora</i> , respectivamente, e a folha à direita de cada imagem é referente ao controle negativo..... | 55 |
| Figura 27 | Aspecto geral de uma folha de cafeeiro tratada com uma solução do fungicida controle, com todas as pústulas sem esporos de <i>Hemileia vastatrix</i> | 56 |
| Figura 28 | Aspecto geral de folhas de cafeeiro referente ao controle negativo com todas as pústulas esporuladas com <i>Hemileia vastatrix</i> | 57 |
| Figura 29 | Aspecto geral dos tratamentos com <i>E. grandis</i> sobre as folhas de cafeeiro, mediante a avaliação do efeito preventivo. As duas primeiras folhas à esquerda da imagem são referentes aos tratamentos com o óleo essencial de <i>E. grandis</i> e a folha à direita da imagem é referente ao controle negativo..... | 57 |
| Figura 30 a e b | Aspecto geral das folhas de cafeeiro após os tratamentos com os óleos essenciais de <i>E. camaldulensis</i> (a) e <i>E. citriodora</i> (b) sobre folhas de cafeeiro, avaliando o efeito preventivo. A folha à esquerda de cada imagem é referente aos tratamentos com os óleos essenciais de <i>E. camaldulensis</i> e <i>E. citriodora</i> , respectivamente, e a folha à direita de cada imagem é referente ao controle negativo..... | 58 |
| Figura 31 | Aspecto geral de uma muda de cafeeiro com as folhas necrosadas após o tratamento com <i>E. camaldulensis</i> mediante a avaliação do seu efeito preventivo..... | 58 |
| Figura 32 | Aspecto geral da folha de um cafeeiro após o tratamento com <i>E. microcorys</i> , mediante o seu efeito preventivo..... | 59 |
| Figura 33 | Aspecto geral de uma folha de cafeeiro tratada com uma solução do fungicida controle, não apresentado pústulas com <i>Hemileia vastatrix</i> | 59 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|-----------|---|----|
| Tabela 1 | Número de registro e coordenadas geográficas das espécies de <i>Eucalyptus</i> utilizadas..... | 32 |
| Tabela 2 | Composição química do óleo essencial de <i>Eucalyptus grandis</i> | 38 |
| Tabela 3 | Composição química do óleo essencial de <i>Eucalyptus camaldulensis</i> | 40 |
| Tabela 4 | Composição química do óleo essencial de <i>Eucalyptus citriodora</i> | 41 |
| Tabela 5 | Composição química do óleo essencial de <i>Eucalyptus microcorys</i> | 42 |
| Tabela 6 | Composição química do óleo essencial de <i>Eucalyptus torreliana</i> | 43 |
| Tabela 7 | Atividade antifúngica <i>in vitro</i> dos óleos essenciais sobre <i>Hemileia vastatrix</i> | 45 |
| Tabela 8 | Atividade antifúngica <i>in vitro</i> dos óleos essenciais de cinco espécies <i>Eucalyptus</i> sobre <i>Penicillium citrino</i> | 48 |
| Tabela 9 | Efeito curativo dos óleos essenciais de <i>Eucalyptus</i> sobre <i>Hemileia vastatrix</i> | 53 |
| Tabela 10 | Efeito preventivo dos óleos essenciais de <i>Eucalyptus</i> sobre <i>Hemileia vastatrix</i> . | 56 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|--------|--|
| CG/EM | Cromatografia gasosa acoplada a um detector de espectrômetro de massas |
| CG/DIC | Cromatografia gasosa acoplada a um detector de ionização em chama |
| CM | Crescimento micelial |
| CMI | Concentração mínima inibitória |

SUMÁRIO

| | | |
|---------|--|----|
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 13 |
| 2 | REFERENCIAL TEÓRICO..... | 14 |
| 2.1 | Metabolismo secundário..... | 14 |
| 2.2 | Óleos essenciais..... | 15 |
| 2.2.1 | Biossíntese dos terpenos e fenilpropanoides, constituintes dos óleos essenciais..... | 16 |
| 2.2.1.1 | Terpenos..... | 16 |
| 2.2.1.2 | Fenilpropanoides..... | 22 |
| 2.2.2 | Atividade biológica dos óleos essenciais e plantas aromáticas..... | 23 |
| 2.3 | Espécies eucaliptos (<i>Eucalyptus</i> spp.)..... | 25 |
| 2.4 | Cafeeiro (<i>Coffea</i> sp.)..... | 27 |
| 2.5 | Ferrugem do cafeeiro (<i>Hemileia vastatrix</i> B.)..... | 29 |
| 2.6 | <i>Penicillium citrinum</i> | 31 |
| 3 | MATERIAL E MÉTODOS..... | 32 |
| 3.1 | Escolha das plantas para extração dos óleos essenciais..... | 32 |
| 3.2 | Coleta do material vegetal..... | 32 |
| 3.3 | Extração dos óleos essenciais..... | 33 |
| 3.4 | Caracterização química dos óleos essenciais..... | 33 |
| 3.5 | Determinação da atividade antifúngica <i>in vitro</i> dos óleos essenciais sobre <i>Hemileia vastatrix</i> | 34 |
| 3.6 | Determinação da atividade antifúngica <i>in vitro</i> dos óleos essenciais sobre <i>Penicillium citrinum</i> | 35 |
| 3.7 | Determinação da atividade antifúngica <i>in vivo</i> dos óleos essenciais sobre <i>Hemileia vastatrix</i> | 35 |
| 3.7.1 | Determinação do efeito curativo dos óleos essenciais sobre <i>Hemileia vastatrix</i> | 36 |
| 3.7.2 | Determinação do efeito preventivo dos óleos essenciais sobre <i>Hemileia vastatrix</i> | 36 |
| 3.8 | Análise estatística..... | 37 |
| 4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 37 |
| 4.1 | Composição química dos óleos essenciais de cinco espécies de <i>Eucalyptus</i> | 37 |
| 4.2 | Atividade antifúngica <i>in vitro</i> dos óleos essenciais sobre <i>Hemileia vastatrix</i> | 44 |
| 4.3 | Atividade antifúngica <i>in vitro</i> dos óleos essenciais sobre <i>Penicillium citrinum</i> | 47 |
| 4.4 | Atividade antifúngica <i>in vivo</i> dos óleos essenciais sobre <i>Hemileia vastatrix</i> | 53 |
| 5 | CONCLUSÃO..... | 62 |
| 6 | CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 62 |
| 7 | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 63 |

1. INTRODUÇÃO

O cafeeiro *Coffea* ssp. é um arbusto da família Rubiaceae do gênero *Coffea* L., originário da Etiópia e abrange 103 espécies. Atualmente, essa cultura está presente em vários países. A semente contida em seu fruto é utilizada para fabricação do café e derivados, sendo o café uma das bebidas mais consumidas em todos os continentes. O Brasil é o maior produtor de grãos de café do mundo e essa atividade agropecuária movimenta a economia brasileira, gerando empregos diretos e indiretos.

A ferrugem, considerada a principal doença que incide sobre os cafezais em todo o mundo, foi detectada no Brasil em 1970. Desde então, seu controle tem acrescentado custos à produção e, quando não controlada, a doença reduz significativamente a qualidade, produtividade e longevidade das plantas. Outro fator que afeta os grãos de café é o ataque do fungo *Penicillium citrinum*, comprometendo diretamente a qualidade do grão, modificando seu aspecto visual e causando perda quantitativa e qualitativa do produto.

Para combater os microorganismos comumente encontrados na lavoura e após a colheita, são utilizados controladores químicos; porém, esses produtos possuem em sua composição substâncias que podem causar danos aos aplicadores e ao meio ambiente, além de apresentarem riscos de resíduos presentes no produto final. Dessa forma, torna-se incessante a busca por substâncias de origem natural que possuem atividade antimicrobiana e que possam ser utilizados como controladores químicos naturais, minimizando os danos ao meio ambiente, aos agricultores e aos consumidores.

Em contrapartida aos malefícios originados pelo uso dos controladores químicos, os óleos essenciais, por suas diversas propriedades biológicas, vêm sendo uma alternativa viável na substituição desses produtos. Eles são compostos por substâncias de origem natural formados pelo metabolismo secundário de diversas espécies de plantas, dando origem à mistura complexa de diversos compostos que possuem dentre outras atividades, a antifúngica. Essa atividade pode ser evidenciada devido à composição química rica em terpenos e fenilpropanoides ou pelo sinergismo dos constituintes presentes nos óleos essenciais.

A inocuidade dos óleos essenciais permite sua incorporação a alimentos *in natura*, com o intuito de aumentar suas vidas de prateleira, evitando, assim, sua degradação por fungos e bactérias.

Dentre os principais países produtores de óleos essenciais de *Eucalyptus* spp., o Brasil destaca-se, estando em quinto lugar, sendo as espécies *Eucalyptus citriodora* e *Eucalyptus globus* as mais utilizadas, por apresentarem em sua composição química altas concentrações de

citronelal e 1,8-cineol respectivamente, substâncias muito utilizadas na medicina e na indústria de cosméticos.

Objetivou-se neste trabalho caracterizar quimicamente os óleos essenciais de *Eucalyptus torelliana*, *Eucalyptus citriodora*, *Eucalyptus camaldulensis*, *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus microcorys* e avaliar a atividade antifúngica desses óleos essenciais sobre o fungo *Hemileia vastatrix*, que ataca a cultura cafeeira, e o fungo *Penicillium citrinum*, que causa danos aos grãos de café durante o período de armazenamento.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Metabolismo secundário

Metabolismo é definido como um conjunto de reações que estão ocorrendo continuamente nas células, formando ou degradando componentes e fornecendo nutrientes essenciais para manter a vida celular.

O metabolismo é dividido em primário e secundário. O metabolismo primário é aquele em que há a formação de nutrientes essenciais para a vida celular, já o metabolismo secundário é definido pela síntese dos metabólitos que não são essenciais para a vida celular, mas que garantem vantagens para a sobrevivência e para a perpetuação da espécie vegetal em seu ecossistema (SIMÕES et al., 2007).

As vantagens dos metabólitos secundários são diversas, como defesa contra herbívoros e microrganismos, proteção contra a luz ultravioleta, atração de polinizadores ou animais dispersores de sementes e como intercessores das interações entre as plantas (alelopatia) (GOOBO-NETO; LOPES, 2007).

A produção de metabólitos secundários nas plantas pode ocorrer em um estágio de vida da planta ou em seu desenvolvimento e em processo de estresse causado por limitações nutricionais ou ataque microbiológico. A origem dessas substâncias ocorre a partir do metabolismo da glicose, sendo os principais intermediários o ácido chiquímico e o acetil-CoA, formando os alcaloides, os flavonoides, os taninos, as cumarinas, as quinonas, os terpenos, os fenilpropanoides, entre outros (SIMÕES et al., 2007).

2.2 Óleos essenciais

Dentre os metabólitos secundários, os constituintes de óleos essenciais vêm sendo largamente estudados. Os óleos essenciais são misturas complexas de compostos orgânicos, obtidos de plantas, tendo como componentes principais terpenos e fenilpropanoides. A composição de um óleo essencial pode variar com a mudança climática, solo, época de coleta, altitude, método de extração e os diferentes biótipos da espécie. Os métodos mais utilizados para realizar a extração dos óleos essenciais são a hidrodestilação, e a destilação por arraste a vapor d'água, podendo também serem extraídos por prensagem, que é bastante utilizado para obter óleo essencial de pericarpo de frutas cítricas (DE SOUZA et al., 2013; SANTOS et al., 2015).

Podem-se utilizar todos os órgãos da planta para se obter o óleo essencial, sendo as folhas mais utilizadas, podendo também extrair o óleo essencial das cascas, flores, rizomas e frutos (DE SOUZA et al., 2013).

Além de apresentar atividades microbiológica e antioxidante, os óleos essenciais podem proporcionar atividades antitumoral e anti-inflamatória e podem exercer diversas outras funções (ABU-DARWISH, et al. 2015).

Após o processo de extração de diversos óleos essenciais, como de eucalipto, canela, gengibre e outros, eles são destinados às indústrias alimentícias e cosméticas. Contudo, apenas uma pequena parcela dos óleos essenciais é usada na indústria farmacêutica como coadjuvante em remédios, bem como na medicina (CAVALEIRO, 2007; DE SOUZA et al., 2013).

Na indústria de alimentos, a busca por antioxidantes naturais que possam ser altamente eficazes e capazes de substituir antioxidantes e antimicrobianos sintéticos como o BHT (2,6-di-*tert*-butil-4-hidroxitolueno), BHA (3-*tert*-butil-4-hidroxianisol) e outros é cada vez maior. Os óleos essenciais são substâncias naturais, e dependendo da matéria-prima utilizada, podem apresentar vários componentes com diferentes atividades, como o limoneno, o carvacrol e o eugenol, que são substâncias bioativas que reduzem o crescimento de microrganismos e inibem a oxidação lipídica (SHARAFATI-CHALESHTORI et al., 2014).

Vários produtos à base de óleos essenciais apresentam-se com rótulos mascarados, seja pelo óleo essencial usado que não condiz com o do rótulo, seja pelas atividades que não são verídicas como expressa na embalagem do produto; sendo assim, faz-se necessário o uso de alguns testes para avaliar o potencial desses óleos essenciais (BENTAYEB et al., 2014).

2.2.1 Biossíntese dos terpenos e fenilpropanoides constituintes dos óleos essenciais

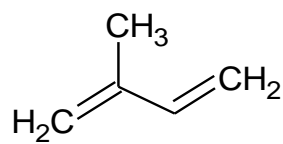
Compostos pertencentes às classes dos terpenos e fenilpropanoides são os principais constituintes dos óleos essenciais.

2.2.1.1 Terpenos

São predominantes na constituição química dos óleos essenciais e podem ser formados a partir de duas vias, representados pela via do mevalonato e pela via 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato (DXPS). Nos óleos essenciais, são mais comuns a presença de monoterpenos e sesquiterpenos que possuem em sua composição 10 e 15 átomos de carbono, respectivamente.

A unidade básica dos terpenos é o 2-metil-1,3-butadieno (isopreno) com 5 átomos de carbono (Figura 1).

Figura 1- Estrutura química do isopreno



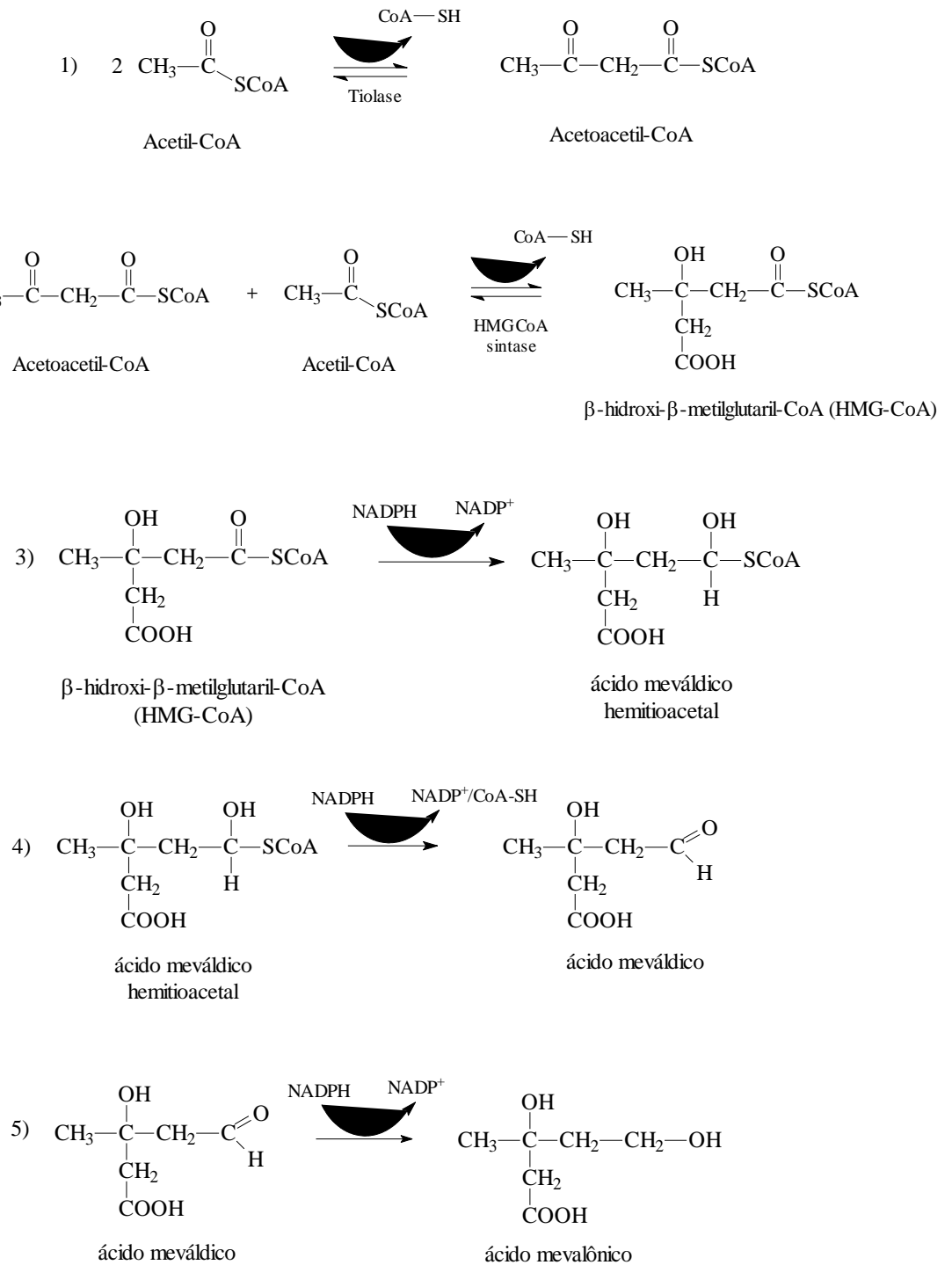
Fonte: do autor

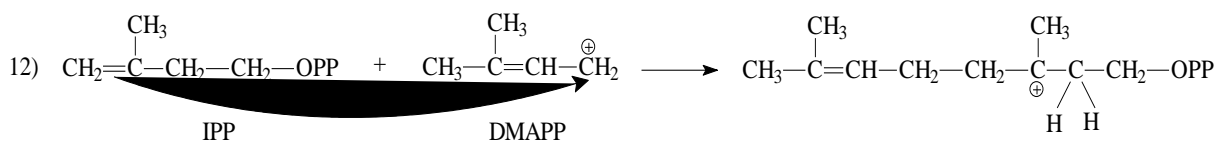
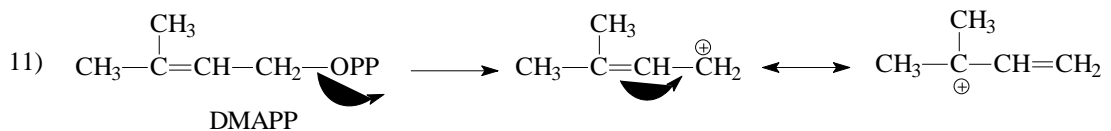
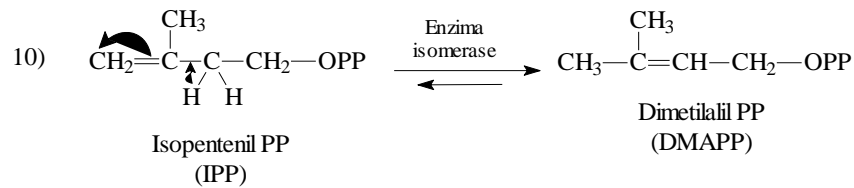
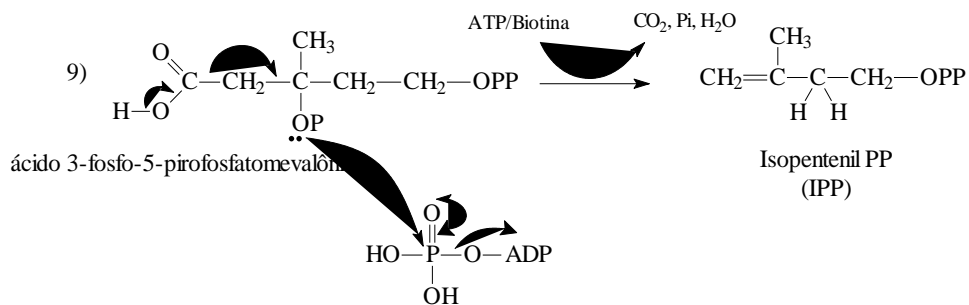
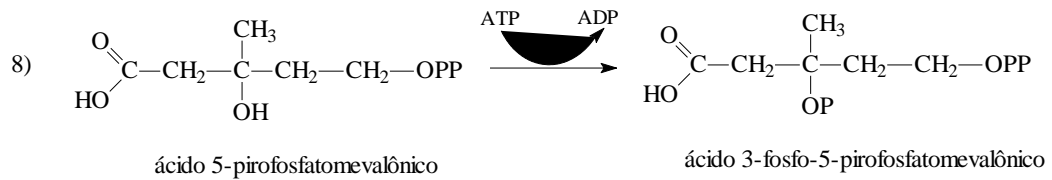
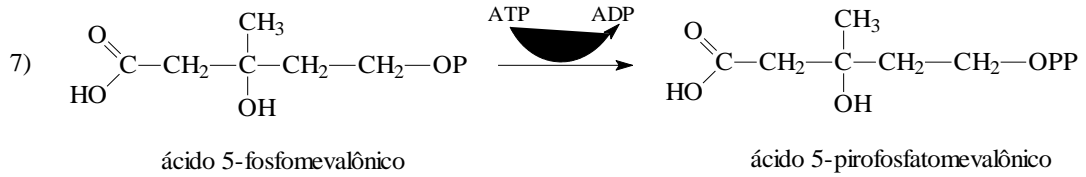
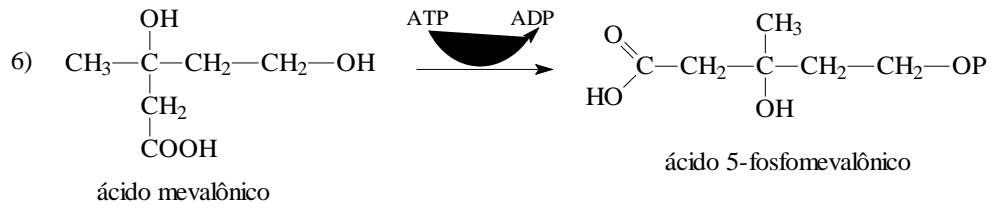
A união de moléculas isopreno leva à formação de monoterpenos (10 átomos de carbono), sesquiterpenos (15 átomos de carbono), diterpenos (20 átomos de carbono) e assim sucessivamente; nos óleos essenciais, predominam os monoterpenos e os sesquiterpenos. Estes são formados por duas rotas metabólicas distintas: a via do mevalonato e a via 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato (DXPS). Na primeira, o difosfato de isopentenil (IPP), unidade ativa dos terpenos, é formado a partir do ácido mevalônico, sendo conhecido como a via clássica para formação dos terpenos, de ocorrência no citosol e retículo endoplasmático. Na segunda, conhecida também como via alternativa, o IPP é formado a partir do piruvato e do gliceraldeído-3-fosfato, sendo essa de ocorrência nos plastídios (ADAM, 1998; BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2000; DEWICK, 2009).

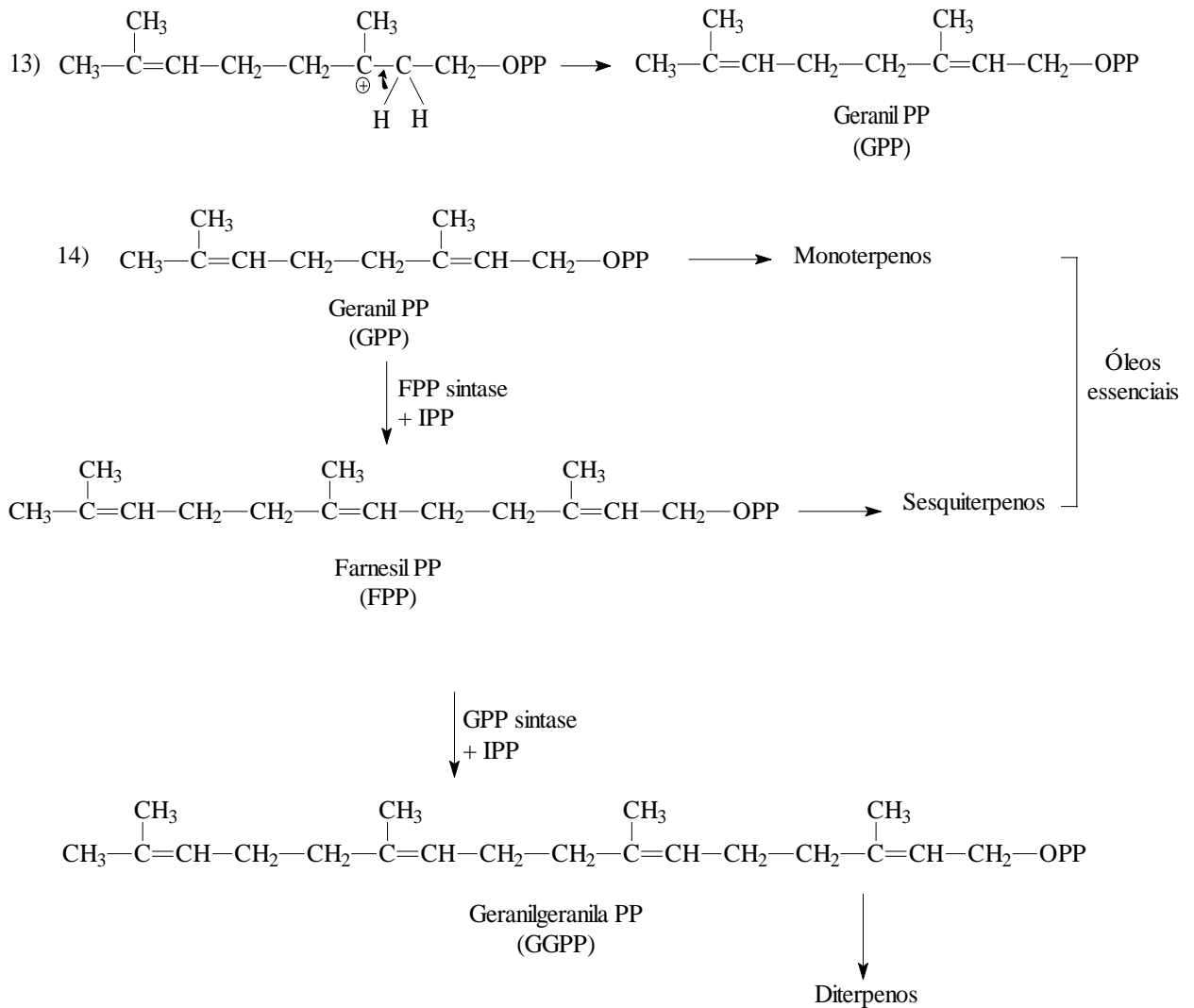
Na síntese do IPP pela via do ácido mevalônico (Figura 2), ocorre a condensação de três moléculas de acetil-CoA, reações catalisadas pelas enzimas tiolase e hidroximetilglutaril-CoA redutase, formando como produto o 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA). Em seguida, o HMG-CoA forma o ácido mevalônico pela ação da enzima HMG-CoA redutase. O ácido

mevalônico, então, sofre duas fosforilações sequenciais, gastando ATP e uma subsequente fosforilação/descarboxilação, seguida por uma eliminação para formar o IPP (ADAM 1998; BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2000; DEWICK, 2009).

Figura 2- Rota metabólica para formação de monoterpenos, sesquiterpenos e diterpenos a partir do ácido mevalônico.



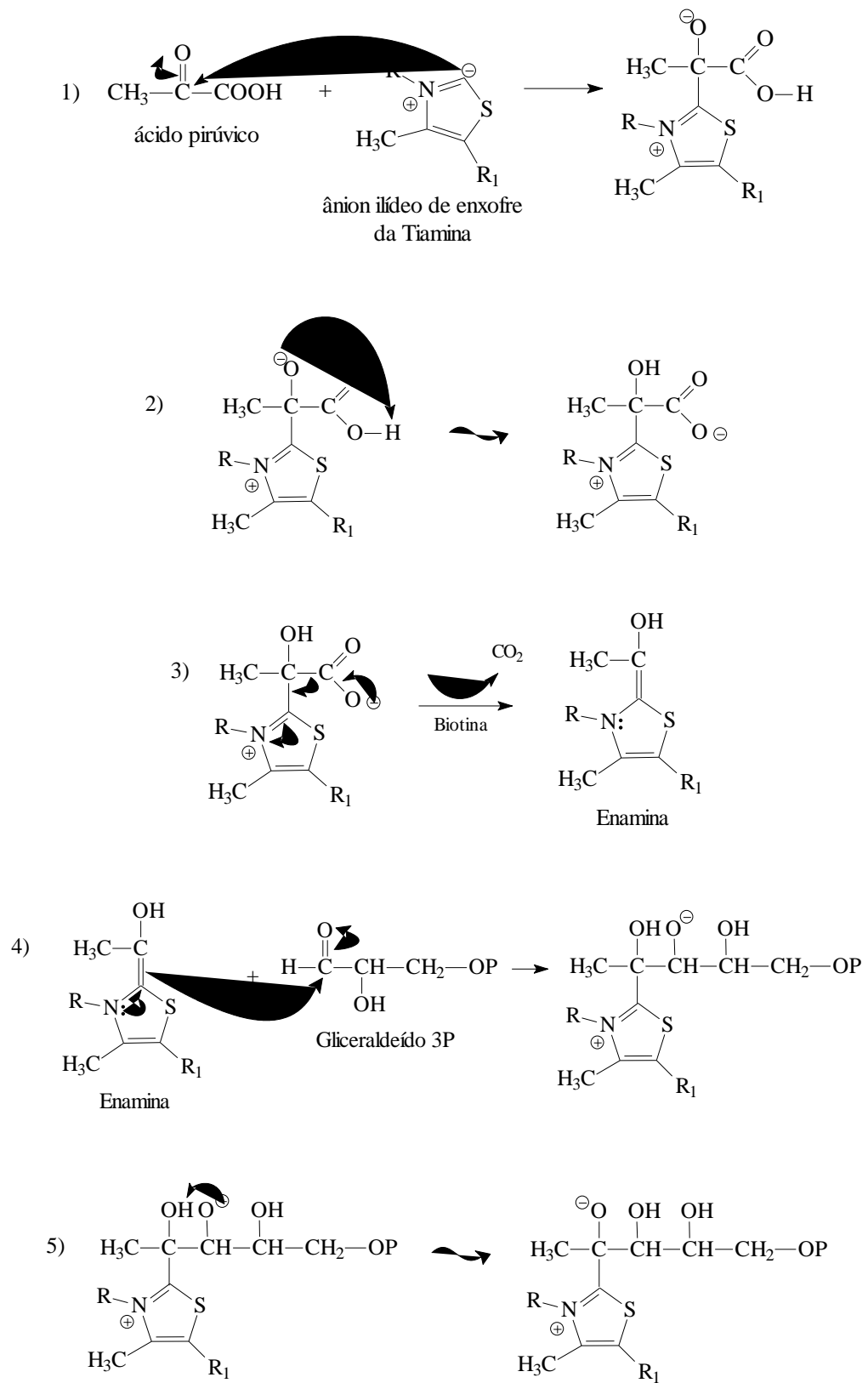


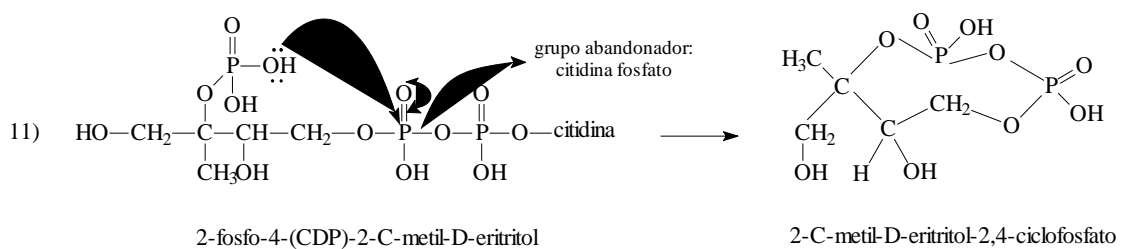
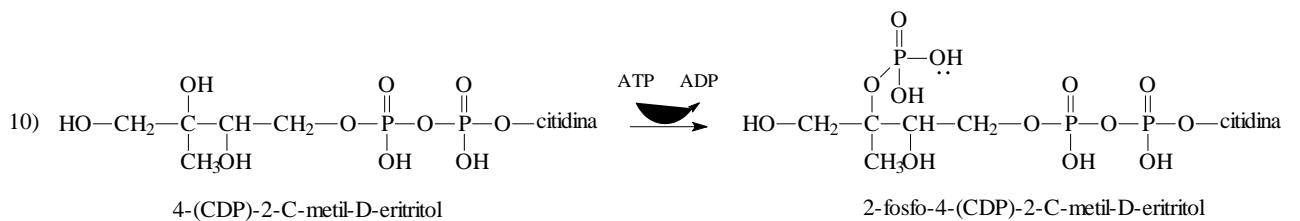
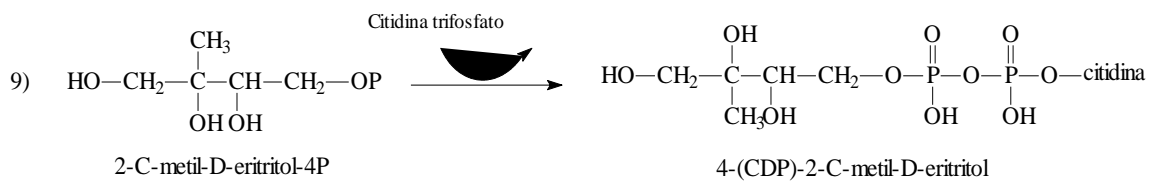
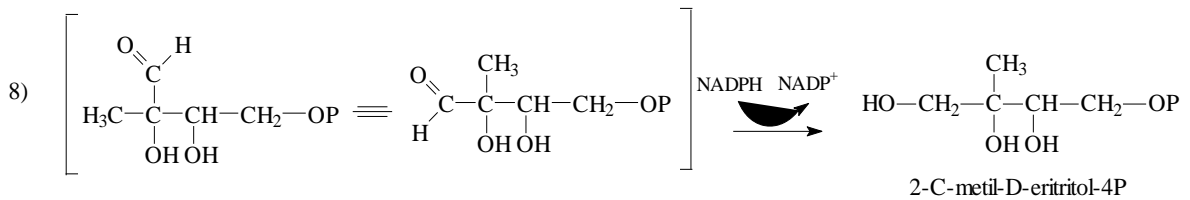
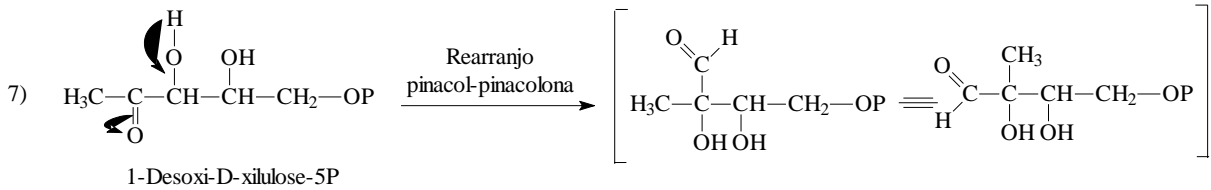
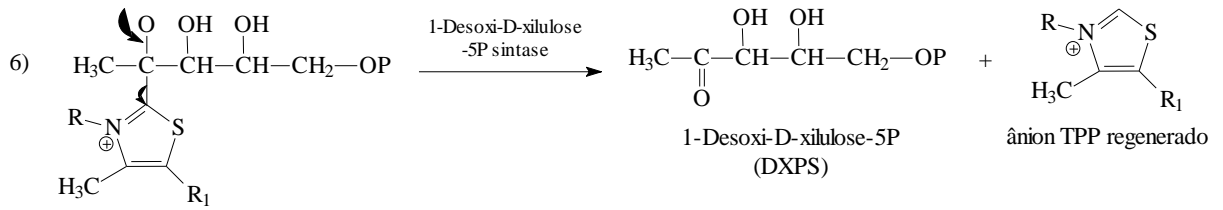


Fonte: Teixeira (2016)

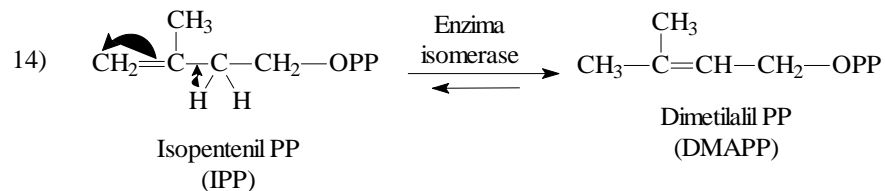
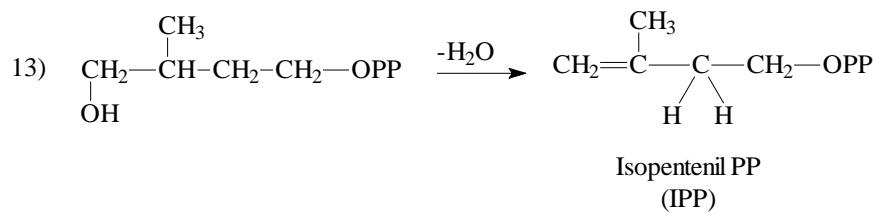
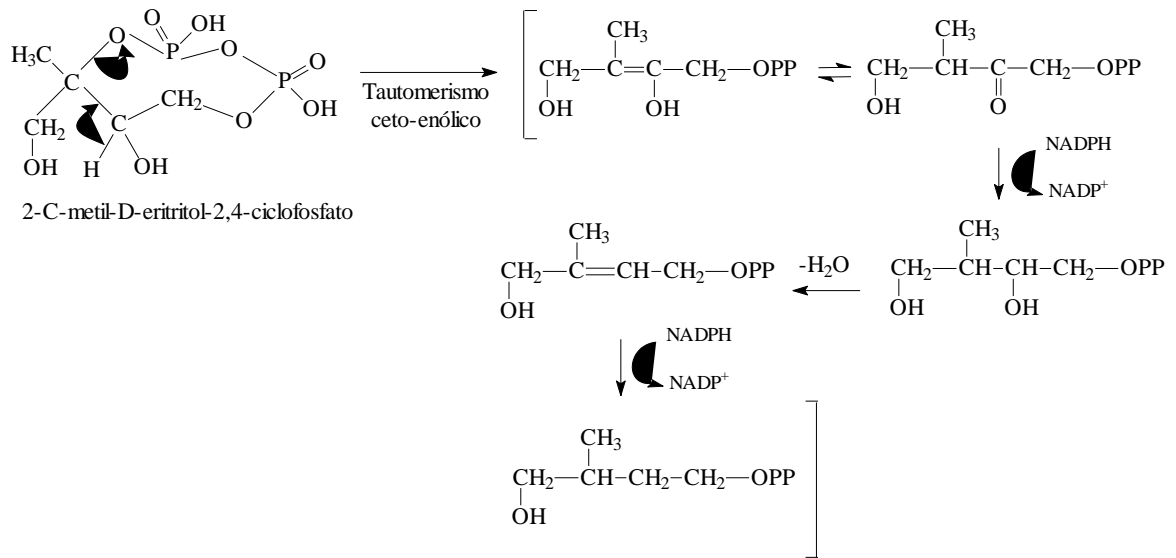
Na rota alternativa DXPS (Figura 3), a formação do IPP ocorre pela junção do piruvato com o gliceraldeído-3-fosfato. O piruvato reage com a tiamina pirofosfato (TPP) para formar o hidroxietil-TPP, que se condensa com o gliceraldeído pela ação de uma transcetolase. O TPP é liberado, em seguida, formando um composto intermediário de cinco átomos de carbonos 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato, que se rearranja e, em seguida, sofre uma redução, formando 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato, que é transformado a IPP (ADAM 1998; BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2000; DEWICK, 2009).

Figura 3- Rota metabólica para formação do IPP a partir da via DXPS.





12)

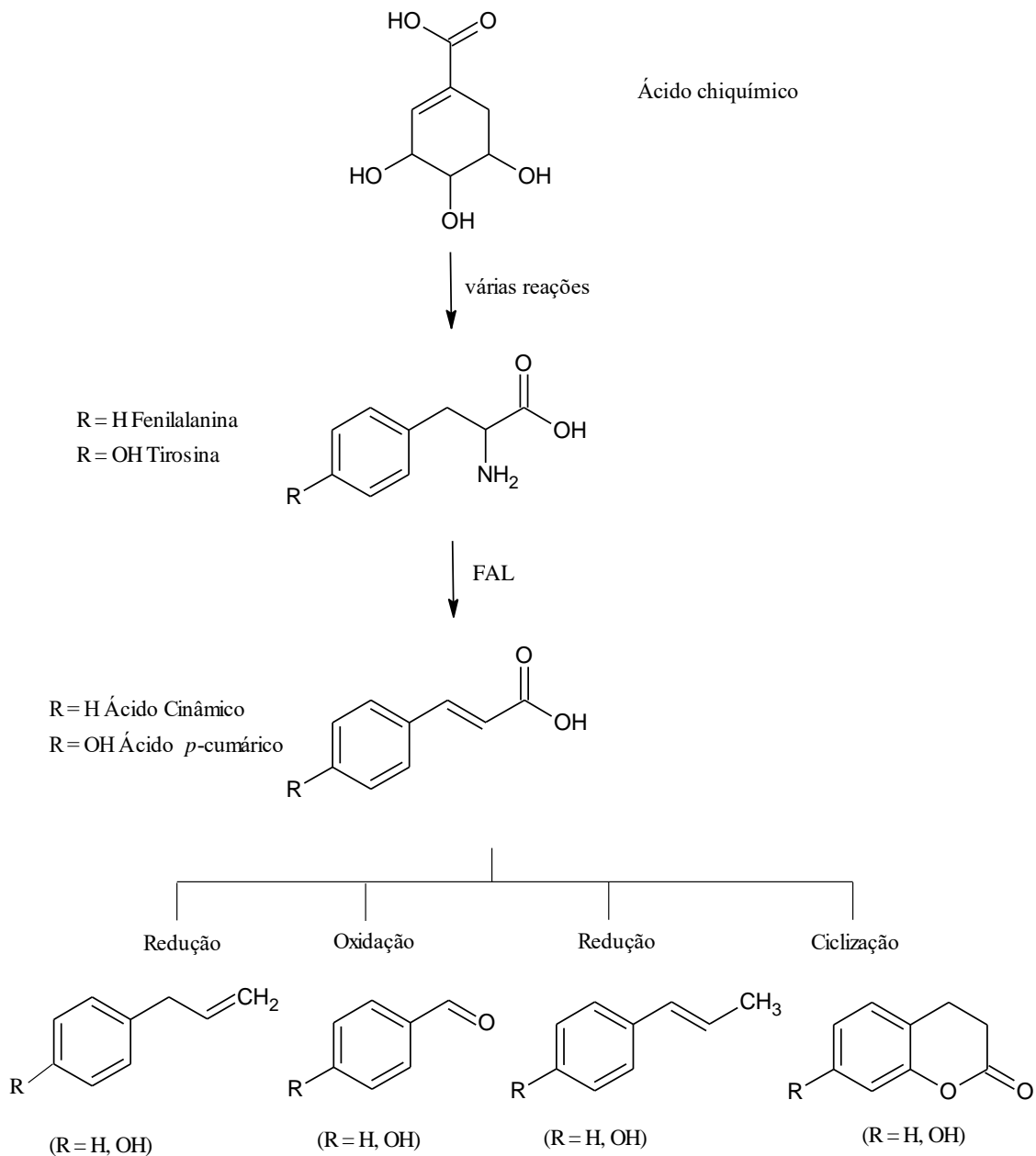


Fonte: Teixeira (2016).

2.2.1.2 Fenilpropanoides

Os fenilpropanoides são formados a partir do ácido chiquímico (Figura 4), que formam unidades básicas de ácido cinâmico e *p*-cumárico. Esses ácidos formados sofrem uma redução enzimática, produzindo propenilbenzeno e/ou alilbenzenos e, por meio de uma oxidação e redução das cadeias laterais, geram os diferentes fenilpropanoides.

Figura 4- Rota metabólica para formação de fenilpropanoides a partir do ácido chiquímico.



Fonte: SIMÕES et al., 2007.

2.2.2 Atividade biológica dos óleos essenciais e plantas aromáticas

Diversas atividades farmacológicas são atribuídas aos óleos essenciais decorrentes da sua composição diversificada, apresentando atividades anti-inflamatória, antioxidante, microbiológica, alelopática, anticarcinogênica, antiviral, atuando também no sistema digestivo e no aparelho respiratório como analgésico (CAVALEIRO, 2007).

Os radicais livres tem sido os causadores de diversas doenças, como câncer, doenças degenerativas e na aceleração do envelhecimento; com isso, aumentou-se a busca por substâncias que promovem atividade antioxidante e que estabilizam essas substâncias. As atividades antioxidantes dos óleos essenciais foram comprovadas por Rezende et al., (2017), utilizando os óleos essenciais extraídos das folhas de *Mentha piperita*, *Cymbopogon citratus*, *Rosmarinus officinalis*, *Peumus boldus* e *Foeniculum vulgare*, empregando-se os métodos de sequestro de radicais livres DPPH, ABTS e β - caroteno/ácido linoleico.

Paralelo à atividade antioxidante, a atividade antitumoral é uma das atividades farmacológicas dos óleos essenciais que vêm sendo largamente pesquisada. Estudos realizados por De Oliveira et al., (2015), utilizando o óleo essencial de *Callistemon viminalis*, que possui como constituintes majoritários o 1,8-cineol, α -pineno e α -terpineol, sobre melanoma, encontraram resultados positivos, reduzindo a viabilidade celular após o tratamento com esse óleo essencial em 40%.

A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais é bastante estudada e requisitada em diversas áreas, principalmente em engenharia de alimentos, uma vez que os óleos essenciais podem ser incorporados a diversos produtos alimentícios, garantindo uma maior vida de prateleira a esses produtos. Camargo et al., (2017) comprovaram a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Hyptis carpinifolia* Benth (rosmaninho) sobre *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Choleraesuis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea* e *Fusarium oxysporum*, microrganismos responsáveis por contaminar alimentos.

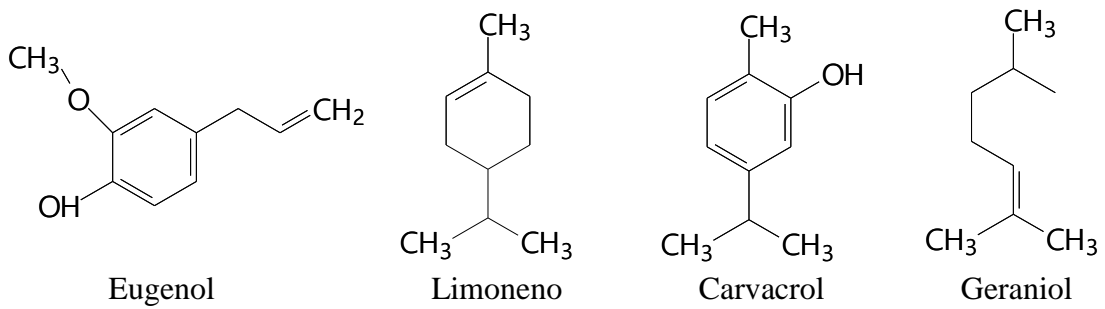
Na agricultura, além da atividade antimicrobiana, a atividade alelopática dos óleos essenciais tem sido alvo de estudos, uma vez que proporcionam uma melhor produtividade nas culturas. Alvarenga et al., (2015), em estudos sobre atividade alelopática dos óleos essenciais de capim-limão (*Cymbopogon citratus* L.), alfavaca (*Ocimum gratissimum* L.) e manjerição (*Ocimum basilicum* L.), em cultura de alface, encontraram resultados positivos de uma maior germinação e o vigor de aquênios, após o tratamento da plantação com esses óleos essenciais.

A busca por substâncias de origem natural que contenham diversas atividades como as citadas anteriormente vem crescendo cada vez mais, pelo fato de alguns patógenos desenvolverem resistência a alguns produtos sintéticos (MSAADA et al., 2015).

Os constituintes químicos dos produtos naturais desejados são aqueles que apresentam diversas atividades, mas que não são nocivos a quem os ingere, ou prejudicial ao meio ambiente, como no caso dos produtos naturais utilizados para combater patógenos na lavoura. Citam-se alguns desses compostos, como o eugenol, o limoneno, o carvacrol e o geraniol (Figura 5), que

têm sido bastante utilizados, pois não promovem ação mutagênica em baixas concentrações e podem ser facilmente encontrados em diversos produtos de origem natural (SHARAFATI-CHALESHTORI et al., 2013).

Figura 5- Estrutura molecular do eugenol, limoneno, carvacrol e geraniol



Fonte: do autor

2.3 Espécies de eucaliptos (*Eucalyptus* spp.)

As espécies de *Eucalyptus* spp. (Figura 6) são de origem australiana, mas se desenvolvem em todo o mundo. Acredita-se que as primeiras mudas de *Eucalyptus* sp. no Brasil foram plantadas no Rio de Janeiro, em 1824, no Jardim Botânico. Hoje, os eucalyptus são utilizados para a produção de celulose na indústria de papel e na produção de carvão que abastece as usinas siderúrgicas como fonte de energia. No entanto, ainda é baixa a utilização dessas plantas para a extração de óleo essencial, prática essa que tem aumentado nos últimos anos (SILVA; BRITO; SILVA, 2006; CASTRO et al., 2016).

Figura 6- Aspecto geral de uma espécie de *Eucalyptus* sp.



Fonte: https://es.wikipedia.org/wiki/Eucalyptus_dalrympleana

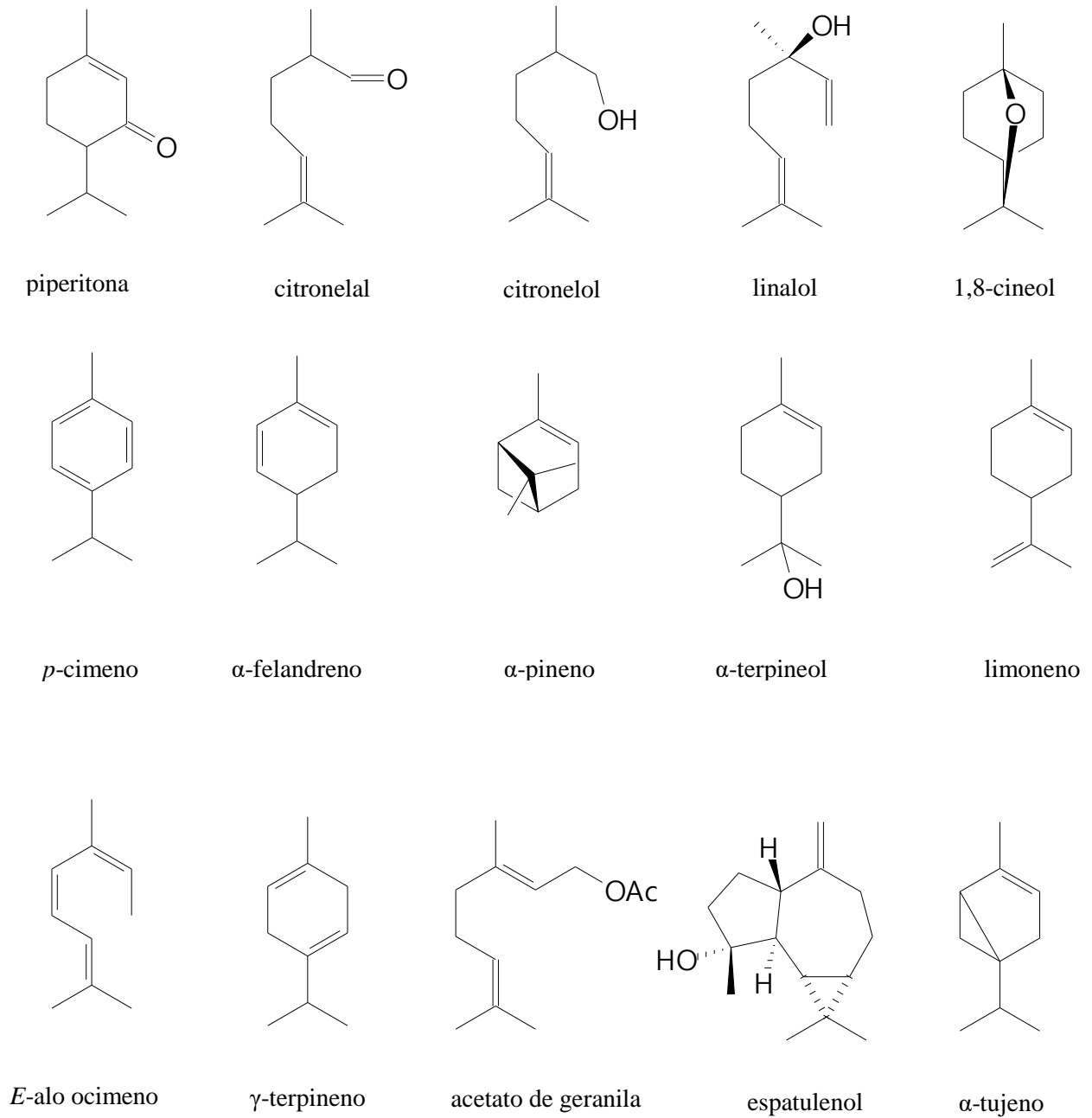
A extração e comercialização de óleo essencial de espécies de *Eucalyptus* spp., rico em monoterpenos e, em alguns casos em sesquiterpenos, têm colocado o Brasil em uma posição de destaque quanto ao volume e a quantidade de substâncias que possuem atividades biológicas presentes nesses óleos essenciais (STEFFEN; ANTONIOLLI; STEFFEN, 2010).

Os óleos essenciais de *Eucalyptus* spp. estão sendo muito empregados em outras culturas, proporcionando o seu desenvolvimento, atuando como indutores de resistências. Outro fator importante é seu emprego no combate às pragas e doenças que atacam algumas culturas de interesse comercial. Esse último ocorre, uma vez que a aplicação do óleo essencial resulta no estímulo das plantas em ativar o seu mecanismo de defesa, produzindo fitoalexinas e citotoxinas, além de exercerem efeito tóxico direto sobre os microorganismos e pragas (STEFFEN; ANTONIOLLI; AHMADIAN, STEFFEN 2010).

Os óleos essenciais de *Eucalyptus* spp., comumente utilizados como controladores microbiológicos, são ricos em 1,8-cineol (1,8-cineol), enquanto os mais usados na indústria de perfumaria são ricos em citral, citronelal e acetato de geraniol (BARBOSA; FILOMENO; TEIXEIRA 2016).

A composição química do óleo essencial de *Eucalyptus* spp. pode variar de acordo com a espécie. Na Figura 7, estão representados alguns constituintes químicos comumente encontrados nos óleos essenciais de *Eucalyptus* spp. (ESTANISLAU et al., 2001; SILVA; BRITO; SILVA, 2006).

Figura 7- Constituintes químicos comumente encontrados nos óleos essenciais de *Eucalyptus* spp.



2.4 Cafeeiro (*Coffea* sp.)

O cafeeiro (*Coffea* sp.) é um arbusto da família Rubiaceae do gênero *Coffea* L. que abrange cerca de 103 espécies (Figura 8). A semente contida dentro do seu fruto é utilizada para a obtenção de uma das bebidas mais consumidas em todo o mundo.

Figura 8- Aspecto geral de um cafeeiro



Fonte: <http://mateuscoffee.blogspot.com.br/2016/03/coffee-robusta.html>

A cafeicultura é uma das principais atividades econômicas brasileira, gerando empregos diretos e indiretos. O Brasil é o maior produtor e exportador de café no mundo. Dados de dezembro de 2016 mostram que os produtos à base de café representaram 9,8% das exportações brasileiras, movimentando cerca de US\$ 600,74 milhões. Para 2017 a expectativa de produção foi cerca de 45,56 milhões de sacas de 60 quilos de café beneficiado, mostrando uma redução de 11,3%, quando comparado com a produção de 51,37 milhões de sacas obtidas no ciclo anterior (BRASIL, 2017; CONAB, 2017).

No Brasil, 15 estados brasileiros são responsáveis pela maior produção de café, Bahia, Ceará, Espírito Santo, Goiás, Distrito Federal, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará, Paraná, Pernambuco, Rio de Janeiro, Rondônia e São Paulo, em uma área total de 2,22 milhões de hectares. Essas regiões possuem climas, relevos, altitudes e longitudes diferentes que contribuem para que o Brasil possa produzir diversas espécies e qualidade de café (BRASIL, 2017).

Dois espécies são as mais cultivadas, a *Coffea arabica* L. que proporciona um produto mais fino e de melhor qualidade, e a *Coffea canephora* P. que é muito utilizada para produzir cafés solúveis e apresentam sabor único, com menor acidez e um maior teor de cafeína (BRASIL, 2017).

Os grãos de café produzidos no Brasil são exportados para diversos países fazendo com que o controle de qualidade para produção dos grãos seja cada vez mais rigoroso. A demanda por café está crescendo a cada dia, fazendo com que os produtores aumentem a área de plantio, porém, além da quantidade têm-se que melhorar também a qualidade do café (PASIN; ALMEIDA; ABREU 2009).

Um café de qualidade é determinado comercialmente pela característica física dos grãos e organolépticas da bebida. Fatores, como clima, disponibilidade hídrica, ataque de microrganismo dentre outros, podem influenciar diretamente na quantidade e qualidade do café.

Buscando cada vez mais combater as adversidades que comprometem o cultivo do café, o Brasil é considerado como o maior pesquisador no melhoramento genético, biotecnologia e manejo de pragas na cultura cafeeira, desenvolvidos pelo Consórcio Pesquisa Café, uma rede com 50 instituições que realizam pesquisas para se obter um café de melhor qualidade (BRASIL, 2017).

Patógenos causadores de doenças conhecidas como a mancha-de-olho-pardo causada pelo fungo *Cercospora coffeicola*, a ferrugem do café causada por *Hemileia vastatrix* B. e a antracnose causada por *Colletrotrichum* spp. também influenciam diretamente no baixo rendimento da produção dos grãos de café (RODRÍGUEZ et al., 2016).

Microorganismos que incidem sobre os grãos de café comprometem o seu aspecto visual, aroma e gosto, sendo os fungos filamentosos os que causam maior dano aos grãos. Os fungos filamentosos mais frequentes que se encontram associados aos grãos de café são do gênero *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*, produtores de micotoxinas, que são substâncias nocivas aos seres humanos (BATISTA et al., 2003).

2.5 Ferrugem do cafeeiro (*Hemileia vastatrix* B.)

A ferrugem do cafeeiro é uma doença causada pelo fungo *Hemileia vastatrix*, um fungo basidiomiceto, da família dos Pucciniaceae, identificado por Berkeley no Sri Lanka em 1869 (Figura 9). Essa doença causa uma desfolha no cafeeiro, comprometendo a próxima produção. Foi detectada pela primeira vez no Brasil em 1970 no sul da Bahia; passados cinco meses, a doença foi diagnosticada em todas as regiões do país, sendo considerada atualmente a principal doença prejudicial à plantação e à produção dos cafeeiros em todo o mundo (ZAMBOLIM, 2016).

Figura 9- Aspecto geral da ferrugem do cafeeiro causada pelo fungo *Hemelia vastatrix* (ferrugem do cafeeiro)



Fonte: Do autor

A época de desenvolvimento da ferrugem do cafeeiro inicia-se de dezembro a janeiro, tendo um crescimento exponencial nos meses de março a maio e picos em junho e julho. Após a colheita, ocorre uma diminuição da doença devido à desfolhação e às baixas temperaturas (ZAMBOLIM, 2016).

Já foram identificadas até o momento cerca de 50 raças de *Hemileia vastatrix* em todo o mundo, sendo no Brasil encontradas 15 raças. Os mecanismos que levam ao surgimento de novas raças não estão completamente elucidados, sendo a hipótese mais aceitável a mutação; outra hipótese é o cruzamento entre duas espécies de cafeeiro ao longo dos anos, levando a uma variedade de patógeno (VÁRZEA; MARQUES, 2005; ZAMBOLIM, 2016).

A ferrugem nas folhas do cafeeiro é fácil de ser identificada, sendo que aparecem na parte abaxial das folhas e se expandem até 20 mm de diâmetro. Durante esse processo de expansão, são formadas as uredinas nas manchas cloróticas, nas quais são produzidos urediniosporos de cor amarela-alaranjada em pó. Essa produção de uredinas ocorre principalmente no dossel onde há um maior teor de umidade e a temperatura está entre 21 – 25 °C, sendo o local apropriado para produção dos urediniosporos. Os urediniosporos formados nas plantas doentes podem se espalhar por toda a plantação, chegando a alcançar plantações de café localizadas a quilômetros da fonte (ZAMBOLIM, 2016).

Em regiões onde a temperatura está abaixo de 16 °C ou superiores a 30 °C, a doença pode ser encontrada, mas não interfere na produção. Essa doença também está relacionada com a altitude; em plantações que estão a 1200 m acima do nível do mar, não requerem a utilização de fungicidas, pois a incidência de ferrugem atinge no máximo 20% da cultura. Nessa altitude

os níveis de precipitação anual não excedem de 1300 a 1500 mm, comprometendo o desenvolvimento do fungo (ZAMBOLIM, 2016).

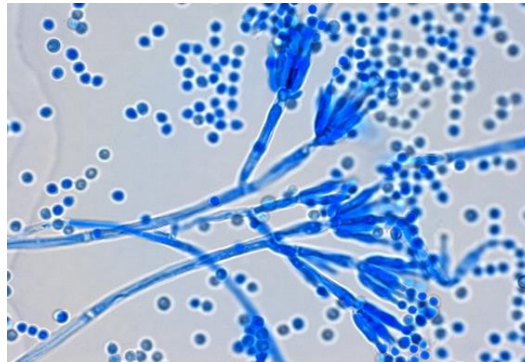
Em regiões produtoras de café conilon susceptível à doença e onde o clima é mais quente e úmido, os danos causados à lavoura pela ferrugem podem diminuir a produção em cerca de 30 a 50%, dependendo da resistência do genótipo (CAPUCHO et al., 2013).

2.7 *Penicillium citrinum*

Além dos microorganismos causadores de doenças aos cafeeiros ou patogênicos, como a ferrugem causada pelo fungo *Hemileia vastatrix*, outros microorganismos classificados como deterioradores incidem sobre os frutos, afetando negativamente a qualidade do produto final.

O gênero *Penicillium citrinum* (Figura 10) representa anamorfos (fase assexuada ou mitódica) de ascomicetos classificados na família dos Trichocomaceae, ordem Eurotiales, abrangendo 150 a 200 espécies. Essa espécie é muito encontrada em solo, matérias orgânicas em decomposição, grãos estocados, alimentos, rações, dentre outros materiais (DOMSCH et al., 1980).

Figura 10- Aspecto geral do *Penicillium citrinum*.



Fonte: <http://thunderhouse4-yuri.blogspot.com.br/2015/08/penicillium-citrinum.html>

As espécies de *Penicillium citrinum* são mais frequentes em regiões nas quais a temperatura é baixa, sendo essas psicrotólicas, capazes de deteriorar alimentos em temperaturas de refrigeração e também caracterizados por serem xerófitas, ou seja, suportam ambientes como de clima árido (PITT; HOCKING, 1997).

O ataque de fungos do gênero *Penicillium* spp. em alimentos é uma das agravantes na perda de alimentos armazenados e alimentos que precisam ser transportados por um longo período de tempo, até chegar ao consumidor final. Além de causar danos ao sabor e ao aspecto

visual dos alimentos, esses fungos são produtores de micotoxinas, substâncias altamente tóxicas, que possuem como características grande estabilidade térmica. O uso de fungicidas é o principal meio para eliminação desse microrganismo em alimentos; porém, há uma crescente preocupação da aplicação desses fungicidas, uma vez que eles são aplicados após a colheita, não respeitando o tempo de carência até o alimento ser consumido e o desenvolvimento de resistência aos controladores químicos (VITORATOS et al., 2013).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Escolha das plantas para extração dos óleos essenciais

As plantas escolhidas para o desenvolvimento deste trabalho *Eucalyptus torrelliana*, *Eucalyptus citriodora*, *Eucalyptus camaldulensis*, *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus microcorys* foram escolhidas por meio de estudos presentes na literatura e principalmente em trabalhos realizados pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Química Orgânica - Óleos Essenciais da Universidade Federal de Lavras (UFLA). A folha foi a parte da planta escolhida para ser utilizada na extração dos óleos essenciais.

3.2 Coleta do material vegetal

As folhas de cinco espécies de *Eucalyptus* spp. foram coletadas em dias quentes, na parte da manhã, no Viveiro do Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Lavras/MG (DEF/UFLA) e encaminhadas ao Laboratório de Química Orgânica- Óleos essenciais (DQI-UFLA), onde foram limpas, picadas e pesadas. A planilha com os determinados números de registro e coordenadas geográficas dos eucaliptos utilizados pode ser encontrada no DEF/UFLA e estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1- Número de registro e coordenadas geográficas das espécies de *Eucalyptus* utilizadas.

| | <i>E. torrelliana</i> | <i>E. citriodora</i> | <i>E. camaldulensis</i> | <i>E. grandis</i> | <i>E. microcorys</i> |
|-------------------------|-----------------------|----------------------|-------------------------|-------------------|----------------------|
| Numero de registro | (4) | (10150) | (10533/10266) | (48) | (8717) |
| Coordenadas geograficas | 16°49' | 23°25' | 17°14' | 17°12' | 28°30' |
| | 145°38' | 150°20' | 145°59' | 145°35' | 153°19' |

Fonte: Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Lavras/MG

3.3 Extração dos óleos essenciais

Os óleos essenciais foram extraídos no Laboratório de Química Orgânica – Óleos Essenciais da Universidade Federal de Lavras. O método de extração empregado foi o de hidrodestilação, utilizando-se o aparelho de Clevenger modificado (BRASIL, 2010). Foram pesados 300 g do material vegetal fresco (folhas) e submetidos ao processo de hidrodestilação por 2 horas. Após a extração, o óleo essencial foi separado do hidrolato por centrifugação, utilizando uma centrífuga de bancada de cruzeta horizontal (Fanem Baby®I Modelo 206 BL) a 965 g por 5 minutos. Em seguida, o óleo essencial foi pipetado com o auxílio de uma pipeta de Pasteur e, posteriormente, armazenado em recipiente âmbar sob refrigeração.

Paralelo à extração dos óleos essenciais, foram realizados testes para determinação do teor de umidade do material vegetal de acordo com a metodologia proposta por Pimentel et al. (2008), para posterior cálculo do rendimento dos óleos essenciais.

Para determinação do rendimento dos óleos essenciais, foram adicionados 5g do material e 80 mL de ciclo hexano em um balão volumétrico de 250 mL acoplado a um condensador com coletor volumétrico graduado (Dean Stark). O sistema foi submetido à aquecimento por 2 horas, medindo-se o volume de água ao final desse tempo. O teor de umidade foi calculado de acordo com a equação abaixo, em que R representa o rendimento do óleo essencial (base livre de umidade)

$$\%R = \frac{100 \times \text{peso do óleo}}{\frac{\text{peso da amostra} - (\text{peso da amostra} \times \text{umidade})}{5}}$$

Equação 1

3.4 Caracterização química dos óleos essenciais

A caracterização química dos óleos essenciais foi realizada na Central de Análises e Prospecção Química (CAPQ) da UFLA, utilizando um cromatógrafo gasoso acoplado a um detector de espectrometria de massas (CG/EM) e um cromatógrafo gasoso acoplado a um detector de ionização em chama (CG/DIC). Os constituintes dos óleos essenciais foram identificados, utilizando-se um aparelho *Shimadzu* GC-17 A, com detector seletivo de massas modelo QP 5050 A, sob as seguintes condições experimentais; coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm) com fase ligada DBS (0,25 µm de espessura de filme); gás de arraste foi o

Hélio a um fluxo de 1,18 mL min⁻¹ a 210 °C; a temperatura iniciou-se em 60 °C, seguida de um aumento de 3 °C até 240 °C; posteriormente, a 10 °C até chegar em 300 °C, na qual permaneceu constante por 7 min; a temperatura do injetor foi de 220 °C e a do detector (ou interface) de 240 °C; foram injetados 0,1 µL de amostra, diluída em hexano a uma taxa de partição de 1:100; a energia de impacto foi de 70 eV; foi injetada também uma mistura de hidrocarbonetos (C₉H₂₀; C₁₀H₂₂; ...; C₂₄H₅₀; C₂₅H₅₂; C₂₆H₅₄).

A quantificação dos constituintes foi realizada utilizando-se um cromatógrafo gasoso (Shimadzu CG – 17A) equipado com um detector de ionização de chamas (FID). Os parâmetros experimentais de análise foram os mesmos utilizados na identificação dos constituintes químicos por CG/EM, com temperatura do detector de 300 °C.

Os constituintes foram identificados, comparando os índices de retenção calculados, pela equação de Van Den Dool e Kratz (1963) em relação à série homóloga de alcanos (nC₈-nC₁₈) e com extrapolação para C₁₉ e C₂₀, com os índices de retenção da literatura de acordo com Adams (2007) e duas bibliotecas disponíveis no equipamento a NIST107 e NIST2, sendo possível comparar os espectros obtidos das amostras com os já existentes na literatura.

3.5 Determinação da atividade antifúngica *in vitro* dos óleos essenciais sobre *Hemileia vastatrix*

Este teste foi realizado em triplicata, avaliando-se a porcentagem de germinação dos tratamentos com os óleos essenciais em relação ao tratamento com o controle positivo utilizando-se água. O teste empregado foi o de microdiluição. Inóculos coletados no campo foram diluídos em água até atingirem uma concentração de 10⁶ esporos por mL⁻¹, contados em câmara de *Neubauer*. Volumes de 300 µL do inóculo foram transferidos para placas de Petri de 6 cm de diâmetro, contendo uma mistura de 5 mL de meio de cultura ágar/água (2%). Nas placas de Petri, foram adicionados volumes de 0,25; 0,50; 1,25; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; e 15,0 µL dos óleos essenciais, de modo a obter as concentrações finais de 50, 100, 250, 500, 1000, 1500, 2000 e 3000 µL L⁻¹ para cada tratamento. O controle negativo foi realizado utilizando 5 mL de meio de cultura ágar/água (2%) e 300 µL de inóculo. O controle positivo foi realizado utilizando 15,0 µL do fungicida controle (Opera), dose recomendada para 5 mL de meio. As placas foram incubadas em BOD a 25 °C, por um período de 24 horas. Para contagem dos esporos, foi padronizada a parte superior direita da placa de Petri, para realização das leituras em microscópio (PEREIRA et al., 2012 a).

3.6 Determinação da atividade antifúngica *in vitro* dos óleos essenciais sobre *Penicillium citrinum*

A determinação da atividade antifúngica *in vitro* dos óleos essenciais sobre *Penicillium citrinum* foi realizada avaliando o crescimento micelial (CM). Volumes de 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 10,0; 15,0; 20,0; e 30,0 μLL^{-1} dos óleos essenciais foram adicionados às placas de Petri de 15 cm contendo 10 mL de meio de cultura Malt Extract Ágar (MEA) à (2%), de modo a obter as concentrações finais de 50, 100, 250, 500, 1000, 1500, 2000 e 3000 μLL^{-1} dos óleos essenciais para cada tratamento. Em seguida, o fungo foi repicado nessas placas e mantidos em BOD a 24 °C. Como controle negativo, o fungo foi repicado em uma placa contendo apenas o meio de cultura Malt Extract Ágar (MEA) à (2%). A avaliação foi realizada em triplicata, avaliando o crescimento micelial dos tratamentos com óleo essencial em relação ao controle negativo, após 7 dias de incubação (VITORATOS et al., 2013).

O micorganismo utilizado neste experimento pode ser encontrado na micoteca do Laboratório de Microbiologia da Epamig/UFLA, o qual possui como chave de identificação o código PYC 27.

3.7 Determinação da atividade antifúngica *in vivo* dos óleos essenciais sobre *Hemileia vastatrix*

Para a realização dos testes *in vivo* dos óleos essenciais sobre o fungo *Hemileia vastatrix*, foram utilizadas mudas de cafeeiro da variedade Mundo Novo que estavam mantidas em uma casa de vegetação, a uma temperatura controlada de 30 °C e umidade relativa do ar de 47%. A determinação da atividade antifúngica *in vivo* dos óleos essenciais sobre *Hemileia vastatrix* foi realizada mediante a avaliação do efeito curativo e do efeito preventivo.

As avaliações dos efeitos curativo e preventivo foram realizadas utilizando uma escala de 1 a 4, em que 1 corresponde às folhas sem esporos; 2 às folhas com pouca pústula esporulada; 3 às folhas com mais de 50% das pústulas esporuladas e 4 às folhas com 100% das pústulas esporuladas (TAMAYOU, 1988).

Não foi realizada a atividade antifúngica *in vivo* com o óleo essencial de *E. torrelliana* sobre o fungo *Hemileia vastatrix*, devido a esse óleo essencial apresentar uma baixa atividade antifúngica em relação aos outros óleos essenciais testados e em razão do seu rendimento ser baixo, não sendo viável industrialmente.

3.7.1 Determinação do efeito curativo dos óleos essenciais sobre *Hemileia vastatrix*

O efeito curativo dos óleos essenciais foi determinado borrifando os óleos essenciais de *E. microcorys*, *E. citriodora*, *E. camaldulensis* e *E. grandis*, nas concentrações de 250, 250, 500 e 1500 μLL^{-1} , respectivamente, na parte abaxial das folhas do cafeeiro da variedade Mundo Novo contaminadas com *Hemileia vastatrix*. As concentrações dos óleos essenciais utilizadas foram determinadas com base na CMI encontradas nos testes *in vitro*. O controle negativo foi realizado, utilizando-se água e o controle positivo realizado utilizando-se o fungicida controle (Opera). Um ensaio feito com uma solução de leite em pó na concentração de 10 gL^{-1} também foi realizado, de modo a avaliar se esse produto utilizado na diluição dos óleos essenciais exerce atividade antifúngica sobre *Hemileia vastatrix*.

Após 20 dias, foram avaliadas as lesões, comparando 5 folhas colhidas ao acaso de cada tratamento com 5 folhas colhidas ao acaso do controle negativo (PEREIRA et al., 2012 b; TAMAYOU, 1988).

3.7.2 Determinação do efeito preventivo dos óleos essenciais sobre *Hemileia vastatrix*

O efeito preventivo dos óleos essenciais foi determinado borrifando os óleos essenciais de *E. microcorys*, *E. citriodora*, *E. camaldulensis* e *E. grandis*, nas concentrações de 250, 250, 500 e 1500 μLL^{-1} respectivamente, na parte abaxial das folhas sadias de mudas de cafeeiro da espécie Mundo Novo. As concentrações dos óleos essenciais utilizadas foram determinadas com base na CMI encontradas nos testes *in vitro*. O controle negativo foi realizado com água e o controle positivo foi realizado utilizando o fungicida controle (Opera). Um ensaio feito com uma solução de leite em pó na concentração de 10 gL^{-1} também foi realizado, de modo a avaliar se esse produto utilizado na diluição dos óleos essenciais exerce atividade antifúngica sobre *Hemileia vastatrix*.

Após 2 dias, borrifou-se uma solução de esporos de *Hemileia vastatrix* na concentração de 10^6 esporos/mL na parte abaxial das folhas do cafeeiro. Após 20 dias da inoculação de *Hemileia vastatrix*, foram avaliadas as lesões comparando 5 folhas colhidas ao acaso de cada tratamento, com 5 folhas colhidas ao acaso da testemunha (PEREIRA et al., 2012 b; TAMAYOU, 1988).

3.8 Análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC) com 3 repetições para a atividade *in vitro* dos óleos essenciais. O programa estatístico utilizado foi o SISVAR (FERREIRA, 2011). Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade para cada óleo essencial, considerando 8 concentrações (50, 100, 250, 500, 1000, 1500, 2000 e 3000 μLL^{-1}).

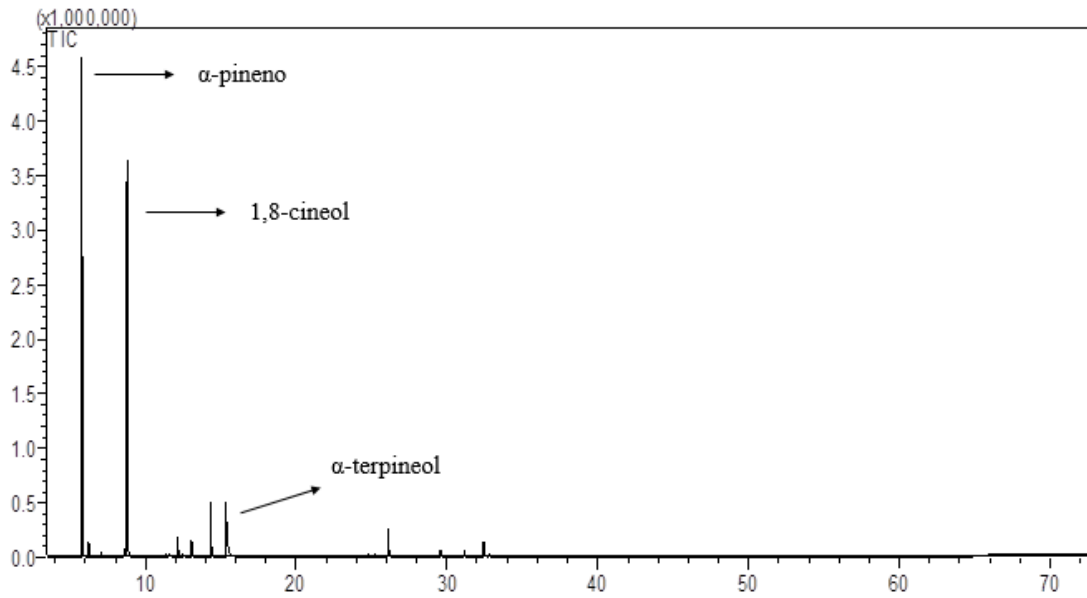
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Composição química e rendimento dos óleos essenciais de cinco espécies de *Eucalyptus*.

O rendimento dos óleos essenciais de *E. grandis*, *E. torrelliana*, *E. camaldulensis*, *E. microcorys* e *E. citriodora* foram de 4,9; 0,45; 3,55; 2,8 e 3,96%, respectivamente, rendimento esse alto tratando-se de óleos essenciais.

Os cromatogramas e os constituintes dos óleos essenciais das cinco espécies de *Eucalyptus* estão representados nas Figuras 11 – 15 e nas Tabelas 2 - 6.

A composição química dos óleos essenciais das cinco espécies de *Eucalyptus* foi diferente para todas as amostras; porém, os constituintes químicos (1,8-cineol, α -pineno e α -terpineol) foram comuns na maioria dos óleos essenciais.

Figura 11- Cromatograma do óleo essencial extraído das folhas de *Eucalyptus grandis*.

Fonte: do autor

Tabela 2- Composição química do óleo essencial extraído das folhas de *Eucalyptus grandis*

| | Compostos | IRcal | Área (%) |
|--|--------------------------------------|-------------|--------------|
| 1 | α-Pineno | 934 | 36.35 |
| 2 | Canfeno | 951 | 1.14 |
| 3 | β -Pineno | 980 | 0.18 |
| 4 | p-Cimeno | 1028 | 0.41 |
| 5 | 1,8-cineol | 1033 | 37.43 |
| 6 | α -Fenchol | 1122 | 1.92 |
| 7 | NI | 1130 | 0.35 |
| 8 | <i>trans</i> -Pinocarveol | 1144 | 1.93 |
| 9 | Isoborneol | 1175 | 5.38 |
| 10 | α-Terpineol | 1199 | 8.71 |
| 11 | NI | 1421 | 0.21 |
| 12 | NI | 1432 | 0.28 |
| 13 | NI | 1453 | 3.28 |
| 14 | Espatulenol | 1581 | 0.69 |
| 15 | NI | 1615 | 1.74 |
| Total dos constituintes químicos identificados | | | 94,24% |

*NI: composto não identificado; IRcal: Índice de Retenção Calculado.

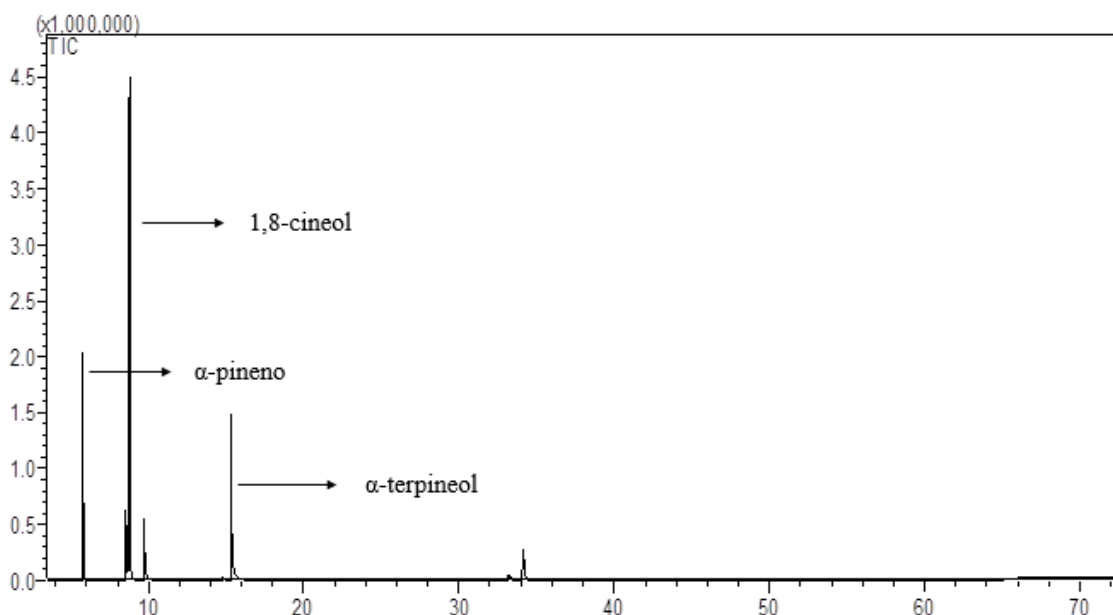
De acordo com os dados descritos na Tabela 2, é possível observar que o óleo essencial de *E. grandis* apresentou 15 constituintes químicos; porém, apenas 10 foram identificados. Os constituintes químicos majoritários foram α -pineno (36,35%), 1,8-cineol (37,43%), α -terpineol (8,71%) e isoborneol (5,38%).

Estanislau et al (2001) avaliando a caracterização química do óleo essencial de *E. grandis*, identificaram 19 constituintes químicos, sendo majoritários o β -pineno (11,54%), o-cimeno (16,66%), γ -terpineno (16,84%) e α -terpineol (8,71%), dados diferentes deste trabalho, em relação à quantidade de cada constituinte químico e ao 1,8-cineol, que não foi encontrado por esses autores.

Barbosa et al (2016) mostraram uma variação na concentração dos constituintes químicos majoritários e minoritários extraídos do óleo essencial de *E. grandis*. Para os autores, os constituintes químicos α -pineno, 1,8-cineol, p-cimeno e γ -terpineno são comumente encontrados nesse óleo essencial.

No óleo essencial de *E. camaldulensis* (Figura 12), foram identificados 7 constituintes químicos, sendo os majoritários o 1,8-cineol (41,61%), α -terpineol (19,87) e α -pineno (15,81%) (Tabela 3).

Figura 12- Cromatograma do óleo essencial extraído das folhas de *Eucalyptus camaldulensis*.



Fonte: do autor

Tabela 3- Composição química do óleo essencial extraído das folhas de *Eucalyptus camaldulensis*

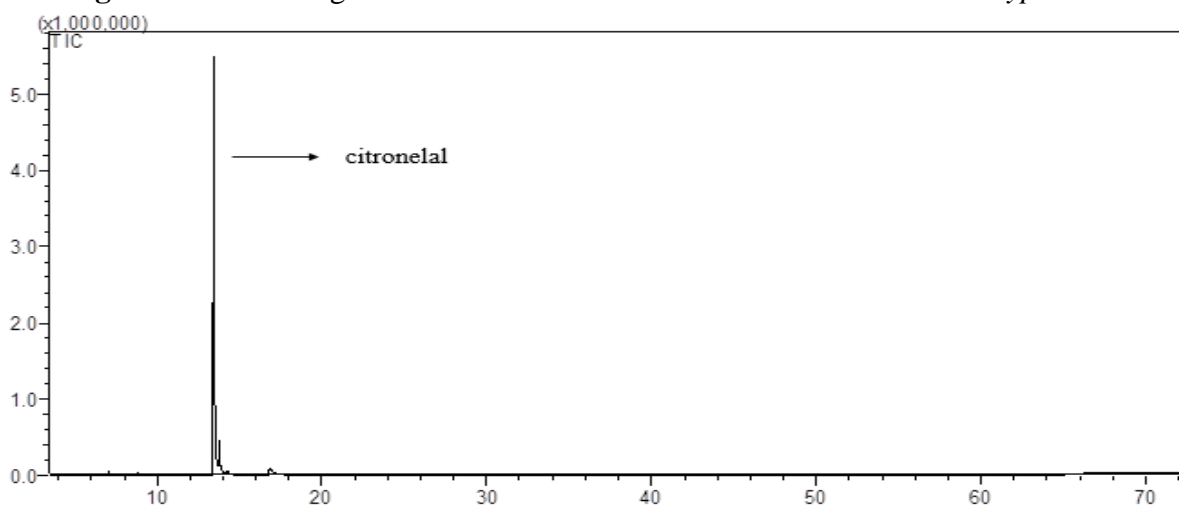
| | Compostos | IRcal | Área (%) |
|--|--------------------------------------|-------------|--------------|
| 1 | α-Pineno | 931 | 15,81 |
| 2 | <i>o</i> -Cimeno | 1025 | 6,84 |
| 3 | Limoneno | 1030 | 1,70 |
| 4 | 1,8-cineol | 1032 | 41,61 |
| 5 | γ -Terpineno | 1058 | 6,71 |
| 6 | α-Terpineol | 1297 | 19,87 |
| 7 | α -Eudesmol | 1656 | 7,46 |
| Total dos constituintes químicos identificados | | | 100% |

*IRcal: Índice de Retenção Calculado.

DOGAN et al (2017), analisando a composição química do óleo essencial de *E. camaldulensis*, encontraram como constituintes químicos majoritários *p*-cimeno (42.1%), 1,8-cineol (14.1%), α -pineno (12.7%) e α -terpinol (10.7%), dados coerentes com aqueles encontrados neste trabalho; porém, em concentrações diferentes.

Estudos já realizados sobre a extração do óleo essencial de *E. camaldulensis* no Brasil comprovaram uma variação nos constituintes químicos majoritários e em suas concentrações; porém, o 1,8-cineol está sempre presente nesse óleo essencial e em maiores concentrações que os outros constituintes (BARBOSA; FILOMENO; TEIXEIRA 2016).

Os dados obtidos para a caracterização e quantificação do óleo essencial de *E. citriodora* estão apresentados na Figura 13 e descritos na Tabela 4.

Figura 13- Cromatograma do óleo essencial extraído das folhas de *Eucalyptus citriodora*

Fonte: do autor

Tabela 4- Composição química do óleo essencial extraído das folhas de *Eucalyptus citriodora*

| | Compostos | IRcal | Área (%) |
|--|-----------------------|-------------|--------------|
| 1 | Isopulegol | 1151 | 2,12 |
| 2 | Citronelal | 1154 | 88,83 |
| 3 | Iso isopulegol | 1161 | 4,73 |
| 4 | NI | 1174 | 0,93 |
| 5 | Citronelol | 1234 | 3,39 |
| Total dos constituintes químicos identificados | | | 99,07% |

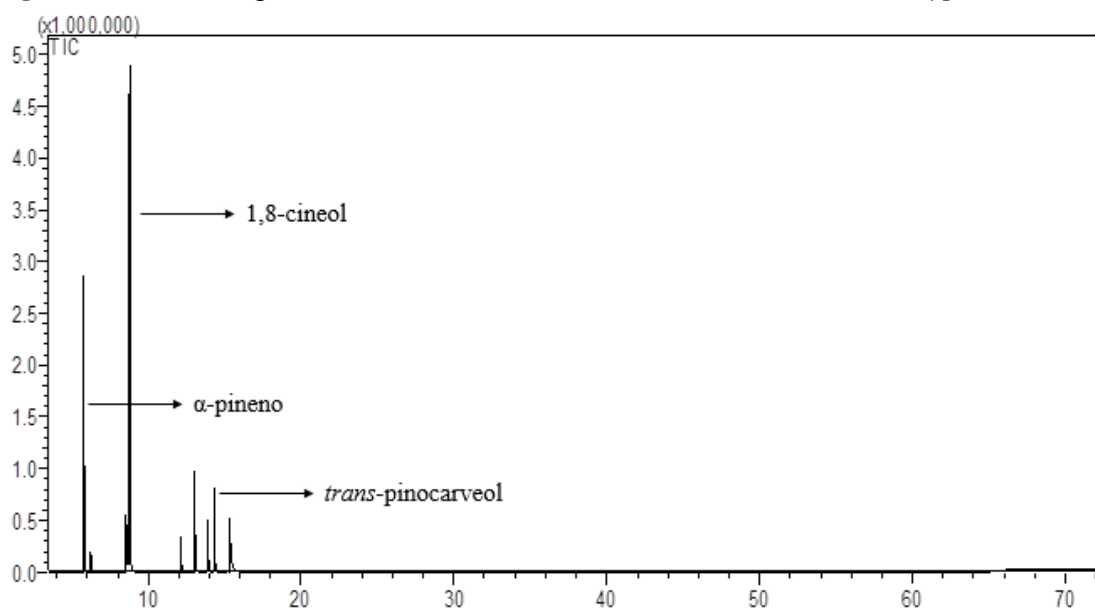
*NI: composto não identificado; IRcal: Índice de Retenção Calculado.

De acordo com os dados descritos na Tabela 6, é possível observar que o óleo essencial de *E. citriodora* apresentou 5 constituintes químicos, sendo o citronelal (88,83%) o majoritário.

O alto teor de citronelal no óleo essencial de *E. citriodora* também foi encontrado por Estanislau et al., (2001), que encontraram 82,33% desse constituinte químico no óleo essencial em estudo, dados que corroboram com os encontrados neste trabalho.

Barbosa et al., (2016) relatam que o citronelal foi o principal constituinte químico encontrado e em altas concentrações em 9 óleos essenciais de *E. citriodora* extraídos de diferentes locais no Brasil. Outros constituintes químicos em menores concentrações, como citronelol, acetato de citronelila e iso pulegol também foram encontrados.

A Figura 14 e a Tabela 5 mostram respectivamente a composição química do óleo essencial de *E. microcorys*.

Figura 14- Cromatograma do óleo essencial extraído das folhas de *Eucalyptus microcorys*

Fonte: do autor

Tabela 5- Composição química do óleo essencial extraído das folhas de *Eucalyptus microcorys*

| | Compostos | IRcal | Área (%) |
|--|-----------------------------------|-------------|--------------|
| 1 | α-Pineno | 934 | 19.45 |
| 2 | β -E-Ocimeno | 949 | 0.10 |
| 3 | Canfeno | 951 | 1.02 |
| 4 | <i>p</i> -Cimeno | 1027 | 5.32 |
| 5 | Limoneno | 1031 | 0.58 |
| 6 | 1,8-cineol | 1033 | 39.08 |
| 7 | Acetato de fenchila | 1122 | 3.16 |
| 8 | <i>trans</i>-Pinocarveol | 1144 | 9.86 |
| 9 | Pinocarvona | 1164 | 5.05 |
| 10 | Isoborneol | 1175 | 7.70 |
| 11 | α -Terpineol | 1199 | 8.68 |
| Total dos constituintes químicos identificados | | | 100% |

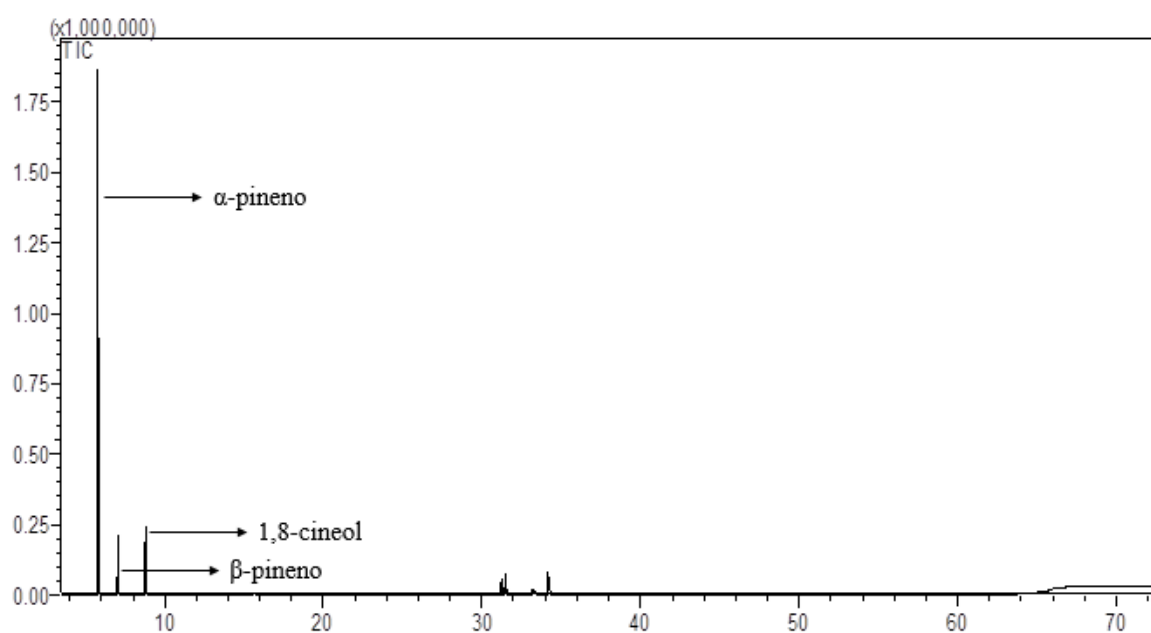
*IRcal: Índice de Retenção Calculado.

No óleo essencial de *E. microcorys*, foram identificados 11 constituintes, sendo os majoritários o 1,8-cineol (39,08%), α -pinene (19,45%) e α -terpineol (9,86%).

Estanislau et al (2001) identificaram 7 constituintes químicos no óleo essencial de *E. microcorys*, sendo o 1,8-cineol (86,72%), α -terpineol (3,90%) e *p*-cimeno (2,82%) os constituintes majoritários, dados esses que corroboram com os deste trabalho.

Os dados obtidos para a caracterização e quantificação do óleo essencial de *E. torreliana* estão apresentados na Figura 15 e descritos na Tabela 6. Foram identificados no óleo essencial de *E. torreliana* 8 constituintes químicos, sendo o α -pineno (67,77%), 1,8-cineol (10,32%) e β -pineno (8,15%) os majoritários. Entre as espécies de *Eucalyptus* estudadas neste trabalho, esse foi o único que apresentou o composto viridiflorol com (4,26%).

Figura 15- Cromatograma do óleo essencial extraído das folhas de *Eucalyptus torreliana*



Fonte: do autor

Tabela 6- Composição química do óleo essencial extraído das folhas de *Eucalyptus torreliana*

| | Compostos | IRcal | Área (%) |
|--|----------------------|-------|----------|
| 1 | α -Pineno | 934 | 67.77 |
| 2 | β -Pineno | 980 | 8.15 |
| 3 | 1,8-cineol | 1033 | 10.32 |
| 4 | Espatulenol | 1581 | 1.45 |
| 5 | Oxido de cariofileno | 1585 | 2.93 |
| 6 | Viridiflorol | 1590 | 4.26 |
| 7 | β -Eudesmol | 1659 | 5.12 |
| Total dos constituintes químicos identificados | | | 100% |

*IRcal: Índice de Retenção Calculado.

Silou et al., (2010) estudaram a variação dos constituintes químicos do óleo essencial de *E. torrelliana* de acordo com o clima (chuvoso e árido) e os constituintes químicos majoritários identificados em ambos os climas foram (α -pineno, óxido de cariofileno, globulol, viridiflorol, guaiol, α -eudesmol, β -pineno, acetato de citronelila, espatulenol e aromadendreno), constituintes esses que corroboram com os encontrados neste trabalho.

Os constituintes químicos dos óleos essenciais e suas concentrações podem variar de acordo com diversos fatores, como a temperatura, radiação ultravioleta, altitude, disponibilidade hídrica, ataque de insetos e microorganismos, dentre outros. Apesar de cada espécie de planta ter se adaptado ao seu habitat, as plantas frequentemente são capazes de existirem em uma considerável faixa de temperatura. A formação dos constituintes dos óleos essenciais, em geral, parece aumentar em temperaturas mais elevadas, apesar de dias muito quentes levarem a uma perda excessiva desses metabólitos (GOOBO-NETO; LOPES, 2007).

A radiação ultravioleta e a altitude interferem diretamente na produção dos metabólitos secundários de um vegetal, sendo os aumentos na produção de compostos que possuem insaturações os mais evidenciados, pois esses protegem o vegetal contra a foto destruição ao absorverem e dissiparem a energia solar, dificultando, assim, a danificação dos tecidos mais internos pela radiação UV-B (GOOBO-NETO; LOPES, 2007).

Fatores mecânicos que as plantas estão susceptíveis, como ferimentos ou meros estímulos causados pela chuva, vento, pastagem de herbívoros e ataque de microrganismo, afetam diretamente a produção dos metabólitos secundários e também ativam a defesa induzida das plantas, que é uma resposta de defesa de curto ou longo prazo, produzindo e acumulando metabólitos secundários como os encontrados nos óleos essenciais (GOOBO-NETO; LOPES, 2007).

4.2 Atividade antifúngica *in vitro* dos óleos essenciais sobre *Hemileia vastatrix*

O resultado da atividade antifúngica *in vitro* dos óleos essenciais de cinco espécies de *Eucalyptus* sobre o fungo *Hemileia vastatrix* estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7- Atividade antifúngica *in vitro* dos óleos essenciais de cinco espécies *Eucalyptus* sobre *Hemileia vastatrix*.

| Concentração | Porcentagem de inibição da germinação dos esporos de <i>H. vastatrix</i> | | | | |
|------------------------------------|--|-------------------|----------------------|----------------------|-------------------------|
| Óleo essencial μLL^{-1} | <i>E. torreliana</i> | <i>E. grandis</i> | <i>E. citriodora</i> | <i>E. microcorys</i> | <i>E. camaldulensis</i> |
| CN | 2,60 eB | 12,36 eA | 8,75 cA | 10,01 cA | 3,96 cB |
| 25 | 27,91 dC | 57,70 dB | 76,05 bA | 79,19 bA | 77,27 bA |
| 50 | 38,18 cC | 89,91 cB | 95,09 aA | 97,65 aA | 97,23 aA |
| 100 | 92,81 bB | 92,85 bB | 98,80 aA | 98,84 aA | 97,99 aA |
| 250 | 98,89 aA | 95,04 bB | 100,0 aA | 100,0 aA | 98,10 aA |
| 500 | 100,0 aA | 95,22 bB | 100,0 aA | 100,0 aA | 100,0 aA |
| 1000 | 100,0 aA | 98,61 aA | 100,0 aA | 100,0 aA | 100,0 aA |
| 1500 | 100,0 aA | 100,0 aA | 100,0 aA | 100,0 aA | 100,0 aA |
| 2000 | 100,0 aA | 100,0 aA | 100,0 aA | 100,0 aA | 100,0 aA |
| 3000 | 100,0 aA | 100,0 aA | 100,0 aA | 100,0 aA | 100,0 aA |
| CP | 100,0 aA | 100,0 aA | 100,0 aA | 100,0 aA | 100,0 aA |

*As médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas e pela mesma letra maiúscula nas linhas não diferem entre si pelo Teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. CN (controle negativo) e CP (controle positivo, fungicida controle Opera).

Pelos dados apresentados na Tabela 7, observa-se que todos os óleos essenciais apresentaram atividade antifúngica sobre o fungo *Hemileia vastatrix*. Observou-se que, com o aumento na concentração dos óleos essenciais, aumentou a sua atividade antifúngica.

Todos os óleos essenciais apresentaram melhores atividades antifúngicas em concentrações bem menores do que o fungicida controle (Opera), que foi testado na concentração de 3000 μLL^{-1} .

Os óleos essenciais que apresentaram as maiores atividades antifúngicas nas menores concentrações foram os óleos essenciais de *E. camaldulensis*, *E. citriodora* e *E. microcorys*, inibindo a germinação de 100% dos esporos de *Hemileia vastatrix* na concentração de 50 μLL^{-1} , enquanto os óleos essenciais de *E. grandis* e *E. torreliana* apresentaram inibição de 100% nas concentrações de 1000 e 250 μLL^{-1} , respectivamente (Figura 16). Vale ressaltar que o óleo essencial de *E. citriodora*, que apresentou como constituinte químico majoritário o citronelal (88,83%), exerceu uma alta atividade antifúngica, demonstrando a possibilidade da sua aplicação para a finalidade testada, como também na indústria de cosméticos.

Figura 16- Foto de esporos de *Hemileia vastatrix* não germinados



Fonte: do autor

No tratamento com os óleos essenciais de *E. torreliana* e *E. grandis*, foi possível observar uma mudança no perfil físico dos esporos, passando da forma geométrica esférica e de coloração alaranjada (controle negativo), para uma forma murcha (retorcida) e sem coloração (Figura 17 a e b).

Figura 17 a e b – Comparação do aspecto físico dos esporos de *Hemileia vastatrix* antes (a) e após (b) o tratamento com óleo essencial de *E. torreliana*.



a



b

Fonte: do autor

Amaral e Bara (2005) e Rasooli; Rezaei; Allameh (2006) demonstraram que os compostos presentes nos óleos essenciais, em contato direto com os microrganismos, causaram alterações morfológicas nas hifas, vacuolização e desorganização do citoplasma, ruptura do plasma e nas membranas mitocondriais, dentre outras organelas.

Essa mudança no aspecto físico e visual pode ter ocorrido devido à interação dos componentes do óleo essencial de *E. torreliana* e *E. grandis* com a membrana dos fungos,

constituída por ergosterol, causando uma permeabilidade da membrana e vazamento de materiais celulares e íons.

Pereira et al., (2012 a), estudando a atividade antifúngica do óleo essencial de *E. citriodora*, encontraram resultados de desorganização celular e vacuolização em uredíniosporos de *Hemileia vastatrix*. Supõe-se que o mesmo pode ter ocorrido com os óleos essenciais utilizados neste trabalho, em especial os óleos essenciais de *E. torreliana* e *E. grandis*. Foi verificado que, após o tratamento com esse óleo essencial, os esporos apresentaram um aspecto incolor.

Pereira et al., (2012 b), pesquisando sobre a atividade antifúngica de diversos óleos essenciais sobre *Hemileia vastatrix*, observaram resultados positivos para o óleo essencial de citronela, que possui como constituintes químicos majoritários citronelal (55,23%) e citronelol (13,41%), sendo esses compostos presentes nos óleos essenciais de *Eucalyptus*, principalmente no óleo essencial de *E. citriodora* (TIMUNG et al., 2016).

Silva et al., 2014, estudando a atividade antifúngica do extrato aquoso de *E. citriodora*, observaram que o seu extrato a 20% inibiu a germinação dos esporos de *Hemileia vastatrix* em 55,25 %, resultado abaixo do encontrado neste trabalho. Uma das explicações da menor atividade antifúngica de um extrato, comparado a um óleo essencial, é que no óleo essencial a concentração dos componentes voláteis que possuem diversas atividades biológicas podem estar 50 a 200 vezes mais concentrados do que em um extrato vegetal (CAVALEIRO, 2007).

4.3 Atividade antifúngica *in vitro* dos óleos essenciais sobre *Penicillium citrinum*

Os resultados da atividade antifúngica *in vitro* dos óleos essenciais de cinco espécies de *Eucalyptus* sobre o fungo *Penicillium citrinum* estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8- Atividade antifúngica *in vitro* dos óleos essenciais de cinco espécies *Eucalyptus* sobre *Penicillium citrinum*.

| Concentração | Porcentagem de inibição do crescimento micelial | | | | | |
|--------------|---|----------------------|----------------------|----------------------|-------------------|-------------------------|
| | Óleo essencial μLL^{-1} | <i>E. citriodora</i> | <i>E. microcorys</i> | <i>E. torreliana</i> | <i>E. grandis</i> | <i>E. camaldulensis</i> |
| 50 | | 8,00% fC | 8,70% hC | 7,90% gC | 13,8% gB | 33,2% fA |
| 100 | | 7,26 % fD | 13,1% gC | 14,1% fC | 16,6% fB | 36,7% fA |
| 250 | | 10,0 % eC | 16,7% fC | 21,1% eB | 16,6% fC | 44,1% eA |
| 500 | | 9,30% eD | 29,0% eB | 27,2% dC | 26,6% eC | 44,1% eA |
| 1000 | | 19,40% dD | 33,4% dC | 38,6% cB | 34,9% dC | 61,7% dA |
| 1500 | | 30,11% cE | 38,5% cD | 50,9% bB | 43,3% cC | 72,5% cA |
| 2000 | | 56,32% bB | 55,8% bB | 51,8% bC | 55,7% bB | 78,2% bA |
| 3000 | | 76,54% aB | 68,2% aC | 61,5% aE | 64,8% aD | 83,0% aA |

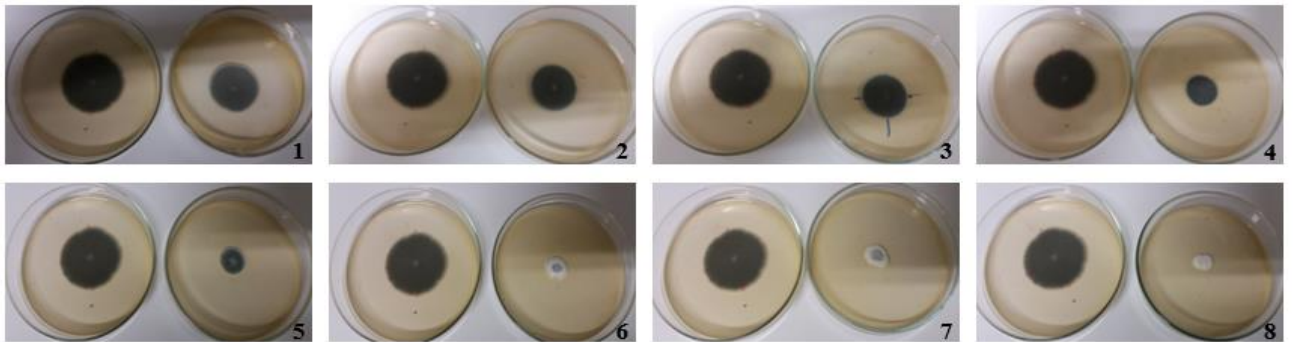
*As médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas, e pela mesma letra maiúscula nas linhas não diferem entre si pelo Teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

De acordo com os dados descritos na Tabela 8, é possível observar que todos os óleos essenciais em todas as concentrações apresentaram atividade antifúngica sobre *Penicillium citrinum*, à medida que aumentou a concentração dos óleos essenciais, houve um aumento na atividade antifúngica dos mesmos, diminuindo o crescimento micelial.

Além de diminuir o diâmetro do crescimento micelial, os tratamentos com óleos essenciais de *E. torreliana*, *E. grandis* e *E. camaldulensis* nas concentrações de 3000 μLL^{-1} , 3000 μLL^{-1} e 2000 μLL^{-1} respectivamente, inibiram a esporulação, havendo apenas um pequeno crescimento dos micélios. Esse fato é relevante, uma vez que com a redução do desenvolvimento micelial, aliada à redução da esporulação, representam uma interrupção nos ciclos de desenvolvimentos e reprodução do fungo e consequente redução dos danos causados por esse microorganismo.

O óleo essencial que se destacou entre os demais com a melhor atividade antifúngica em todas as concentrações utilizadas sobre *Penicillium citrinum* foi o óleo essencial de *Eucalyptus camaldulensis*, inibindo o crescimento micelial em 83% na concentração de 3000 μLL^{-1} (Figura 18). Nas concentrações de 50 e 100 μLL^{-1} , 250 e 500 μLL^{-1} , as atividades antifúngicas foram estatisticamente iguais, inibindo 36,7 e 44,0% respectivamente.

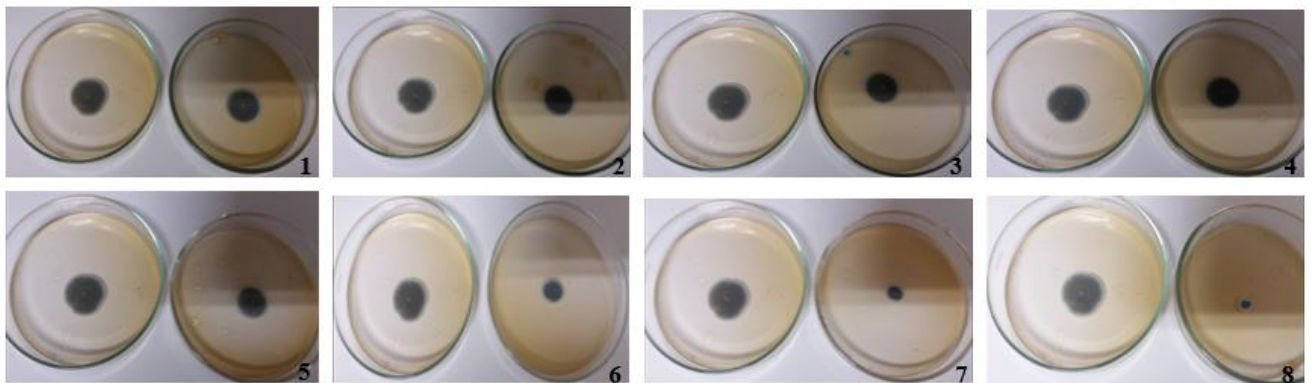
Figura 18- Atividade antifúngica do óleo essencial de *Eucalyptus camaldulensis* sobre *Penicillium citrinum*.



*Em todas as imagens, a placa de Petri da esquerda é referente ao controle negativo e a placa de Petri à direita é referente a cada tratamento. Os tratamentos com o óleo essencial de *E. camaldulensis* nas concentrações de 50, 100, 250, 500, 1000, 1500, 2000 e 3000 μLL^{-1} estão representados pelas figuras 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8, respectivamente

O óleo essencial de *E. citriodora* apresentou a segunda maior atividade antifúngica sobre *Penicillium citrinum*, inibindo 76,54% o crescimento micelial na concentração de 3000 μLL^{-1} (Figura 19). Nas concentrações de 50 e 100 μLL^{-1} , 250 e 500 μLL^{-1} , as atividades antifúngicas foram estatisticamente iguais, inibindo 8,0 e 10,0% respectivamente.

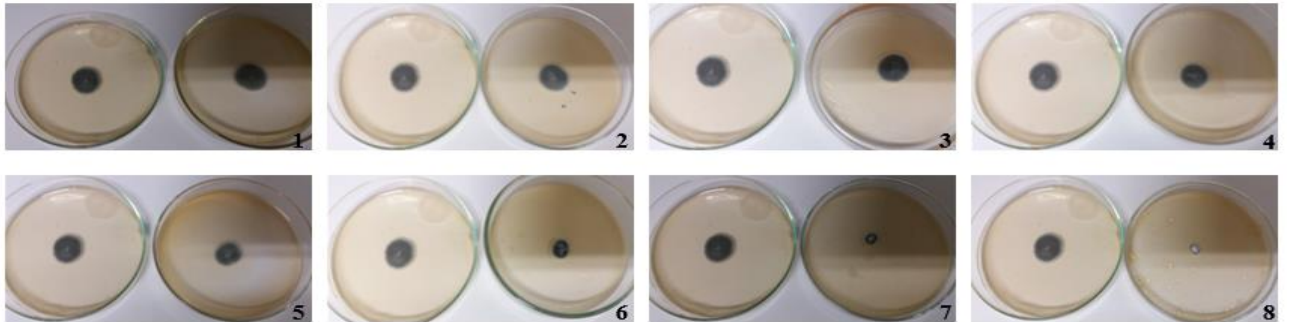
Figura 19- Atividade antifúngica do óleo essencial de *Eucalyptus citriodora* sobre *Penicillium citrinum*.



*Em todas as imagens, a placa de Petri da esquerda é referente ao controle negativo e a placa de Petri à direita é referente a cada tratamento. Os tratamentos com o óleo essencial de *E. citriodora* nas concentrações de 50, 100, 250, 500, 1000, 1500, 2000 e 3000 μLL^{-1} estão representados pelas figuras 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8, respectivamente.

O óleo essencial de *E. microcorys* apresentou uma inibição máxima de 68,2% no crescimento micelial na concentração de 3000 μLL^{-1} . Todos os tratamentos com as diferentes concentrações utilizadas diferiram-se estatisticamente (Figura 20).

Figura 20- Atividade antifúngica do óleo essencial de *Eucalyptus microcorys* sobre *Penicillium citrinum*.

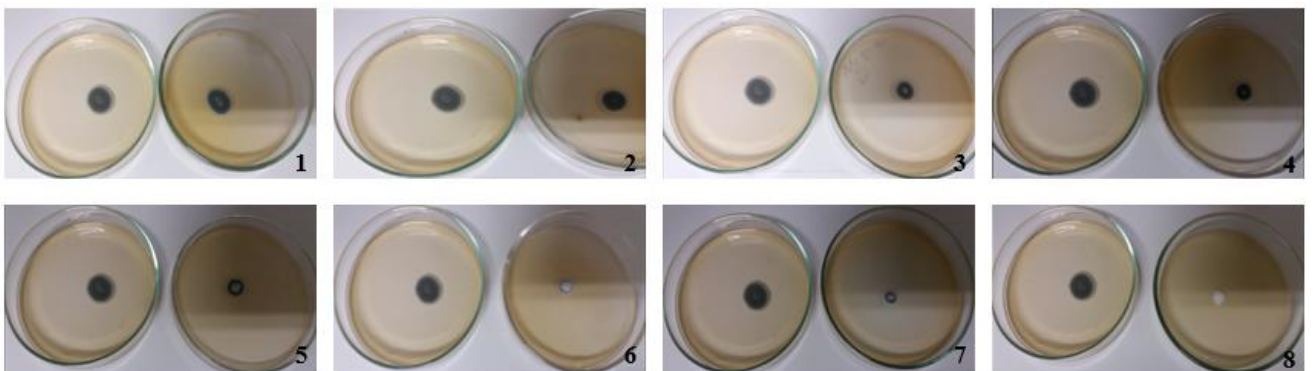


*Em todas as imagens, a placa de Petri da esquerda é referente ao controle negativo e a placa de Petri à direita é referente a cada tratamento. Os tratamentos com o óleo essencial de *E. microcorys* nas concentrações de 50, 100, 250, 500, 1000, 1500 2000 e 3000 μLL^{-1} estão representados pelas figuras 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8, respectivamente.

O tratamento com o óleo essencial de *E. torreliana* inibiu em 61,5% o crescimento micelial na concentração de 3000 μLL^{-1} , sendo o óleo essencial menos eficiente entre os demais óleos essenciais avaliados; porém, nessa mesma concentração, ele inibiu a divisão dos esporos (Figura 21).

Dentre os óleos essenciais testados, o de *E. torreliana* foi o que apresentou um aroma menos intenso durante a realização dos experimentos e o que apresentou maior porcentagem de α -pineno (67,77%), podendo esse composto apresentar menor grau de volatilidade em relação aos constituintes químicos dos outros óleos essenciais.

Figura 21- Atividade antifúngica do óleo essencial de *Eucalyptus torreliana* sobre *Penicillium citrinum*.

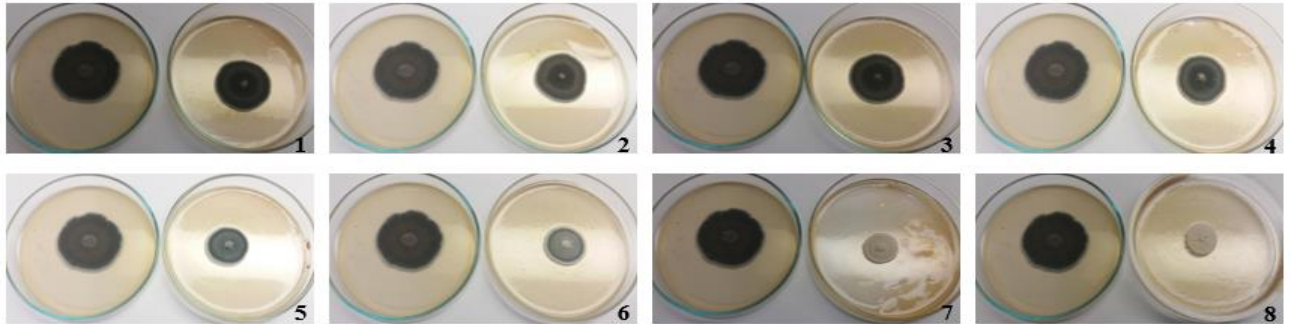


*Em todas as imagens, a placa de Petri da esquerda é referente ao controle negativo e a placa de Petri à direita é referente a cada tratamento. Os tratamentos com o óleo essencial de *E. torreliana* nas concentrações de 50, 100, 250, 500, 1000, 1500 2000 e 3000 μLL^{-1} estão representados pelas figuras 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8, respectivamente

Analisando os resultados obtidos para o tratamento com o óleo essencial de *E. grandis*, foi possível observar uma inibição máxima no crescimento micelial de 64,8%, na concentração

de 3000 μLL^{-1} . Todos os tratamentos com esse óleo essencial diferiram entre si estatisticamente. O tratamento com o óleo essencial de *E. grandis* foi o que inibiu a esporulação na menor concentração em 2000 μLL^{-1} (Figura 22).

Figura 22- Atividade antifúngica do óleo essencial de *Eucalyptus grandis* sobre *Penicillium citrinum*.



*Em todas as imagens a placa de Petri da esquerda é referente ao controle negativo e a placa de Petri à direita é referente a cada tratamento. Os tratamentos com o óleo essencial de *E. grandis* nas concentrações de 50, 100, 250, 500, 1000, 1500, 2000 e 3000 μLL^{-1} estão representados pelas figuras 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 respectivamente.

Su et al (2006), avaliando a atividade antifúngica dos óleos essenciais de *E. grandis*, *E. citriodora* e *E. camaldulensis* sobre o crescimento micelial de *Penicillium citrinum*, com 7 dias de incubação, obtiveram um resultado de inibição do crescimento micelial de 86% para *E. citriodora* e uma inibição menor que 50% para os outros dois óleos utilizados. Quando a análise foi realizada após 21 dias de incubação, os autores observaram que houve uma diminuição acentuada na atividade antifúngica dos 3 óleos utilizados, sendo a diminuição bastante acentuada para o óleo de *E. citriodora*, diminuindo de 86% de inibição para 26,4%, e para os óleos essenciais de *E. grandis* e *E. camaldulensis* a inibição do crescimento micelial foi menor que 20%. Esses resultados corroboram com os encontrados neste trabalho, verificando que os constituintes presentes nos óleos essenciais atuam na inibição do microrganismo.

Alfazairy (2004), em pesquisas sobre a atividade antifúngica do óleo essencial de *E. citriodora* na concentração de 3000 μLL^{-1} sobre *Penicillium citrinum* mostrou uma inibição de 100% do crescimento micelial e também na esporulação. Resultados esses que corroboram em parte com os encontrados neste trabalho, pois o óleo de *E. citriodora* aqui testado não inibiu 100% do crescimento micelial nem a esporulação em nenhuma concentração empregada. Esses resultados divergentes podem estar relacionados aos constituintes químicos de cada óleo essencial, pois, por mais que os óleos essenciais testados sejam extraídos da mesma espécie de *Eucalyptus*, há vários fatores que influenciam na sua composição química e na concentração

dos constituintes, como clima, solo, horário de coleta do material vegetal, ciclo circadiano, dentre outros.

Siramon (2013), avaliando a atividade antifúngica do óleo essencial de *E. camaldulensis*, encontrou uma inibição acima de 60% sobre o crescimento micelial de *Penicillium citrinum*, resultados menores do que aqueles encontrados neste trabalho. A divergência nos resultados pode estar relacionada com a composição e concentração química dos constituintes dos óleos essenciais extraídos da folha de *E. camaldulensis*.

A diferença na porcentagem da atividade antifúngica entre os óleos essenciais de diferentes espécies de *Eucalyptus* pode estar relacionada com a concentração de citronelal e citronelol, α -pineno, p-cimeno e 1,8-cineol. De acordo com Dogan (2017) e Su (2006), esses componentes são responsáveis pela atividade antifúngica dos óleos essenciais de algumas espécies de *Eucalyptus*.

Noori et al (2012), avaliando a atividade antifúngica do óleo essencial de *Zataria multiflora* Boiss, encontraram uma inibição total no crescimento micelial de *Penicillium citrinum* na concentração de 200 μLL^{-1} , reduzindo a produção de citrinina (micotoxina produzida por esse fungo) em 92,4%. No óleo essencial de *Zataria multiflora*, os autores encontraram alguns constituintes químicos como 1,8 cineol (0,3%), e p-cimeno (8,4), linalol (1,7%) γ -terpinene (4,0%), limoneno (0,3%) e α -pinene (0,4%). Esses constituintes também estão presentes nos óleos essenciais de *Eucalyptus*; porém, em maiores concentrações, comprovando a correlação entre a atividade antifúngica dos constituintes químicos presentes no óleo essencial de *Eucalyptus* spp. sobre *Penicillium citrinum* (MAHMOUDVAND, et al., 2017).

Sighn et al., (2005), estudando a atividade antifúngica do óleo essencial de *Nigella sativa* sobre *Penicillium citrinum*, encontraram 100% de inibição no crescimento micelial aplicando uma dose de 6 μL do óleo essencial no meio de cultura. Os autores identificaram como constituintes majoritários presentes nesse óleo essencial p-cimeno (36,2%) e α -pineno (3,33%), compostos orgânicos também presentes nos óleos essenciais de *Eucalyptus* spp. Com os resultados obtidos, pode-se fazer correlações entre as atividades antifúngicas de *Nigella sativa* e das espécies de *Eucalyptus*, uma vez que ambos apresentam constituintes químicos semelhantes nos seus óleos essenciais.

4.4 Atividade antifúngica *in vivo* dos óleos essenciais sobre *Hemileia vastatrix*

A atividade antifúngica *in vivo* dos óleos essenciais de quatro espécies de *Eucalyptus* sobre *Hemileia vastatrix* foi realizada avaliando os seus efeitos curativos e preventivos. Os resultados do efeito curativo dos óleos essenciais de quatro espécies de *Eucalyptus* sobre *Hemileia vastatrix* estão descritos na Tabela 9.

Tabela 9- Efeito curativo dos óleos essenciais de quatro espécies de *Eucalyptus* sobre *Hemileia vastatrix*

| | <i>E. citriodora</i> | <i>E. grandis</i> | <i>E. microcorys</i> | <i>E. camaldulensis</i> | Controle negativo | Leite | Fungicida controle |
|---|----------------------|-------------------|----------------------|-------------------------|-------------------|-------|--------------------|
| 1 | | | | | | | X |
| 2 | | | X | X | | | |
| 3 | X | X | | | | | |
| 4 | | | | | X | X | |

1-Folhas sem pústulas esporuladas; 2-Folhas com as pústulas pouco esporuladas; 3-Mais de 50% das pústulas esporuladas; 4-Pústulas totalmente esporuladas; X: resultado positivo de cada tratamento.

De acordo com os dados descritos na Tabela 9, é possível observar que todos os óleos essenciais apresentaram atividade antifúngica *in vivo* em diferentes intensidades, avaliando os seus efeitos curativos sobre o fungo *Hemileia vastatrix*. A avaliação da atividade antifúngica foi comparada em relação ao controle negativo, que apresentou todas as pústulas esporuladas recebendo nota 4, (Figura 23).

Figura 23- Aspecto geral de uma folha de café após o tratamento com controle negativo (água), apresentando todas as pústulas esporuladas com *Hemileia vastatrix*.



Fonte: do autor

As folhas de café borrifadas com a solução de leite em pó receberam nota 4, por apresentarem todas as pústulas esporuladas, ou seja, o leite em pó não exerceu efeito sobre o fungo *Hemileia vastatrix* (Figura 24); portanto, não interferindo nos resultados quanto à inibição da esporulação verificada nas formulações com os óleos essenciais.

Figura 24- Aspecto geral de uma folha de café tratada com uma solução de leite em pó, com todas as pústulas esporuladas com *Hemileia vastatrix*



Fonte: do autor

Dois dos óleos essenciais destacaram-se entre os demais, o de *E. camaldulensis* e *E. microcorys*, que receberam nota 2, ambos exerceram uma atividade antifúngica *in vivo* maior que os demais óleos essenciais utilizados, diminuindo o inóculo residual de 100% das pústulas esporuladas para menos de 50%, significando a presença de poucas pústulas esporuladas (Figura 25 a e b).

Os resultados iguais encontrados utilizando os óleos essenciais de *E. camaldulensis* e *E. microcorys* podem estar relacionados às suas composições químicas, que são parecidas, ambos apresentaram quantidades próximas de α -pineno, 1,8-cineol, α -terpineol e foram os únicos óleos essenciais que apresentaram em sua composição o limoneno.

Figura 25 a e b- Aspecto geral das folhas dos cafeeiros após os tratamentos com os óleos essenciais de *E. camaldulensis* (a) e *E. microcorys* (b) que estavam infectadas por *Hemileia vastatrix*. A folha à esquerda em cada imagem é referente aos tratamentos com os óleos essenciais de *E. camaldulensis* e *E. microrororys*, respectivamente, e a folha à direita em cada imagem é referente ao controle negativo.



Fonte: do autor

Os outros dois óleos essenciais de *E. grandis* e *E. citriodora* também exerceram atividade antifúngica, ambos diminuíram o inóculo residual de *Hemileia vastatrix* nas folhas do cafeeiro de 100% para um pouco mais de 50% das pústulas esporuladas (Figura 26 a e b).

Figura 26 a e b- Aspecto geral das folhas de cafeeiro após os tratamentos com óleos essenciais de *E. grandis* (a) e *E. citriodora* (b) que estavam infectadas com *Hemileia vastatrix*. A folha à esquerda de cada imagem é referente aos tratamentos com os óleos essenciais de *E. grandis* e *E. citriodora*, respectivamente, e a folha à direita de cada imagem é referente ao controle negativo.



Fonte: do autor

O tratamento com o fungicida controle positivo inibiu completamente a esporulação, sendo mais eficiente que todos os óleos essenciais testados, o que pode ser observado na Figura 27.

Figura 27- Aspecto geral de uma folha de cafeeiro tratada com uma solução do fungicida controle, com todas as pústulas sem esporos de *Hemileia vastatrix*.



Fonte: do autor

Os resultados do efeito curativo dos óleos essenciais de quatro espécies de *Eucalyptus* sobre *Hemileia vastatrix* estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10- Efeito preventivo dos óleos essenciais de *Eucalyptus* sobre a esporulação *Hemileia vastatrix*

| | <i>E. citriodora</i> | <i>E. grandis</i> | <i>E. microcorys</i> | <i>E. camaldulensis</i> | Testemunha | Leite | Fungicida controle |
|---|----------------------|-------------------|----------------------|-------------------------|------------|-------|--------------------|
| 1 | | X | | | | | X |
| 2 | X | | | X | | | |
| 3 | | | | | | | |
| 4 | | | X | | X | X | |

1-Folhas sem pústulas esporuladas; 2-Folhas com as pústulas pouco esporuladas; 3-Mais de 50% das pústulas esporuladas; 4-Pústulas totalmente esporuladas; X resultado positivo de cada tratamento.

De acordo com os dados descritos na Tabela 10, é possível observar que nem todos os óleos essenciais apresentaram atividade antifúngica preventiva *in vivo* sobre a proliferação do fungo *Hemileia vastatrix*. A avaliação da atividade antifúngica foi comparada em relação ao controle negativo, que apresentou todas as pústulas esporuladas, recebendo nota 4 (Figura 28).

Figura 28- Aspecto geral de folhas de cafeeiro referente ao controle negativo com todas as pústulas esporuladas com *Hemileia vastatrix*.



Fonte: do autor

De acordo com os dados descritos na Tabela 10, é possível observar que o óleo essencial de *E. grandis* destacou-se entre os demais, tendo o maior efeito preventivo, evitando a proliferação da *Hemileia vastatrix* nas folhas do cafeeiro contaminadas, não apresentando sequer uma pústula esporulada no momento da análise. Inferindo-se, então, que ele atuou como indutor de resistência, impedindo a manifestação da doença (Figura 29).

Figura 29- Aspecto geral dos tratamentos com *E. grandis* sobre as folhas de cafeeiro, mediante a avaliação do efeito preventivo. As duas primeiras folhas à esquerda da imagem são referentes aos tratamentos com o óleo essencial de *E. grandis* e a folha à direita da imagem é referente ao controle negativo.



Fonte: do autor

Os óleos essenciais de *E. citriodora* e *E. camaldulensis* apresentaram a mesma atividade antifúngica, pois ambos preveniram a esporulação em mais de 50% (Figura 30 a e b).

Figura 30 a e b- Aspecto geral das folhas de cafeeiro após os tratamentos com os óleos essenciais de *E. camaldulensis* (a) e *E. citriodora* (b) sobre folhas de cafeeiro, avaliando o efeito preventivo. A folha à esquerda de cada imagem é referente aos tratamentos com os óleos essenciais de *E. camaldulensis* e *E. citriodora*, respectivamente, e a folha à direita de cada imagem é referente ao controle negativo.



a



b

Fonte: do autor

A Figura 31 mostra que o óleo essencial de *E. camaldulenseis*, embora tenha prevenido as folhas do cafeeiro da proliferação de *Hemileia vastatrix*, causou uma necrose nelas.

Figura 31- Aspecto geral de uma muda de cafeeiro com as folhas necrosadas após o tratamento com *E. camaldulensis* mediante a avaliação do seu efeito preventivo.



Fonte: do autor

O óleo essencial de *E. microcorys* foi o único que não exerceu atividade antifúngica preventiva sobre a proliferação de *Hemileia vastatrix*, tendo todas as folhas apresentando pústulas esporuladas, recebendo nota 4 (Figura 32).

Figura 32- Aspecto geral da folha de um cafeeiro após o tratamento com *E. microcorys*, mediante o seu efeito preventivo.



Fonte: do autor

No tratamento com o fungicida controle, foi possível observar que as mudas de cafeeiro borrifadas com ele não apresentaram pústulas esporuladas com *Hemileia vastatrix*, recebendo nota 4 no tratamento (Figura 33).

Figura 33- Aspecto geral de uma folha de cafeeiro tratada com uma solução do fungicida controle, não apresentando pústulas com *Hemileia vastatrix*.



Fonte: do autor

Os resultados obtidos que avaliaram o efeito curativo e preventivo dos óleos essenciais de *Eucalyptus* spp. diferiram tanto em relação à espécie de *Eucalyptus* utilizado, quanto aos efeitos avaliados.

O óleo essencial de *E. microcorys* exerceu atividade antifúngica avaliando o efeito curativo, deixando uma porcentagem residual de esporos menor que 50%; porém, esse óleo essencial não exerceu atividade antifúngica, atuando como preventivo, permitindo uma

esporulação de 100% das folhas contaminadas com a ferrugem do cafeeiro. Provavelmente os constituintes químicos presentes nesse óleo essencial atuam diretamente no combate a *Hemileia vastatrix*, levando o microrganismo à morte, mas não atuam como indutores de defesas nas plantas.

O único óleo essencial que recebeu a mesma nota atuando como antifúngico preventivo e curativo foi o óleo essencial de *E. camaldulensis*, permitindo o crescimento de menos de 50% das pústulas esporuladas. Os resultados obtidos indicam que os constituintes desse óleo essencial apresentam efeito direto no combate ao microrganismo estudado e apresentam também efeito de indutor de resistência ou uma capacidade de atuar sobre o fungo após a sua penetração na folha, aumentando os mecanismos de defesa nas plantas. Entretanto, foi observado que esses mesmos constituintes causaram uma necrose nas folhas do cafeeiro durante a avaliação do efeito preventivo.

Algumas hipóteses surgiram após observar que as folhas do cafeeiro tratadas com o óleo essencial de *E. camaldulensis* necrosaram-se durante a avaliação do efeito preventivo sobre *Hemileia vastatrix*. A primeira, a qual as mudas de cafeeiro necrosaram, provavelmente ocorreu pelo fato de o óleo essencial ter aderido à superfície das folhas, criando, assim, uma camada superficial, comprometendo o sistema respiratório da planta e levando-a à morte. Como o óleo essencial é constituído de diferentes compostos, provavelmente alguns são tóxicos ao cafeeiro, necessitando, portanto, de análises citotóxicas.

Assim, comparou-se o motivo pelo qual na avaliação do efeito preventivo do óleo essencial de *E. camaldulensis* as mudas necrosaram, e na avaliação do efeito curativo com esse mesmo óleo essencial, as mudas não necrosaram. Provavelmente isso ocorreu logo após o óleo essencial ser borrifado na parte abaxial das folhas; o mesmo reagiu completamente com os esporos presentes, não ficando resíduo desse nas folhas.

O óleo essencial de *E. citriodora* apresentou atividade antifúngica em ambos os efeitos, curativo e preventivo. No entanto, esse óleo essencial foi mais eficaz no efeito preventivo, apresentando poucas pústulas esporuladas do que no efeito curativo, que possibilitou a ocorrência de mais de 50% das pústulas esporuladas.

Avaliando o efeito preventivo do óleo essencial de *E. grandis*, esse destacou-se entre os demais, inibindo 100% a esporulação, ou seja, esse óleo essencial possivelmente estimulou a maior produção dos mecanismos de defesa do cafeeiro frente à *Hemileia vastatrix*, agindo em profundidade sobre o fungo após a sua penetração na planta. O mesmo resultado não foi encontrado com a avaliação do efeito curativo do mesmo, que após sua aplicação, ainda restaram mais de 50% de esporulação.

Pereira et al., (2012 b), estudando a atividade antifúngica *in vivo* do óleo essencial de citronela na concentração de 1000 μLL^{-1} sobre *Hemileia vastatrix*, observaram uma redução de até 46% na esporulação presente no cafeeiro. Os autores comprovaram que a aplicação do óleo essencial de citronela aumentou a produção de enzimas de defesa do cafeeiro, apresentando um nível maior de [POX 336, quitinase (CHI) e ligninas solúveis] em relação ao controle negativo. Esse efeito de indutor de resistência pode ter ocorrido após o tratamento das mudas de café com os óleos essenciais de *E. citriodora*, *E. grandis* e *E. camaldulensis*, aumentando o nível de proteínas relacionadas à patogênese.

Bonaldo et al (2007), pesquisando o extrato aquoso de *E. citriodora*, comprovaram um aumento de 10% na produção de fitoalexinas em cotilédones de soja após o tratamento com o mesmo, concluindo que o extrato possui a capacidade de ativar mecanismos de defesa dessa planta. O mesmo pode ter ocorrido após o tratamento das mudas de café com o óleo essencial de *E. citriodora* durante este experimento, em que se avaliou o efeito preventivo sobre *Hemileia vastatrix*, induzindo as mudas do cafeeiro a criarem mecanismo de defesa sobre o microrganismo.

Alguns constituintes isolados de óleos essenciais já tiveram seu mecanismo de ação elucidado sobre alguns microorganismos, como o **1,8-cineol**, **terpinen-4-ol** e **α -terpineol**, que reduziram a viabilidade celular de *S. aureus* na fase de crescimento e também causaram aos microrganismos um dano na membrana citoplasmática induzindo a liberação de enzimas autolíticas associadas à membrana celular (SAAD et al., 2013).

Cimanga et al. (2002), estudando os óleos essenciais de *E. citriodora* e *E. camaldulensis*, comprovaram que as atividades desses óleos essenciais são mais eficazes sobre *Pseudomas aeruginosas* do que a atividade dos seus constituintes químicos majoritários isolados, 1,8-cineol, α -pineno e p-cimeno.

A atividade antifúngica dos óleos essenciais pode ser atribuída à sua lipofilicidade. Os óleos essenciais, por apresentarem em suas composições um grande número variado de constituintes com diversas funções orgânicas, como: fenóis, éter, álcoois, ésteres, aldeídos e cetonas, em diferentes concentrações, pode apresentar atividade antifúngica relacionada ao sinergismo de todos os constituintes ou de um constituinte majoritário presente no óleo essencial (KEDIA; JHA; DUBEY, 2015). Para os autores, os óleos essenciais, por serem substâncias lipofílicas, conseguem penetrar na membrana celular dos fungos ou ficam entre a membrana, causando diversos danos à célula. Quando o óleo essencial se acumula na membrana celular dos fungos, pode causar um inchaço, levando ao rompimento de interações proteínicas-

lipídeo; com isso, a membrana celular perde a sua permeabilidade, deixando extravasar da célula material celular e íons, levando a célula à morte.

Outro mecanismo seria a penetração dos componentes do óleo essencial na membrana do fungo. Dessa forma, ele pode atuar de duas maneiras, retardando a biossíntese do ergosterol, que é um hormônio responsável por manter a vitalidade celular ou causando danos às organelas de membrana, como a mitocôndria, levando a célula à morte (KEDIA; JHA; DUBEY, 2015).

5 CONCLUSÃO

Os constituintes majoritários do óleo essencial de *E. citriodora* foram (citronelal 88,83%, citronelol 3,39% e iso isopulegol 4,73%), de *E. torreliana* (α -pineno 67,77%, 1,8-cineol 10,32% e β -pineno 8,15%), de *E. camaldulensis* (1,8-cineol 41,61%, α -terpineol 19,87% e α -pineno 15,81%), de *E. grandis* (1,8-cineol 37,43%, α -pineno 36,35% e α -terpineol 8,71%) e de *E. microcorys* (1,8-cineol 39,08%, α -pineno 19,45% e trans-pinocarveol 9,86%).

Os óleos essenciais de *E. torreliana*, *E. grandis*, *E. citriodora*, *E. microcorys* e *E. camaldulensis* inibiram em 100% a germinação dos esporos de *Hemileia vastatrix*, nas concentrações de 250, 1000, 50, 50 e 50 μLL^{-1} , respectivamente.

Os óleos essenciais de *E. torreliana*, *E. grandis*, *E. citriodora*, *E. microcorys* e *E. camaldulensis* inibiram o crescimento micelial de *Penicillium citrinum* em 61,5; 64,8; 76,54; 68,2 e 83,0%, ambos na concentração de 3000 μLL^{-1} .

Todos os óleos essenciais apresentaram atividade antifúngica *in vivo*, exceto o óleo essencial de *E. microcorys*, que não apresentou atividade antifúngica *in vivo*, atuando como preventivo sobre *Hemileia vastatrix*.

A diferença na composição química entre espécies com ação antifúngica semelhante demonstra a atuação de diferentes compostos sobre os microorganismos estudados.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com os resultados deste projeto, espera-se formular um antifúngico à base de óleos essenciais de espécies de *Eucalyptus* que seja viável para combater a ferrugem do cafeeiro (*Hemileia vastatrix*) e a contaminação dos grãos armazenados por (*Penicillium citrinum*), sendo esses fungos responsáveis pela perda de produção e qualidade dos grãos de café.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABU-DARWISH, M. S. et al. *Artemisia herba-alba* essential oil from Buseirah (South Jordan): Chemical characterization and assessment of safe antifungal and anti-inflammatory doses. **Journal of ethnopharmacology**, v. 174, p. 153-160, 2015.
- ADAM, K.; Zapp, J. Biosynthesis of the isoprene units of chamomile sesquiterpenes. *Phytochemistry*, v. 48, p. 953-959, 1998.
- ADAMS, R. P. Identification of essential oils componentes by gas chromatography/ mass spectroscopy. 4 ed. Carol Stream: Allured, 2007. 804p.
- ALFAZAIRY, A. AM. Antimicrobial activity of certain essential oils against hindgut symbionts of the drywood termite *Kaloterme flavicollis* Fabr. and prevalent fungi on termite-infested wood. **Journal of applied entomology**, v. 128, n. 8, p. 554-560, 2004.
- ALVARENGA SANTOS FRAGA MIRANDA, Cíntia et al. Atividade alelopática de óleos essenciais de plantas medicinais na germinação e vigor de aquênios de alface. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 36, n. 1, 2015.
- AMARAL, M.F.Z.J.; BARA, M.T.F. Avaliação da atividade antifúngica de extratos de plantas sobre o crescimento de fitopatógenos. **Revista Eletrônica de Farmácia**, Goiânia, v. 2, n. 2, p. 5-8, maio/jun. 2005.
- BARBOSA, L. C. A.; FILOMENO, C. A.; TEIXEIRA, R. R. Chemical variability and biological activities of eucalyptus spp. Essential Oils. **Molecules**, v. 21, n. 12, p. 1671, 2016.
- BATISTA, L. R.; CHALFOUN, S.M.; PRADO, G.; SCHWAN, R.F.; WHEALS, A.E. Toxigenic fungi associated with processed (green) coffee beans (*Coffea arabica* L.) **International Journal of Food Microbiology** 85:293-300. 2003.
- BENTAYEB, K. et al. The additive properties of Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) assay: The case of essential oils. **Food chemistry**, v. 148, p. 204-208, 2014.
- BONALDO, S. M. et al. Contribuição ao estudo das atividades antifúngica e elicitora de fitoalexinas em sorgo e soja por eucalipto (*Eucalyptus citriodora*). **Summa Phytopathologica**, v. 33, n. 4, p. 383-387, 2007.
- BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. Biochemistry & Molecular Biology of Plants. **American Society of Plant Physiologists**, 2000.
- BILIA, A. R. et al. Essential oil of *Artemisia annua* L.: an extraordinary component with numerous antimicrobial properties. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, 2014.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). In: *Farmacopeia Brasileira*, Brasília, 5th ed.; 2010, 1, 198-199.

BRASIL - Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (Mapa). Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/politica-agricola/cafes/cafecultura-brasileira> publicado em 30/01/2017 12h37, última modificação 10/03/2017 14h11. Acessado em 07/04/2017 às 13h44.

CAPUCHO, A. S. et al. Chemical control of coffee leaf rust in *Coffea canephora* cv. conilon. **Australasian Plant Pathology**, v. 42, n. 6, p. 667-673, 2013.

CARVALHO, H. H; WIEST, J. M; GRECO, D. Palmeira. Atividade antibacteriana e a preditividade do condimento. **Cienc. Tecnol. Aliment**, v. 26, n. 1, p. 75-79, 2006.

CASTRO, Carla Aparecida de Oliveira et al. Brief history of Eucalyptus breeding in Brazil under perspective of biometric advances. **Ciência Rural**, v. 46, n. 9, p. 1585-1593, 2016.

CAVALEIRO, C. Plantas aromáticas e óleos essenciais em farmácia e medicina. **Potencialidades e aplicações das plantas aromáticas e medicinais. Edição da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Centro de Biotecnologia Vegetal, Lisboa, Curso teórico-prático**, p. 55-62, 2007.

CAMARGO, K. C. et al. Antimicrobial Activity of the Essential Oil from *Hyptis carpinifolia* Benth. **American Journal of Plant Sciences**, v. 8, n. 11, p. 2871, 2017.

CIMANGA, K. et al. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. **Journal of ethnopharmacology**, v. 79, n. 2, p. 213-220, 2002.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO 2017 http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17_05_18_15_37_37_boletim_cafe_-_maio_2017.pdf. Acessado em 22/05/2017 às 14:55.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 3rd ed. Chichester: J. Wiley, 2009. 539 p.

DE OLIVEIRA, Christiane Maria et al. Chemical Characterization and in vitro Antitumor Activity of the Essential Oils from the Leaves and Flowers of *Callistemon viminalis*. **American Journal of Plant Sciences**, v. 6, n. 16, p. 2664, 2015.

DE SOUZA, S. P. et al. Óleos essenciais como inibidores da acetilcolinesterase. **Revista Fitos Eletrônica**, v. 7, n. 04, p. 259-266, 2013.

DOGAN, G. et al. Chemical composition and biological activities of leaf and fruit essential oils from *Eucalyptus camaldulensis*. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 72, n. 11-12, p. 483-489, 2017.

DOMSCH, Klaus Heinz et al. **Compendium of soil fungi. Volume 1**. Academic Press (London) Ltd., 1980.

ESTANISLAU, A. A. et al. Composição química e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de cinco espécies de *Eucalyptus* cultivadas em Goiás. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 11, n. 2, p. 95-100, 2001.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374, 2007.

KEDIA, A.; JHA, D. K.; DUBEY, N. K. Plant essential oils as natural fungicides against stored product fungi. 2015.

LV, F. et al. In vitro antimicrobial effects and mechanism of action of selected plant essential oil combinations against four food-related microorganisms. **Food Research International**, v. 44, n. 9, p. 3057-3064, 2011.

MAHMOUDVAND, H. et al. Chemical composition and scolicidal activity of *Zataria multiflora* Boiss essential oil. **Journal of Essential Oil Research**, v. 29, n. 1, p. 42-47, 2017.

MSAADA, K. et al. Chemical composition and antioxidant and antimicrobial activities of wormwood (*Artemisia absinthium* L.) essential oils and phenolics. **Journal of Chemistry**, v. 2015, 2015.

NOORI, N. et al. Effect of *Zataria multiflora* Boiss. essential oil on growth and citrinin production by *Penicillium citrinum* in culture media and mozzarella cheese. **Journal of Food Safety**, v. 32, n. 4, p. 445-451, 2012.

PASIN, L. A. A. P.; ALMEIDA, JR de; ABREU, MS de. Fungos associados a grãos de cinco cultivares de café (*Coffea arabica* L.). **Acta Botanica Brasilica**, v. 23, n. 4, p. 1129-1132, 2009.

PEREIRA, R. B. et al. Essential oils for rust control on coffee plants. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 36, n. 1, p. 16-24, (2012 a).

PEREIRA, R. B. et al. Citronella essential oil in the control and activation of coffee plants defense response against rust and brown eye spot. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 36, n. 4, p. 383-390, (2012 b).

PIMENTEL, F. A., et al. Influência da temperatura de secagem sobre o rendimento e a composição química do óleo essencial de *Tanaecium nocturnum* (Barb. Rodr.) BUR. & K. SHUM. *Química Nova*, [S. I], v. 31, n. 3, p. 523-526, Fev., 2008.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. Fungi and Food Spoilage Blackie Academic & Professional. **New South Wales, Australia**, 1997.

RADULOVIĆ, N. S. et al. Toxic essential oils. Part II: Chemical, toxicological, pharmacological and microbiological profiles of *Artemisia annua* L. volatiles. **Food and Chemical Toxicology**, v. 58, p. 37-49, 2013.

RAEISI, M. et al. Essential oil of tarragon (*Artemisia dracunculus*) antibacterial activity on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in culture media and Iranian white cheese. **Iranian Journal of Microbiology**, v. 4, n. 1, p. 30, 2012.

RASOOLI, I.; REZAEI, M.B.; ALLAMEH, A. Growth inhibition and morphological alterations of *Aspergillus niger* by essential oils from *Thymus eriocalyx* and *Thymus x-porlock*. **Food Control**, Vurrey, v. 17, n. 5, p. 359-364, May, 2006.

REZENDE, Danubia Aparecida Carvalho Selvati et al. Characterization of the Biological Potential of the Essential Oils from Five Species of Medicinal Plants. **American Journal of Plant Sciences**, v. 8, n. 02, p. 154, 2017.

RODRÍGUEZ, G. A. A. et al. *Phialomyces macrosporus* decreases anthracnose severity on coffee seedlings by competition for nutrients and induced resistance. **Biological Control**, v. 103, p. 119-128, 2016.

SAAD, Nizar Y.; MULLER, Christian D.; LOBSTEIN, Annelise. Major bioactivities and mechanism of action of essential oils and their components. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 28, n. 5, p. 269-279, 2013.

SANTOS, N. O. dos et al. Assessing the Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oils from Brazilian Plants—*Eremanthus erythropappus* (Asteraceae), *Plectranthus barbatus*, and *P. amboinicus* (Lamiaceae). **Molecules**, v. 20, n. 5, p. 8440-8452, 2015.

SINGH, G. et al. Chemical constituents and antimicrobial and antioxidant potentials of essential oil and acetone extract of *Nigella sativa* seeds. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 85, n. 13, p. 2297-2306, 2005.

SILOU, T. et al. Multivariate Statistical Analysis of the Variability of Essential Oils from the Leaves of *Eucalyptus torelliana* Acclimatised in Congo-Brazzaville. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 13, n. 4, p. 503-514, 2010.

SILVA, J. L. et al. Antifungal activity using medicinal plant extracts against pathogens of coffee tree. **Revista brasileira de plantas medicinais**, v. 16, n. 3, p. 539-544, 2014.

SILVA, P. H. M.; BRITO, J. O.; SILVA JUNIOR, F. G. Potential of eleven *Eucalyptus* species for the production of essential oils. **Scientia Agricola**, v. 63, n. 1, p. 85-89, 2006.

SIMÕES, C. M. D. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6th ed. Porto Alegre: UFSC/UFRGS, 2007. 1104 p.

SIRAMON, P.; OHTANI, Y.; ICHIURA, H. Chemical composition and antifungal property of *Eucalyptus camaldulensis* leaf oils from Thailand. **Records of natural Products**, v. 7, n. 1, p. 49, 2013.

SU, Y.C.; Ho, C.L.; WANG, E.I.; CHANG, S.T. Antifungal activities and chemical compositions of EOs from leaves of four *Eucalyptus*. *Taiwan J. Sci.* **2006**, 21, 49–6.

SHARAFATI-CHALESHTORI, R. et al. Use of Tarragon (*Artemisia dracunculus*) essential oil as a natural preservative in beef burger. **Italian Journal of Food Science**, v. 26, n. 4, p. 427, 2014.

STEFFEN, R. B.; ANTONIOLLI, Z. I.; STEFFEN, G. P. K. Efeito estimulante do óleo essencial de eucalipto na germinação e crescimento inicial de mudas de *Eucalyptus grandis*. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 30, n. 63, p. 199, 2010.

TAMAYOU, P. J. **Resistência de Patogenies de Catimor a Oito Raças de *Hemileia vastatrix* Berk et Br.** 1988. 64p. Tese M.S. –UFV, Viçosa, MG.

TIMUNG, R. et al. Composition and anti-bacterial activity analysis of citronella oil obtained by hydrodistillation: Process optimization study. **Industrial Crops and Products**, v. 94, p. 178-188, 2016.

TEIXEIRA, M. L. Óleos essenciais de *Cantinoa carpinifolia* (Benth.) e *Lippia organoides* Kunth.: composição química, atividade antioxidante e potencial farmacológico. 2016. 191 p. Tese (Doutorado em Agroquímica) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2016.

VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P. D. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal Chromatography Amsterdam**, v. 11, p. 463–471, 1963.

VÁRZEA, V. M. P.; MARQUES, D. V. Population variability of *Hemileia vastatrix* vs. coffee durable resistance. **Durable resistance to coffee leaf rust**, p. 53-74, 2005.

VITORATOS, A. et al. Antifungal activity of plant essential oils against *Botrytis cinerea*, *Penicillium sp italicum* and *Penicillium sp digitatum*. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, v. 41, n. 1, p. 86, 2013.

XING, Y. et al. Antifungal activities of clove oil against *Rhizopus nigricans*, *Aspergillus flavus* and *Penicillium citrinum* in vitro and in wounded fruit test. **Journal of food safety**, v. 32, n. 1, p. 84-93, 2012.

ZAMBOLIM, L. Current status and management of coffee leaf rust in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v. 41, n. 1, p. 1-8, 2016.