



ACÇÃO IN VITRO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia alba* NO CONTROLE DE *Fusarium sp.* DO ABACAXI

Raquel E. L. Assunção¹; Thiago F. L. Loeser²; Elton L. Borges³; Joana L. B. Sitônio⁴; Francisco B. P. Júnior⁵; Sofia S. F. B. Rodrigues⁶.

¹Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Pernambuco (Campus Recife)

²Laboratório de Síntese Orgânica e Aplicações Biotecnológicas - LASOAB/ DQF (UFPE)

³Laboratório de Síntese Orgânica e Aplicações Biotecnológicas - LASOAB/ DQF (UFPE)

⁴Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Pernambuco (Campus Recife)

⁵Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Pernambuco (Campus Recife)

⁶Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Pernambuco (Campus Recife)

Palavras-Chave: Antifúngica, *Fusarium*, planta medicinal.

Introdução

Os óleos essenciais, produtos vegetais extraídos de diversas partes das plantas por processos específicos, são comumente separáveis por arraste de vapor d'água. Constituem um dos mais importantes grupos de matérias primas para várias indústrias, especialmente as de perfumaria, alimentos e farmacêutica. Estes óleos, normalmente, são usados “*in natura*”, pois as suas propriedades organolépticas estão associadas a um conjunto de componentes, que formam o “*bouquet*” de cada óleo em particular. Na maioria das vezes, apresentam aroma agradável, sendo metabólitos secundários de composição química complexa e quase sempre apresentam atividade biológica (Bakkali *et al.* 2008; Silva *et al.* 2021).

Lippia alba (Mill.) NEBr. ex Britton & P. Wilson, popularmente conhecida como erva-cidreira e/ou falsa melissa, é uma planta aromática pertencente à família Verbenaceae e amplamente distribuída em diversas regiões tropicais e subtropicais das Américas (Barbosa *et al.*, 2023). O gênero *Lippia alba* foi caracterizado quimicamente em quimiotipos, que corresponde a plantas com o mesmo fenótipo, mas com variações na composição química devido à variabilidade genética e são determinados de acordo com as concentrações majoritárias de substâncias especificadas (Simões *et al.*, 2003., Barbosa *et al.*, 2023). Desta maneira, o uso de óleos essenciais para o desenvolvimento de fitoprodutos favorece a química verde, segmento da química que busca processos alternativos que gerem menos poluição e menos resíduos, e apresentem alta eficiência energética, além de valorizar o uso de matérias-primas renováveis e gerar produtos biodegradáveis e seguros para a sociedade e o meio ambiente (Júnior *et al.*, 2024).

O gênero *Fusarium* abrange várias espécies fúngicas capazes de causar doenças em plantas, como podridões de raízes, caules e frutos, além de murchas vasculares. Este gênero possui ampla distribuição geográfica, ocorrendo em todas as regiões do mundo (Poletto *et al.*, 2006). Algumas espécies são particularmente comuns no solo, onde podem persistir sob a forma de clamidósporos ou hifas, enquanto outras produzem conídios disseminados pelo ar, colonizando frequentemente ramos, folhas, inflorescências e frutos (Edel, 1997; Ventura, 1999).

Nesse sentido, a proposição de novos produtos naturais que promovam o controle de importantes doenças em frutos poderá auxiliar em programas de Manejo Integrado de Pragas (MIP), contribuindo para a redução do uso de defensivos agrícolas, a mitigar os impactos ambientais associados a esses produtos e a prolongar a conservação dos frutos. Diante do exposto, a presente pesquisa teve como objetivo avaliar a atividade antifúngica do óleo essencial de *Lippia alba* sobre o fungo *Fusarium sp.*

Material e Métodos

Material vegetal e extração do óleo essencial

O processo metodológico teve início com a colheita do material vegetal. Posteriormente, com as partes aéreas da planta seca, passou-se por uma leve trituração em um liquidificador, sem a presença de água. Assim, foi realizado o processo de destilação por arraste a vapor d'água. A extração foi feita utilizando um balão de fundo redondo de 5000 mL, com 200g de material vegetal seco, para 3 litros de água destilada. O óleo essencial foi acondicionado em um frasco de vidro âmbar.

Análise dos constituintes químicos do óleo essencial

Os constituintes do óleo essencial foram identificados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-MS). Os dados oriundos deste processo baseiam-se na avaliação do tempo de retenção das substâncias e percentagem da área de cada pico cromatográfico. Desse modo, por meio da comparação dos espectros de massa obtidos com as bases armazenadas no banco de dados da biblioteca Wiley/NBS, tal como as informações disponíveis na literatura científica, foi possível determinar os compostos do óleo essencial em estudo.

A técnica de cromatografia gasosa foi realizada em equipamento Hewlett-Packard/Agilent, Modelo 5890 (Series II), com detector de ionização de chamas. A técnica de cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa foi realizada em equipamento de Modelo Finnigan GCQ Mat, tipo quádruplo-íon trap.

O óleo passou por uma análise dos constituintes químicos por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas no Laboratório de Síntese Orgânica e Aplicações Biotecnológicas – LASOAB - DQF/UFPE.

Isolado fúngico

O isolamento e a caracterização morfológica do isolado fúngico foram realizados no Laboratório de Microbiologia do CPTECS do IFPE - *campus* Recife.

O isolado fúngico *Fusarium* sp. obtido do abacaxi, foi utilizado como microrganismo teste. Tal isolado foi mantido em meio Batata-dextrose-ágar (BDA), a uma temperatura de 27°C, sendo utilizado para os ensaios repiques de 24 horas em BDA incubados a 27°C em uma estufa microprocessada de cultura (Quimis, Q316M4). No estudo da atividade antimicrobiana, utilizou-se discos de micélio de *Fusarium* com diâmetro de aproximadamente 9 mm.

Bioensaios

Foram preparados tubos de ensaio esterilizados e, em cada um deles foram adicionados, separadamente, 25, 50, 75 e 100 µL do óleo, completando-se água destilada esterilizada até atingir o volume de 3,1 mL, sendo agitado por um minuto, usando-se o aparelho Vortex (Arsec, T5200).

Os ensaios de avaliação da atividade antifúngica do óleo essencial foram realizados pelo método de difusão em meio sólido em placas de Petri. Sob tal ótica, foram preparados 550 ml de meio BDA + antibiótico (cloranfenicol) e distribuídos 110 ml para cada um dos cinco frascos de vidro borossilicato de 250ml. A cada frasco com meio foi adicionado as soluções do óleo preparadas, obtendo as concentrações finais do óleo 0,23 µL/ml, 0,46 µL/ml, 0,69 µL/ml e 100 µL/ml (quadro 1). Em seguida, verteu-se aproximadamente 15mL do meio

BDA com as concentrações em placas de Petri, com cinco repetições para cada tratamento. O grupo controle não teve acréscimo de óleo ao meio BDA.

Quadro 1 - Proporções dos componentes das emulsões de óleo essencial em diferentes concentrações, IFPE, 2024.

Concentração da emulsão ($\mu\text{L}/\text{mL}$)	Volume do óleo essencial (μL)	Volume de água purificada estéril (μL)	Volume final da emulsão (mL)
0 (Testemunha)	0	3100	3,1
0,23	25	3075	3,1
0,46	50	3050	3,1
0,69	75	3025	3,1
0,92	100	3000	3,1

Após solidificação do ágar, as placas de Petri assim preparadas foram inoculadas com discos de micélio de 9 mm de diâmetro, para o fungo *Fusarium sp.*, em cada concentração desejada do óleo essencial testado. O sistema foi incubado por 6 dias a 27°C em estufa microprocessada de cultura. Desta forma, durante este período de tempo, foram realizadas leituras diárias dos diâmetros (cm) das colônias, nos sentidos horizontais e verticais de cada placa, para tomar a média das leituras como resultado.

O Percentual de Inibição do Crescimento Micelial (PIC) foi determinado utilizando-se os dados do diâmetro micelial do último dia de avaliação (Eq. (1)), onde **CTes** é a média diâmetro das colônias testemunhas, e **CTrat** o diâmetro médio das colônias nas placas com tratamento:

$$\text{Equação 1: } PIC = [(CD - TD) / CD] \times 100 \text{ (Eq. 1)}$$

Resultados e Discussão

A extração do óleo essencial da erva cidreira apresentou um rendimento de 1,1%, a partir de 200g do material vegetal, resultando em 2,2 mL de óleo essencial. As Figuras 1, 2, 3 e 4 apresentam os cromatogramas do óleo essencial de erva cidreira e dos principais constituintes do óleo. Diversos estudos abordam as diferenças nos componentes majoritários do óleo essencial de *Lippia alba* e relatam a ocorrência de quimiotipos diferentes para essa espécie. Os referidos quimiotipos foram designados de acordo com seus respectivos constituintes majoritários: mircenocitral (quimiotipo I), limoneno-citral (quimiotipo II) e limoneno-carvona (quimiotipo III). A análise de CG-MS mostra que a erva cidreira em estudo representa o quimiotipo II (limoneno-citral), sendo estes os seus componentes majoritários (Jannuzzi et al., 2010).

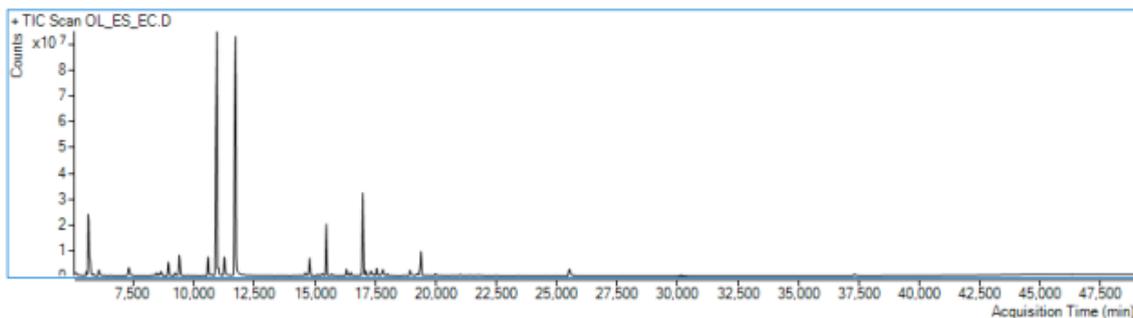


Figura 2: Espectro de Massas do composto Neral (RT: 10.9409 min). UFPE, 2024.

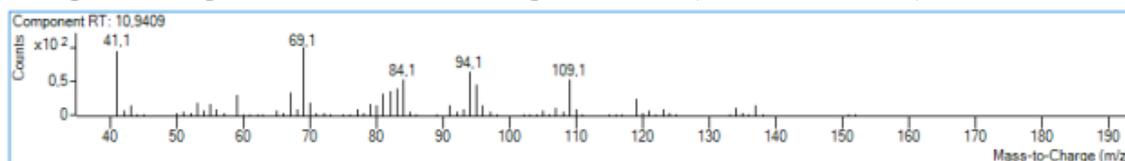


Figura 3: Espectro de Massas do composto Citral (RT: 11.7233 min). UFPE, 2024.

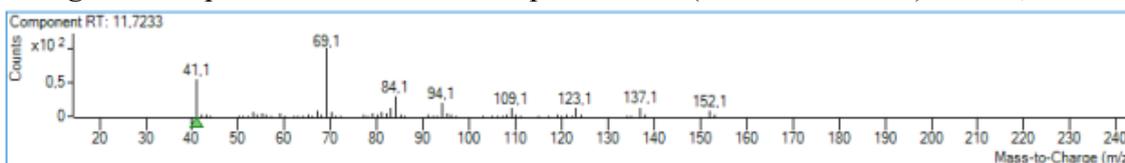
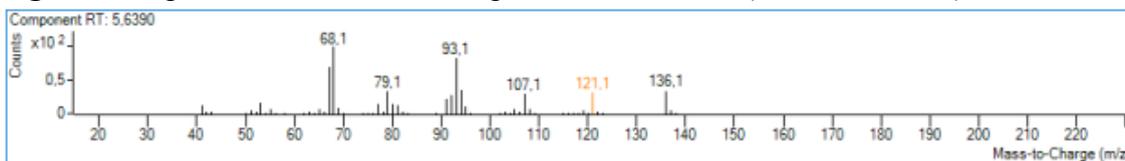


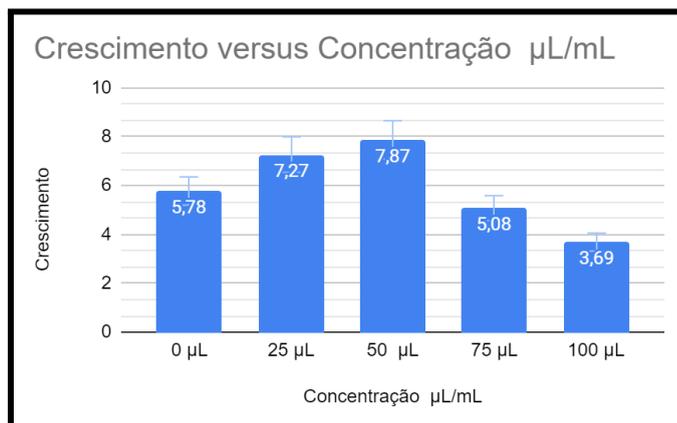
Figura 4: Espectro de Massas do composto D-Limoneno (RT: 5.6390 min). UFPE, 2024.



Foi observado que o fitopatógeno *Fusarium sp* (figura 7), também foi inibido nas concentrações de 75 e 100 μL de óleo testado. Entretanto, para as concentrações de 25 e 50 μL , o óleo quando associado ao fungo apresentou um efeito sinérgico no crescimento micelial, resultando em um aumento significativo na taxa de crescimento do micélio, além do que seria esperado no branco (fungos sem óleo). A efetividade de óleos essenciais de *Lippia alba* sobre fungos fitopatogênicos tem sido demonstrada na literatura (PEIXOTO et al. 2018, SILVA et al, 2021), sendo uma tendência mundial o uso dessas substâncias no controle de doenças pós-colheita em frutos.

Pesquisas científicas têm destacado o potencial das espécies do gênero *Lippia* como fonte de compostos bioativos com atividade antimicrobiana. Por exemplo, em um estudo realizado por Lima et al. (2019), extratos de *Lippia* foram avaliados quanto à atividade antifúngica contra *Candida spp.*, demonstrando eficácia significativa contra diferentes cepas, incluindo *Candida albicans*. Esses resultados corroboram com as descobertas de Nascimento et al. (2017), que investigaram o óleo essencial de *Lippia gracilis* e observaram forte atividade antifúngica contra cepas de *Candida*, ressaltando o potencial terapêutico desses compostos.

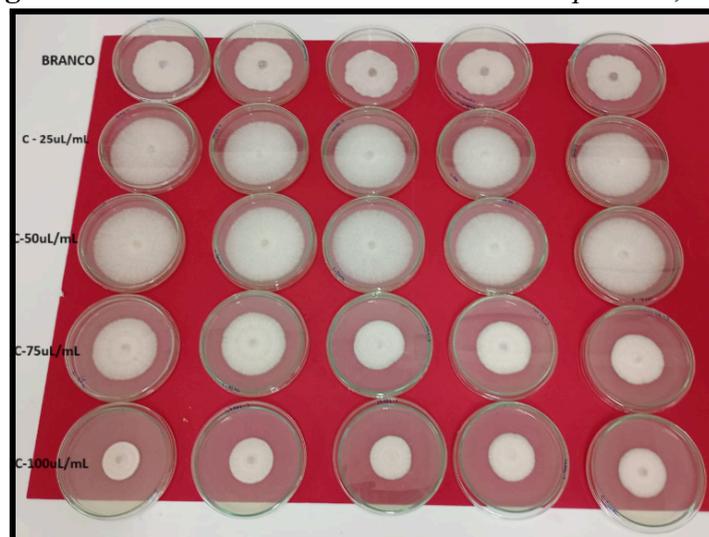
Figura 5. Efeito Inibitório do óleo essencial (*L. alba*) sobre o fungo *Fusarium sp*. IFPE,2024*.



* As linhas verticais na parte superior das barras correspondem aos respectivos erros-padrões da média de diâmetro para cada tratamento.

Logo em sequência (figura 6), expõe-se o processo da atividade antifúngica, na qual apresenta-se, em ordem crescente de cima para baixo, o branco e as concentrações do óleo essencial 25,50,75 e 100µL/mL.

Figura 6. Crescimento micelial de *Fusarium sp.* IFPE,2024.



As linhas verticais na parte superior das barras correspondem aos respectivos erros-padrão da média de diâmetro para cada tratamento.

Conclusões

Depreende-se que o óleo essencial testado demonstrou uma capacidade inibitória eficaz para as maiores concentrações de óleo essencial sobre o crescimento micelial do fungo *Fusarium sp.*, porém, não tão efetiva nas concentrações iniciais para o controle inibitório.

Deste modo, esses resultados apontam para o potencial do óleo essencial de erva-cidreira como uma alternativa natural aos fungicidas tradicionais, especialmente em tratamentos no qual o controle de *Fusarium* é necessário. Contudo, mais estudos são necessários, principalmente, em campo para validar e expandir os resultados obtidos, promovendo uma compreensão mais abrangente do potencial do óleo essencial de *Lippia alba* na agricultura.

Agradecimentos

Agradeço ao IFPE pela concessão da bolsa PIBIC Técnico.

Referências

1. BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, v. 46, p. 446–475, 2008.
2. BATIHA, G, El-Saber, et al. *Syzygium aromaticum* L. (Myrtaceae): Traditional Uses, Bioactive Chemical Constituents, Pharmacological and Toxicological Activities. **Biomolecules**, v. 10, p. 202, 2020.
3. BARBOSA, F.L.Freitas et al. In vitro anthelmintic activity of *Lippia alba* essential oil chemotypes against *Haemonchus contortus*. **Experimental Parasitology**, Volume 244, January, 2023.
4. EDEL, V.; STEINBERG, C.; GAUTHERON, N.; ALABOUVETTE, C. Populations of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* associated with roots of four plant species compared to soilborne populations. **Phytopathology**, Cornell, v.84, n.7, p.693-697, 1997.
4. JÚNIOR, S.Q. Antônio et al. Molecular modelling and anticholinesterase activity of the essential oil from three chemotypes of *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. ex Britton & P. Wilson (Verbenaceae). *Heliyon*, v.10, n. 8, 2024.
5. LIMA, I. O., OLIVEIRA, R. A. G., LIMA, E. O., FARIAS, N. P., SOUSA, F. B. M., MENESES, L. N.,RIBEIRO-FILHO, J. Antifungal activity of *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) essential oil against *Candida* spp. **Brazilian Journal of Biology**, v.79, n.2, 304-311, 2019.
6. NASCIMENTO, G. G. F., LOCATELLI, J., FREITAS, P. C.,SILVA, G. L. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.31, n.4, 247-256, 2017.
7. PEIXOTO, M. G. et al. Activity of essential oils of *Lippia alba* chemotypes and their major monoterpenes against phytopathogenic fungi. **Biosci. J.**, v. 34, n. 5, p. 1136-1146, 2018.
8. POLETTO, I.; MUNIZ, M.F.B.; CECONI, D.E.; SANTIN, D.; WEBER, M.N.D.; BLUME, E. Zoneamento e identificação de *Fusarium* spp. causadores de podridão de raízes em plantios de erva-mate (*Ilex paraguariensis* a. St.-Hil.) na região do Vale do Taquari - RS. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v.16, n.1, p.1-10, 2006.
9. SILVA, J. M. D.; SILVA, M. L. T.; LIMA, J. S.; RAPOSO, M. J. ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DA ERVA CIDREIRA (*Lippia alba*) FRENTE AO FUNGO CANDIDA ALBICANS: REVISÃO INTEGRATIVA. **Ciências Biológicas e de Saúde Unit**, v. 7, n. 1, p. 193-202, 2021.



10. SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C.M.O. et al. (Eds.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2003. p.467-95.
11. VENTURA, J.A. Taxonomia de *Fusarium* e seus segregados: I – História, meios e procedimentos de cultivo. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 7, p. 271-297, 1999.