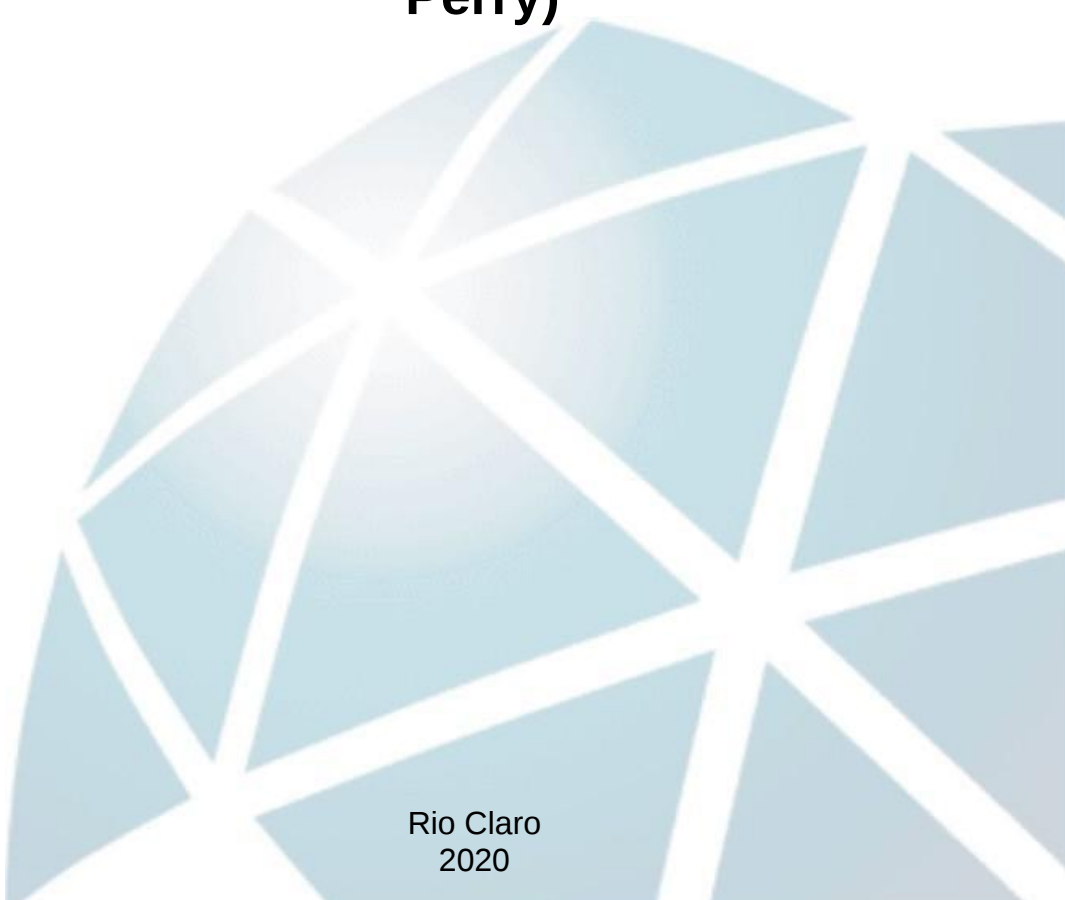


Tiago Soraggi Battagin

**Avaliação da ação anti-*Xanthomonas citri*
subsp. *citri* do óleo essencial de cravo
(*Syzygium aromaticum* (L.) Merr & LM
Perry)**



Rio Claro
2020

TIAGO SORAGGI BATTAGIN

**Avaliação da ação anti-*Xanthomonas citri* subsp. *citri* do óleo
essencial de cravo (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr & LM Perry)**



Orientador: Prof. Dr. Henrique Ferreira

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Instituto de Biociências da Universidade
Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" -
Câmpus de Rio Claro, para obtenção do grau de
Bacharel em Ciências Biológicas.

Tiago Soraggi Battagin

Rio Claro

2020

B335a Battagin, Tiago Soraggi
Avaliação da ação anti-Xanthomonas citri subsp. citri do óleo
essencial de cravo (Syzygium aromaticum (L.) Merr & LM
Perry) / Tiago Soraggi Battagin. -- Rio Claro, 2020
26 f. : il., tabs., fotos + 1 CD-ROM

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências
Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto
de Biociências, Rio Claro
Orientador: Henrique Ferreira

1. Microbiologia. 2. Frutas cítricas pesquisa. 3. Eugenol. I.
Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do
Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha família, que foram primordiais durante toda a minha caminhada. Sempre presentes, ambos nos momentos de alegria e tristeza, sem eles nada do que foi desenvolvido nesse trabalho e nem o caminho que me levou a iniciá-lo seriam possíveis.

Deixo uma homenagem especial ao meu tio Leonardo Soraggi, um grande homem, sempre animado e presente no convívio familiar, que na semana da conclusão deste trabalho veio a falecer. Jamais nos esqueceremos de você.

AGRADECIMENTOS

À minha família, sem a qual nem mesmo o meu ingresso na universidade seria possível.

À UNESP Campus Rio Claro, local onde realizei meus estudos sob a tutela de excelentes professores e acadêmicos.

Ao professor Henrique Ferreira e toda a equipe do laboratório Genética de Bactérias, que me acolheram e caminharam ao meu lado na realização deste trabalho.

Resumo

A citricultura, atividade econômica de imensa importância para o Brasil, é ameaçada por várias pragas, dentre elas o cancro cítrico asiático, causado pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*X. citri*). A doença causa lesões necróticas nas folhas, frutos e caule, podendo inclusive causar desfolha e queda prematura dos frutos, além de tornar o mercado de mesa para as frutas infectadas inviável. Por ser uma doença incurável, técnicas atuais de controle dependem do status fitossanitário da área e incluem a erradicação de plantas infectadas ou manejo para limitar o espalhamento da doença. Para o mercado de frutos de mesa, faz-se necessária a sanitização dos frutos destinados a outros estados ou países, atualmente efetuada por meio da imersão em hipoclorito de sódio. Porém esse método possui vários problemas, indo desde a proibição do composto na união europeia até possíveis danos à saúde e ao meio ambiente. Nesse contexto, se torna evidente a necessidade de pesquisas para a busca de novos compostos mais sustentáveis e sem as consequências negativas do hipoclorito. O presente estudo explora um desses compostos, em específico o óleo de cravo, que se trata de um óleo essencial extraído da planta *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M.Perry. Foram feitos testes que buscaram determinar a concentração inibitória (IC) necessária para a *X. citri* *in vitro* e testes da avaliação do poder sanitizante do óleo. A partir dos ensaios *in vitro* a concentração inibitória foi considerada de 0,7%. Quanto aos testes simulando as condições de sanitização em packinghouse, a partir de 1% de concentração de óleo essencial de cravo já foi possível observar inibição quando comparado ao controle não tratado e, no que se refere a concentração de 5%, capacidade sanitizante semelhante ao produto comercial à base de hipoclorito (200ppm).

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	6
1.1. Citricultura, Cancro Cítrico e Legislação.....	6
1.2. Óleos Essenciais e Óleo de Cravo.....	9
2. OBJETIVO.....	11
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	12
3.1. Linhagem Bacteriana e Cultivo.....	12
3.2. Agente Sanitizante.....	12
3.3. Teste de Concentração Inibitória.....	12
3.4. Teste de Sanitização em Limões.....	13
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	16
4.1. Teste de Concentração Inibitória.....	16
4.2. Teste de Sanitização em Limões.....	17
5. CONCLUSÕES.....	23
6. REFERÊNCIAS.....	24

1. INTRODUÇÃO

1.1. Citricultura, Cancro Cítrico e Legislação.

O cultivo dos citros, isto é, a citricultura, é um ramo do agronegócio de grande importância econômica para o Brasil e para o mundo todo, sendo um dos mercados mais lucrativos do mundo e tendo a China, Brasil e Estados Unidos como os três principais produtores mundiais. Os citros incluem um grande número de plantas do gênero *Citrus* e outros gêneros afins (*Fortunella* e *Poncirus*) (MATTOS JUNIOR et al., 2005). Quando se trata da laranja, o Brasil responde por 34% da fruta e 56% do suco produzido no mundo todo, sendo 97% deste suco destinado à exportação, totalizando em uma participação nacional de 76% de todo o comércio internacional do produto (NEVES & TROMBIN, 2017). Em território brasileiro, São Paulo mantém a liderança na área, com 85% de toda a produção nacional de laranja (MATTOS JUNIOR et al., 2005).

O mercado com mais valor agregado, porém, é o de frutas de mesa, devido ao fato de que a citricultura sofre com várias pragas e doenças que acabam inviabilizando o comércio direto de frutos, dentre elas o chamado Cancro Cítrico, considerado como uma das doenças mais temidas deste ramo do agronegócio (DAS, 2003). A doença é causada pela bactéria *Xanthomonas citri* e sua variedade mais severa e difundida trata-se do cancro cítrico asiático, causado pela subespécie *citri* da mesma bactéria (GOTTWALD; GRAHAM; SCHUBERT, 2002). A doença pode ocorrer em todas as variedades de citros de importância comercial e é conhecida por causar lesões necróticas em folhas, frutas e caule, além de desfolha, queda prematura de frutos e deterioração de brotos em infecções mais prolongadas. Os frutos afetados tornam-se inviáveis para o mercado de mesa, ficando restritos à produção de sucos (BEHLAU et al., 2017).

A *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*X. citri*) é uma bactéria aeróbica, Gram-negativa, de formato bacilóide e que possui um flagelo unipolar para motilidade (GRAHAM et al., 2004). Seu ciclo de vida pode ser dividido em quatro etapas, começando com a disseminação, que se trata da chegada da bactéria em uma planta sadia. Isso pode ocorrer por meio de chuvas, ferramentas, roupas ou aparelhagens contaminadas. A *X. citri* não é disseminada por insetos, e utiliza a água como seu veículo. A segunda etapa é a infecção e envolve a penetração da

bactéria na planta, seja por aberturas naturais, como estômatos ou ferimentos no tecido. A terceira é a colonização, que consiste no início da doença propriamente dita e o aparecimento dos sintomas. A partir do ponto de penetração as bactérias liberam enzimas digestivas para a obtenção de nutrientes e se multiplicam de maneira radial, causando a morte das células locais e formando lesões necróticas circulares, com as bactérias permanecendo ativas nas margens destas. Por fim, a última etapa trata-se da sobrevivência. Para se perpetuar, a *X. citri* depende da sobrevivência de suas colônias até que ela se dissemine para outras plantas ou regiões. Ela não possui hospedeiros intermediários nem formas de resistência, durando pouquíssimo tempo fora dos citros (BEHLAU et al., 2017). Por esse motivo, a comercialização e transporte de frutas ou plantas contaminadas é restrito (SCHUBERT et al., 2001) e é necessário garantir a sanitização dos frutos produzidos onde a doença é presente, tanto para venda para outros estados dentro do país quanto para exportação.

As estratégias empregadas para o controle do cancro cítrico mudaram bastante com o passar do tempo, tendendo à um abrandamento na questão de erradicação de plantas contaminadas. Quando o agente causal da doença foi identificado pela primeira vez em 1957 na região de Presidente Prudente-SP (BITANCOURT, 1957), as estratégias utilizadas eram focadas na erradicação de árvores infectadas e incluíram a remoção de todos os pomares numa área de 29 municípios e a proibição do plantio de citrus na área (SANTOS, 1991). Em São Paulo, entre os anos de 1999 e 2009 a legislação vigente na época é ainda considerada a que foi mais eficaz para o controle da *X. citri* e ditava a remoção da totalidade de plantas num talhão, caso a incidência de contaminação da *X. citri* passasse dos 0,5% (BELASQUE JR et al., 2010; BEHLAU et al., 2016). A partir de 2009, a legislação foi se tornando cada vez mais branda, limitando a área de plantas erradicadas para 30m² em torno da planta contaminada, e depois novamente em 2013, exigindo pela primeira vez na história da erradicação do cancro cítrico em São Paulo, apenas a remoção de árvores sintomáticas, permitindo a permanência daquelas que não apresentam sintomas, mesmo que próximas ao foco da doença, ditando apenas a aplicação de cobre na área, inspeções a cada três meses e relatórios semi-anuais (BEHLAU & BELASQUE, 2014). Os abrandamentos acarretaram em um aumento da incidência da doença (BELASQUE JR et al., 2010;

BEHLAU *et al.*, 2016) e os métodos de controle passaram a incluir técnicas de manejo integrado para áreas endêmicas.

Atualmente utiliza-se a INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 21, DE 25 DE ABRIL DE 2018 do ministério da agricultura, pecuária e abastecimento para o controle do cancro cítrico no Brasil. A IN21 distribui as áreas do território Brasileiro em quatro categorias (Status Fitossanitário) de acordo com a sua situação no que se refere ao cancro cítrico, estas sendo: Área sem ocorrência (estados onde a doença não está presente), área livre de praga (locais livres da doença, porém em estados em que ela está presente), área sob erradicação (doença presente, porém não amplamente distribuída) e área sob sistema de mitigação de risco (locais em que a doença está amplamente distribuída).

Cada status fitossanitário recebe um tratamento específico de acordo com seus atributos. Nas áreas sem ocorrência e nas livres de praga as medidas tem como objetivo a prevenção da entrada do cancro cítrico, por meio de monitoramento do trânsito de matéria vegetal e o plantio de mudas sadias (BRASIL, 2018). Nas áreas sob erradicação, o objetivo é erradicar a doença, novamente por meio do plantio de mudas sadias, e eliminação das plantas contaminadas ou com suspeitas de contaminação (BRASIL, 2018). Por fim, nas áreas sob sistema de mitigação de risco, como o estado de São Paulo, o objetivo é reduzir o impacto da doença na produção, utilizando um conjunto de medidas de manejo, como aplicação de cobre, que cria uma camada protetora sobre as estruturas da planta dificultando a penetração da *X. citri*, o plantio de quebra-ventos que funciona como uma barreira, limitando a mobilidade da bactéria por meio de chuvas e ventos e o controle do minador dos citros, inseto que causa ferimentos nas folhas, facilitando assim, a penetração da *X. citri*.

No que se refere à sanitização dos frutos destinados à exportação, também segue-se a IN21 (BRASIL, 2018), baseada na regulamentação do Food and Drug Administration (FDA-USA), que exige que todos os frutos vendidos e exportados do Brasil devem ser imersos numa solução de 200ppm (0,02%) de hipoclorito de sódio com pH 7 por 2 minutos. Tendo em vista porém a recente proibição do uso de hipoclorito de sódio para sanitização de alimentos da União Europeia por meio da Commission Regulation (EU) 2018/605 (EUROPE UNION, 2018), o fato de que a

importação de frutas que passaram pelo processo também serão banidas (EUROPE UNION, 2018) e as várias desvantagens inerentes do hipoclorito de sódio, sendo estas suas características corrosivas para várias ferramentas e equipamentos, a possibilidade de danos causados à casca das frutas e irritação à pele humana, a perda de efetividade devido à volatilização e o risco de reação com certas substâncias orgânicas, tornando-se mais tóxico e carcinogênico, a importância da busca por outros sanitizantes mais sustentáveis, menos tóxicos e eficazes para o processo torna-se evidente (LEPAUS et al. 2020).

1.2. Óleos Essenciais e Óleo de Cravo

Óleos essenciais são compostos líquidos voláteis formados por plantas aromáticas como metabólitos secundários. São caracterizados por uma complexa mistura com dezenas de componentes, sendo vários destes em quantidades bastante baixas e dois ou três em concentrações mais altas, que geralmente determinam as propriedades biológicas do óleo. Devido às suas propriedades antissépticas, na natureza funcionam como proteção antimicrobiana para as plantas que os produzem além de repelente para insetos indesejados e atrativo para outros (BAKKALI, AVERBECK, AVERBECK, & IDAOMAR, 2008).

Na indústria, os óleos essenciais são frequentemente utilizados para as mesmas funções que exercem na natureza. Atualmente, dos aproximadamente 3000 óleos essenciais conhecidos, 300 são importantes comercialmente, utilizados em áreas como cosméticos, odontologia, farmácia e inclusive, agricultura (BAKKALI et al., 2008)

O óleo de cravo, provido dos botões florais da planta *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L. M. Perry, será o óleo essencial utilizado nesse estudo. É um produto cujo uso é considerado seguro pela Food and Drug Administration (FDA-USA) e com propriedades antissépticas já bastante conhecidas. Seu uso é frequente em áreas como a odontologia, pela sua atividade contra bactérias orais causadoras da cárie, além de muitas outras, sejam gram-positivas ou negativas, como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella enterica* (CHAIEB et al., 2007). O principal componente do óleo de cravo é geralmente considerado o eugenol, mas a contagem

de seu teor no óleo pode variar bastante dependendo do trabalho, indo de 47.64% (PAWAR and THAKER, 2006) à 78% (PRASHAR et al, 2006) e além. Trata-se de um líquido amarelo claro, não solúvel em água com propriedades antioxidantes e inseticidas (CHAIEB et al., 2007).

O óleo essencial de cravo e o Eugenol, já tiveram suas ações antimicrobianas demonstradas no que se refere à diferentes bactérias do gênero *Xanthomonas*, inclusive a *X. citri* (LUCAS et al., 2012; SHAKIL et al., 2012).

2. OBJETIVO

Testar o potencial anti-*X. citri* do óleo essencial de cravo (*Syzygium aromaticum*) para que seja utilizado como um possível substituto do hipoclorito de sódio na sanitização de frutas cítricas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi feito em duas etapas, primeiramente um teste da concentração necessária do óleo essencial de cravo para inibir completamente o crescimento da *X. citri* *in vitro* e depois o teste de sanitização propriamente dito, feito com limões-taiti (*Citrus latifolia*) de aproximadamente 5cm de diâmetro.

3.1. Linhagem bacteriana e cultivo

A linhagem utilizada no estudo foi a *Xanthomonas citri* 306 (*Xanthomonas citri* subsp. *citri*) (IBSBF 1594) (SCHAAD et al. 2006). O cultivo da bactéria ocorreu a 29°C em meio NYG (5g/L de peptona, 3g/L de extrato de levedura, 20g/L de glicerol), podendo este ser sólido (ágar 1,5%) ou líquido dependendo da etapa do estudo. Para cada repetição de cada um dos testes, a *X. citri* foi reativada de um ultrafreezer -80°C, cultivada em meio NYG sólido por 48 horas e inoculada em um frasco contendo meio NYG líquido, para crescimento por 24 horas.

3.2. Agente Sanitizante

O óleo essencial de cravo utilizado no estudo foi adquirido na Farmácia Homeopática Hahnemann em Campinas-SP, onde foi produzido. O produto contém ~82% de eugenol.

3.3. Teste de concentração inibitória

O teste e análise dos resultados seguiu o protocolo descrito por Zamuner et al. (2020). Após o procedimento descrito no item 3.1 desse trabalho, a Densidade Óptica do inóculo foi medida em espectrofotômetro utilizando-se o $\lambda=600\text{nm}$ e ajustada para 0,4 em vários frascos com 5 ml, estes incluindo meio NYG líquido e o óleo de cravo em diferentes concentrações, que variaram desde 0% para o controle até 5%. Os inóculos foram então mantidos em shaker novamente a 29°C, 200rpm, desta vez por apenas 4 horas.

Após as 4 horas, foi feita então em solução salina (NaCl 0,85%) uma diluição fracionada de quatro passos para cada inóculo descrito acima, começando com 900µL de salina e 100µL do inóculo em questão, com 100µL da solução resultante desta sendo passada adiante, e assim sucessivamente, ao final do processo obtendo-se quatro frascos de diluição (10^{-1} até 10^{-4}) para cada inóculo original.

O conteúdo desses frascos foi gotejado em placas de petri com meio NYG sólido divididas em quatro quadrantes cada para a separação das diferentes concentrações. Foi utilizado 10µL de cada solução por gota e cerca de 8 gotas por quadrante.

Por fim, as placas foram incubadas a 29°C por 96 horas, com a verificação do crescimento bacteriano no interior das gotas e fotografias ao final do processo. O teste teve o intuito de observar qual a concentração mínima de óleo essencial de cravo foi capaz de inibir completamente o crescimento da *X. citri* ali presente (IC ou concentração bactericida).

3.4. Teste de sanitização em limões

O teste e análise dos resultados seguiu o protocolo descrito por Zamuner et al. (2020) e foi realizado três vezes, independentemente. Setenta e cinco limões taiti, obtidos de agricultores orgânicos certificados, de aproximadamente mesmo tamanho (~5 cm de diâmetro) com o mínimo de danos e imperfeições na casca foram lavados com água filtrada para remoção de impurezas e possíveis contaminantes e deixados secar por 16 horas. Após o procedimento descrito no item 3.1, os inóculos resultantes foram centrifugados em 6000 xg por 7 minutos, tiveram seu sobrenadante descartado e as células resuspendidas em tampão PBS 1x (2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, 137 mM NaCl; pH 7.4), com sua D. O. 600nm ajustado para 0,4, sendo esta uma concentração de *X. citri* mais alta que a normalmente encontrada durante o processo de sanitização industrial, como uma maneira de garantir a força do sanitizante (QADRI et al. 2015). Os limões foram escolhidos como as frutas modelo para esse teste devido ao seu menor tamanho quando comparados com outras frutas cítricas como laranjas, sendo assim de mais fácil manipulação.

Após a secagem de 16 horas e sobre papel pardo todos os 75 frutos foram então aspergidos com o inóculo preparado anteriormente por meio de um borrifador. Essa aspersão foi feita primeiramente na face superior dos frutos, que após secagem natural (aproximadamente 30 minutos) para o assentamento das bactérias foram virados para a aspersão da face inferior também. O processo foi repetido, cada face dos frutos sendo borrifadas duas vezes ao final do processo.

Após o procedimento, todos os limões foram dispostos sobre um novo papel pardo onde foram divididos em cinco grandes-grupos com cinco grupos cada, compostos de três limões cada um.

Individualmente cada grupo foi então depositado sobre uma peneira sobre os quais foram aspergidos tratamentos distintos com base no grande-grupo em que se encontravam. Para o primeiro grande-grupo foi aspergido PBS 1x puro, para o segundo, 200ppm (0,02%) de hipoclorito de sódio, esses dois primeiros correspondendo aos controles (negativo e positivo respectivamente), para o terceiro grande-grupo 1% de óleo essencial de cravo, para o quarto 2% do mesmo composto e por fim, para o quinto, 5%, esses três últimos correspondendo ao teste do composto em si. Todas as diluições foram feitas em PBS 1x e o tempo de aspersão sempre de dois minutos. Ainda sobre a peneira, cada grupo também foi secado com a ajuda de um secador de cabelo sem aquecimento. A movimentação da peneira durante o processo permitiu a aspersão e a secagem de cada fruto em sua totalidade, sendo estes depositados em novo papel pardo ao final do processo.

Cada grupo de limões foi então inserido em sacos plásticos com fecho hermético (18x23cm) contendo 100 ml de PBS 1X estéril, onde foram massageados cuidadosamente durante 5 minutos para a soltura das bactérias na superfície dos frutos. Do lavado de cada saquinho foram coletados 30 ml, que foram centrifugados por 7 minutos a 6000xg, seguido dos descartes do sobrenadante e resuspensão do pellet em 1 ml de PBS 1X estéril.

Das novas resuspensões, foram feitas diluições seriadas em PBS 1x estéril até 10^{-2} que em seguida foram plaqueadas em meio seletivo para *X. citri* (16 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Kasugamicina, 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Cefalexina, e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Cicloheximida) e incubadas a 29°C por 96 horas, com fotografias e contagens das colônias formadas ao final do

processo, verificando-se assim a efetividade do óleo essencial de cravo como um sanitizante de citros anti-*Xanthomonas citri*.

Após as três repetições foram realizados dois testes estatísticos, primeiramente uma análise não-paramétrica de Kruskal-Wallis e em seguida um teste de comparações múltiplas de Dunn para comparar os diferentes tratamentos com o controle.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Teste de Concentração Inibitória

Devido aos resultados obtidos no decorrer do experimento, as concentrações de óleo essencial de cravo utilizadas foram sendo modificadas com o intuito de detectar a IC, indo de 0% (controle), 1%, 2%, 3%, 4% e 5% no primeiro teste, para 0% (controle), 0,25%, 0,5%, 0,75%, 1%, 2%, 3%, 4% e 5% no segundo e 0% (controle), 0,4%, 0,5%, 0,6%, 0,7%, 0,8% e 0,9% no terceiro.

Os resultados foram bastante consistentes e estão ilustrados na tabela abaixo (Tabela 1), "+" e "-" indicando se houve crescimento ou não e posições em branco indicando a ausência da concentração em questão naquele teste.

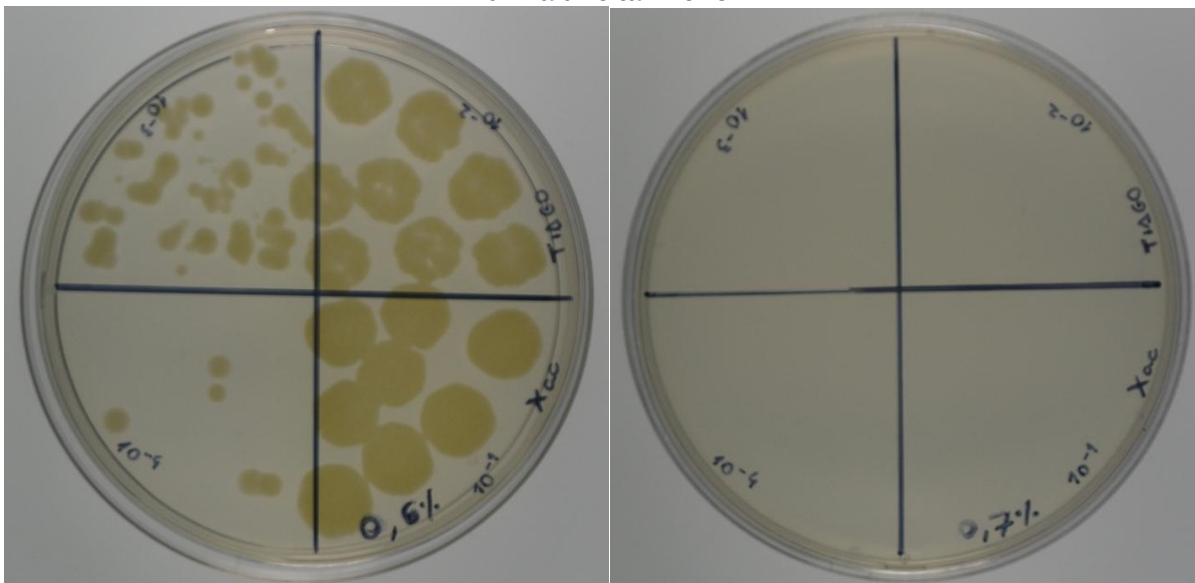
Tabela 1 - Resultado dos três testes de concentração inibitória														
	Concentração de Óleo de Cravo (%)													
	0,00%	0,25%	0,40%	0,50%	0,60%	0,70%	0,75%	0,80%	0,90%	1,00%	2,00%	3,00%	4,00%	5,00%
Teste 1	+									-	-	-	-	-
Teste 2	+	+		+			-			-	-	-	-	-
Teste 3	+		+	+	+	-		-	-					

No primeiro teste (T1) houve crescimento bacteriano apenas no controle com massa celular claramente visível em todas as diluições desse tratamento, sendo que todas as outras placas do T1 não apresentaram crescimento algum (1%, 2%, 3%, 4%, 5%)

No segundo teste (T2), o crescimento ocorreu no controle e nas concentrações 0,25% e 0,5% de óleo de cravo com massa celular claramente visível, sendo essa ausente nas demais (0,75%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%).

No terceiro teste (T3) ocorreu crescimento no controle e nas concentrações 0,4%, 0,5% e 0,6%, sendo este claramente visível em 0,4%, bastante tênue na 0,5% provavelmente devido a um erro de preparação (o meio estava fino demais nessa placa), e claramente visível em 0,6%, porém bastante limitado. A placa 0,6% foi a única em que foi possível contar o número de colônias dentro das gotas das concentrações 10^{-3} e 10^{-4} devido à ação do óleo de cravo que já inibia o crescimento de várias colônias (Figura 1). As demais placas do T3 (0,7%, 0,8%, 0,9%) não apresentaram crescimento algum.

Figura 1 - Placas de 0,6% e 0,7% do teste 3, diluições dispostas de maneira anti-horária com o 10^{-1} na direita inferior



Observando-se esses resultados, podemos chegar à concentração inibitória de 0,7%, valor este apoiado pelas três repetições realizadas. No T1 todas as concentrações eram maiores que 0,7% e nenhuma apresentou crescimento, no T2 as concentrações 0,5% e inferiores apresentaram crescimento, sendo esse ausente na 0,75% e superiores e por fim, no T3, as concentrações 0,6% e inferiores apresentaram crescimento, este sendo limitado na 0,6%, enquanto as 0,7% e superiores não o apresentaram. Todos os controles apresentaram crescimento, viabilizando assim os três testes.

O teste também mostrou a característica bactericida do óleo de cravo pois mesmo após o plaqueamento das bactérias em meio sem o composto elas não voltaram a crescer, indicando assim a morte definitiva dos microorganismos. Alguns compostos, os chamados bacteriostáticos, apenas inibem o crescimento das bactérias quando presentes na solução, mas caso removidos as bactérias voltam a crescer. Não é o caso do óleo essencial de cravo.

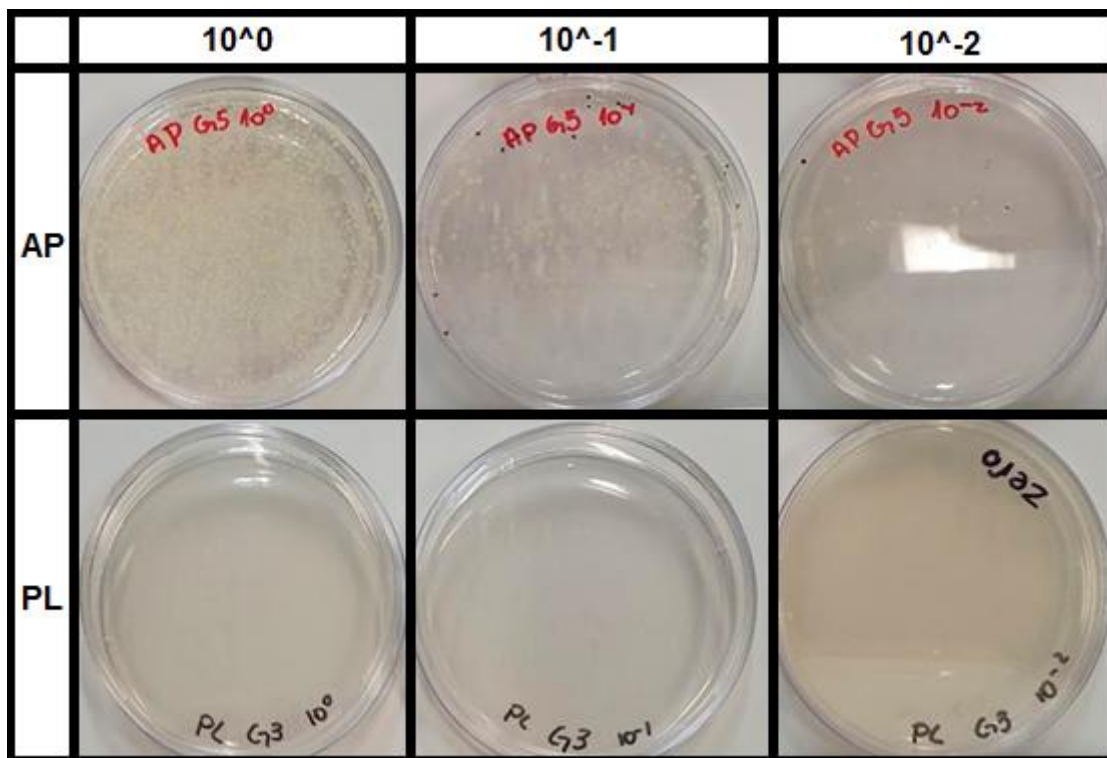
4.2. Teste de Sanitização em Limões

O experimento buscou simular o processo de sanitização dos limões taiti feito em packinghouses, mas utilizando borrifadores ao invés de imersão completa. O controle positivo foi o hipoclorito de sódio Pluron 444-A, produto comercial utilizado no Brasil para a sanitização dos frutos (ZAMUNER et al. 2020).

A redução de unidades formadoras de colônias foi drástica já no primeiro tratamento (1% óleo de cravo), sendo esta progressiva nas maiores concentrações. As concentrações de óleo essencial de cravo utilizadas no experimento (1%, 2% e 5%) foram escolhidas com base no valor do IC obtido anteriormente, o 1% sendo a concentração mais próxima do IC, 2% sendo o dobro desta e 5% como uma maior margem de segurança. Os efeitos do óleo de cravo da dose *in vitro* e na sanitização propriamente dita podem variar, sendo este o motivo do leque de diferentes concentrações testadas.

Tipicamente as placas dos controles negativos possuíam colônias incontáveis nas primeiras duas diluições (10^0 e 10^{-1}), sendo este ainda em alto número, geralmente superior a 100 na última diluição. Já as placas do controle positivo normalmente já tinham valores próximos a zero mesmo nas primeiras diluições, com uma razoável exceção na última repetição (Teste 3), onde alguns valores se destacam como outliers, mas ainda assim sempre abaixo de 100.

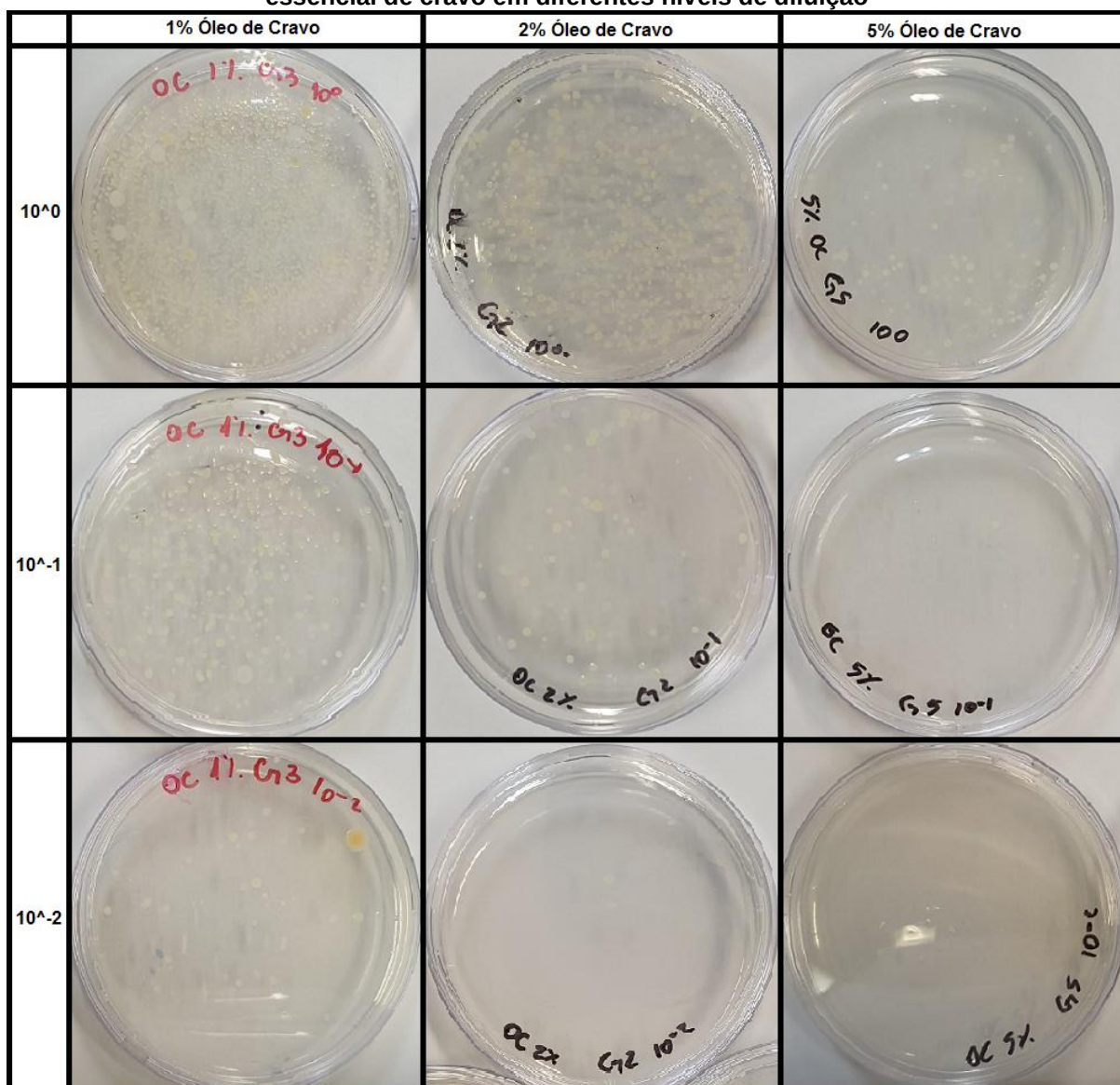
Figura 2 - Típica comparação entre o controle negativo (AP) e o positivo (PL) em diferentes níveis de diluição



No que se refere aos tratamentos com o sanitizante utilizado no trabalho, na concentração de 1% de óleo essencial de cravo a primeira diluição foi razoavelmente similar a do controle negativo, geralmente com colônias incontáveis.

Esse número porém conforme as diluições são intensificadas desce de maneira muito mais brusca do que o controle positivo, com cerca de 100 colônias em 10^{-1} e poucas dezenas em 10^{-2} . No 2% de óleo de cravo já eram raras as placas que apresentaram colônias incontáveis mesmo nas placas de 10^0 , com poucas dezenas já na primeira diluição (10^{-1}) e geralmente na ordem de unidades na última. O mesmo aconteceu na placa de 5%, porém com maior intensidade, tipicamente limitada a poucas dezenas ou unidades nas maiores concentrações e tendendo a zero nas demais, tendo novamente alguns valores do terceiro teste como outliers. Devido a variações que podem ocorrer por erro de diluição, todas as análises foram realizadas, para todas as repetições, na mesma ordem de grandeza da diluição seriada, para o controle não-tratado e tratamentos.

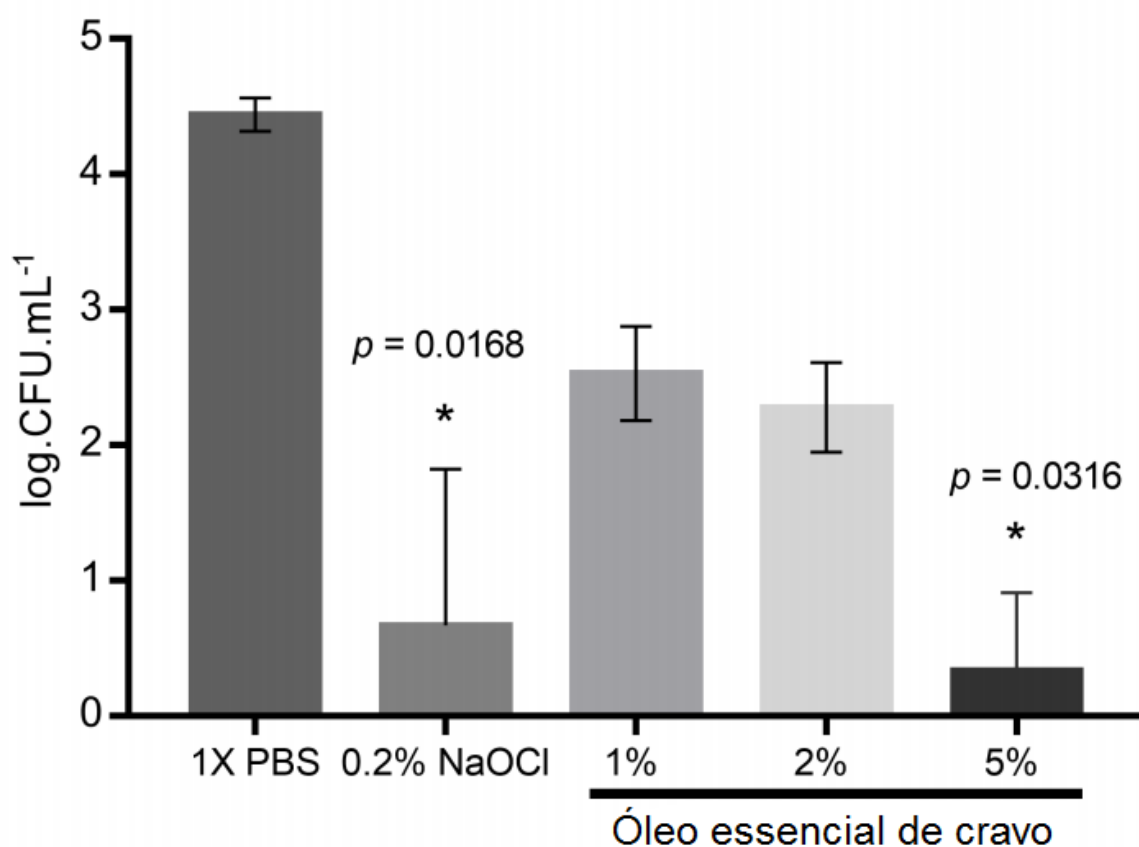
Figura 3 - Típica comparação e progressão entre as diferentes concentrações de óleo essencial de cravo em diferentes níveis de diluição



A contagem de colônias foi convertida para Unidades Formadoras de Colônia por ml (CFU/ml) para corrigir as diluições utilizadas e em seguida foi calculado o logaritmo na base 10 de cada um dos valores. O motivo para tal é de primeiramente transformar esses valores em números apropriados para a montagem de gráficos e efetuar a comparação da diminuição do crescimento em ordens de grandeza. É importante notar que apenas a diluição 10^{-1} foi utilizada nas análises seguintes, considerando-se placas com 30-300 colônias quando possível. Valores fora disso foram excluídos mas sempre mantendo-se três placas por experimento. O terceiro teste se mostrou estatisticamente diferente dos demais, portanto, também foi excluído.

Os valores logarítmicos obtidos das conversões foram então submetidos a um teste de normalidade, como mencionado acima e em seguida uma análise não-paramétrica de Kruskal-Wallis, visto que os dados não formavam uma distribuição normal, seguido de um teste de comparações múltiplas de Dunn, onde foram comparados os vários tratamentos e controles positivos com os controles negativos. No gráfico abaixo estão dispostos os valores médios resultantes das análises estatísticas aqui efetuadas e será discutido a seguir.

Figura 4 - Gráfico produzido no programa PRISM Graphpad de log CFU/ml x tratamentos. Observe a progressão formada entre os diferentes tratamentos



Como pode-se observar no gráfico, as médias dos diferentes tratamentos formam uma progressão, com o controle negativo contendo a mais alta quantidade de bactérias recuperadas, seguido do 1% e 2% com uma diferença bastante tênue e depois, Pluron e 5%, ambos bem mais baixos que os demais.

O teste de comparações múltiplas de Dunn revelou diferenças significativas ambos entre os controles negativos e os controles positivos e entre os controles negativos e os tratamentos com 5% de óleo de cravo. Os demais tratamentos não tiveram diferenças significativas com o controle não tratado, apontando para a

ineficácia do óleo essencial de cravo como sanitizante anti-*X. citri* nessas concentrações.

Observando-se também a quantidade de CFUs recuperadas em cada controle e tratamento ilustrada no gráfico da figura 4, é possível analisar quantas ordens de grandeza caíram em cada um dos tratamentos, partindo da quantidade original de bactérias (D.O. 0,4) que corresponde a 10^7 células/mL, ou seja $7 \log.CFU.mL^{-1}$. O controle negativo foi aquele em que mais células foram recuperadas, como era esperado, possuindo uma média de $4,44 \log.CFU.mL^{-1}$ recuperados, uma queda de 2,56 em ordens de grandeza quando comparado com o número original de células. Podemos então assumir, que essa queda de 2,56 é devido a fatores relacionados à lavagem ou outras partes do procedimento. Partindo-se desse $4,44 \log.CFU.mL^{-1}$ recuperados do controle negativo, podemos então verificar a eficácia dos dois sanitizantes utilizados no experimento nas diferentes concentrações. Para o controle positivo ($0,67 \log.CFU.mL^{-1}$), tivemos uma queda de 3,77 em ordens de grandeza quando comparado com o controle negativo, já para os tratamentos com óleo de cravo de 1% ($2,53 \log.CFU.mL^{-1}$), 2% ($2,28 \log.CFU.mL^{-1}$) e 5% ($0,33 \log.CFU.mL^{-1}$), tivemos uma queda de 1,91; 2,16 e 4,11 respectivamente, sendo este último superior até mesmo ao controle positivo (Pluron). Além disso, segundo estudo por Paloschi (2019), onde foi efetuada a inoculação de suspensões de *X. citri* em folhas de laranja, aquelas com concentração de até $2 \log.CFU.mL^{-1}$ não foram eficientes para causar lesões de cancro cítrico, enfatizando o controle positivo e o tratamento de 5% óleo de cravo como os mais efetivos do conjunto, com valores inferiores a $2 \log.CFU.mL^{-1}$.

Durante o teste também foi possível observar vários contaminantes que cresceram juntamente com a *X. citri* nas placas. Isso já era esperado, devido à natureza não-estéril do experimento nas primeiras etapas, mas foi possível observar que tais contaminantes apareciam com bem mais frequência nos controles negativos e concentrações mais baixas de óleo essencial de cravo, indicando a ação do composto contra bactérias no geral, não só limitadas à *X. citri*. Tal observação corrobora com outros estudos, que destacam o potencial e o uso de óleos essenciais, incluindo o óleo de cravo para várias outras áreas não limitadas à alimentícia (CALO et al. 2015, CHAIEB et al., 2007).

5. CONCLUSÕES

Os testes de concentração inibitória permitiram a conclusão de que o óleo essencial de cravo tem um efeito bactericida e IC de 0,7% contra células de *X. citri*, enquanto os de lavagem de limões demonstram que 5% de óleo essencial de cravo possui uma atividade de sanitização bastante próxima e até mesmo marginalmente superior à concentração de hipoclorito utilizada na indústria.

Os resultados obtidos destacam a possível aplicação do óleo essencial de cravo na substituição de compostos baseados em hipoclorito para a sanitização de frutas cítricas, sendo este uma substância menos tóxica para as pessoas e o ambiente e sem restrições no comércio de exportação. Porém é necessário mencionar a quantidade necessária de cada produto e o preço dos mesmos, sendo este, R\$ 14,25 para o pluron e R\$ 950,00 para o óleo de cravo por litro no momento da redação desse artigo, tornando o óleo de cravo um sanitizante várias ordens de magnitude mais caro do que o hipoclorito, além de necessitar de uma concentração muito maior do que o primeiro, sendo esta equivalente a 5% do mesmo em solução, o único tratamento que provou-se efetivo o suficiente no processo de sanitização.

6. REFERÊNCIAS:

- BAJPAI, V. K. et al. Potential roles of essential oils on controlling plant pathogenic bacteria *Xanthomonas* species: a review. **The Plant Pathology Journal**, Hoboken, v. 27, n. 3, p. 207 – 224, 2011.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils - A review. **Food and Chemical Toxicology**, Amsterdam, v. 46, n. 2, 446–475, 2008.
- BEHLAU, F.; BELASQUE, J. **Cancro cítrico – A doença e seu controle**. Araraquara, Brasil: Fundecitrus, 2014. 82p
- BEHLAU, F.; FONSECA, A. E.; BELASQUE JR, J. A comprehensive analysis of the Asiatic citrus canker eradication programme in São Paulo state, Brazil, from 1999 to 2009. **Plant Pathology**, Hoboken, v. 65, n. 8, p. 1390-1399, 2016.
- BEHLAU, F.; SALA, I.; BASSANEZI, R. B.; **Cancro cítrico: medidas essenciais de controle**, 3. ed, 2017. Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br/comunicacao/manual/manual-cancro-citrico/52#page/1>>. Acesso em: 20 mar 2019.
- BELASQUE JR, J.; BARBOSA, J.; FILHO, A. B. Prováveis consequências no abrandamento da metodologia de erradicação do cancro cítrico no Estado de São Paulo. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 35, n. 5, p. 314-317, 2010.
- BITANCOURT, A. A. O Cancro cítrico. **Biológico**, São Paulo, v. 23, p. 101-111, 1957.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). **INSTRUÇÃO NORMATIVA MAPA Nº 21, DE 25 DE ABRIL DE 2018**. Brasília, DF, 2018. Disponível em: <<https://www.defesa.agricultura.sp.gov.br/legislacoes/instrucao-normativa-mapa-n-21-de-25-de-abril-de-2018,1152.html>>. Acesso em: 03 abr. 2019.
- CALO, J. R. et al. Essential oils as antimicrobials in food systems – A review. **Food Control**, Amsterdam, v. 54, 111-119, 2015.
- CHAIKIB, K. et al. The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzygium aromaticum* L. Myrtaceae): a short review. **Phytother Res**, Hoboken, v. 21, n. 6 : 501–506, 2007.
- EUROPEAN UNION. OFFICIAL JOURNAL OF THE EUROPEAN UNION. **Commission Regulation (EU) 2018/605 of 19 April 2018 setting out scientific criteria for the determination of endocrinedisrupting and amending Annex II to Regulation (EC) 1107/2009**. Disponível em: <<http://data.europa.eu/eli/reg/2018/605/oj>>. Acesso em: 05 jun. 2020.
- DAS, A. K. Citrus canker – A review. **Journal Applied of Horticulture**, New Delhi, v. 5, n. 1, 52-60, 2003.

GOTTWALD, T. R.; GRAHAM, J. H.; SCHUBERT, T. S. Citrus canker: the pathogen and its impact. **Plant Health Progress**, St. Paul, v. 10, p. 32, 2002.

GRAHAM, J. H. et al. *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*: factors affecting successful eradication of citrus canker. **Molecular plant pathology**, Oxford, v. 5, n. 1, p. 1-15, 2004.

LEPAUS, B. M., ROCHA, J. S., SÃO JOSÉ, J. F. B. Organic acids and hydrogen peroxide can replace chlorinated compounds as sanitizers on strawberries, cucumbers and rocket leaves. **Food Science and Technology**, Campinas, v. 40, 242-249, 2020.

LUCAS, G. C. et al. Antibacterial activity of essential oils on *Xanthomonas vesicatoria* and control of bacterial spot in tomato. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 47, n. 3, p. 351-359, 2012.

MATTOS JR, D. et al. Citros: principais informações e recomendações de cultivo. **Instituto Agrônômico**, Cordeirópolis, v. 26, 2005.

NEVES, M. F., & TROMBIN, V. G. **Anuário da Citricultura 2017**, 2017. Disponível em: <
http://www.citrusbr.com/download/biblioteca/CitrusBR_Anuario_2017_alta.pdf>.
Acesso em: 21 mar 2019

PALOSCHI, A. **Bactericidas alternativos e redução tempo de exposição para a descontaminação de frutos de citros em pós-colheita contra *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, agente causal do cancro cítrico**. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) - Fundo de Defesa da Citricultura, Araraquara, p. 33 , 2019.

PAWAR, V. C.; THAKER, V. S. *In vitro* efficacy of 75 essential oils against *Aspergillus niger*. **Mycoses**, Hoboken, v. 49: 316 –323, 2006.

PRASHAR, A.; LOCKE, I. C.; EVANS, C. S. Cytotoxicity of clove (*Syzygium aromaticum*) oil and its major components to human skin cells. **Cell Prolif**, Hoboken, v. 39, 241–248, 2006.

QADRI, O. S.; YOUSUF, B.; SRIVASTAVA, A. K. Fresh-cut fruits and vegetables: Critical factors influencing microbiology and novel approaches to prevent microbial risks — A review. **Cogent Food & Agriculture**, Milton, v. 1, 1121606, 2015

SANTOS, C. F. de O. **Cancro cítrico: ocorrência no Brasil e seu controle**. Citricultura Brasileira. Campinas, Brazil: Fundação Cargill, 787–823, 1991.

SCHAAD, N. W. et al. Emended classification of xanthomonad pathogens on citrus. **Systematic and Applied Microbiology**, Amsterdam, v. 29, 690–695, 2006.

SCHUBERT, T. S. et al. Meeting the challenge of Eradicating Citrus Canker in Florida—Again. **Plant disease**, St. Paul, v. 85, 340-356, 2001.

Select Committee on GRAS Substances (SCOGS) Opinion: Clove Bud Extract, Clove Bud Oil, Clove Bud Oleoresin, Clove Leaf Oil, Clove Stem Oil, Eugenol. **U.S. Food & Drug Administration**. Disponível em: <<http://wayback.archive-it.org/7993/20171031061749/https://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/SCOGS/ucm261254.htm>>. Acesso em: 11 out 2020.

SHAKIL, N. A. et al. Antibacterial activities of essential oils and their constituents against growth of *Xanthomonas* species. **Annals of Plant Protection Sciences**, New Delhi, v. 20, 195-200, 2012.

ZAMUNER, C. F. C. et al. A cinnamaldehyde-based formulation as an alternative to sodium hypochlorite for post-harvest decontamination of citrus fruit. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, 2020.