

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Melaleuca alternifolia* SOBRE *Colletotrichum musae*

**Maria Alice Brandão Silva¹, Aldino Neto Venancio², Armanda Aparecida Júlio¹,
Poliana Lemes de Souza¹, Gustavo Rodrigues de Souza³, Luciano Menini¹.**

¹Instituto Federal do Espírito Santo – Campus de Alegre/Departamento de Química, BR 482, Rodovia Cachoeiro/Alegre, Km 47, Distrito de Rive - 29520-000- Alegre-ES, Brasil, alice.gestaoambiental@gmail.com, armandaj@gmail.com; polianalemesazevedo@gmail.com; lmenini@ifes.edu.

²Universidade Federal de Viçosa – Campus de Viçosa/Departamento de Química, Avenida P. H. Rolfs, s/n, Campus Universitário, 36570-900 - Viçosa-MG, Brasil, aldinovenancio@gmail.com

³Universidade Federal do Espírito Santo/Departamento de Química e Física, Alto Universitário s/n, Guararema, 29500-000, Alegre-ES, Brasil, gustavorodriguesdesouza2@gmail.com.

Resumo:

A banana (*Musa* spp.) é alvo de diferentes fitopatógenos, como *Colletotrichum musae*. Para o controle desse patógeno são usados fungicidas sintéticos, que podem causar desequilíbrios ambientais e microrganismos resistentes. Por isso, o uso de óleos essenciais (OE) têm sido uma boa alternativa ao uso de produtos agrícolas convencionais. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antifúngica do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* sobre *C. musae*. A caracterização química do OE foi realizada por CG-DIC e CG-EM. Para o teste *in vitro*, preparou-se uma solução estoque contendo OE, SPAN 85 e água, além dos controles negativo e positivo. Foram aplicados 5 tratamentos a base de OE, cujas concentrações variaram de 1,5 a 5,5 µL/mL. Os principais compostos identificados foram terpinen-4-ol, γ-Terpinene e α-Terpineno. A partir da concentração de 4,5 µL/mL, o fungo foi 100% inibido. A CI₅₀ foi estimada em 2,63 µL/mL. Resultados como esse mostram o potencial promissor do uso do óleo essencial de *M. alternifolia* para o controle de *C. musae*,

Palavras-chave: Agricultura sustentável. *Musa* spp. Antracnose. Óleo essencial.

Área do Conhecimento: Engenharia Agrônoma – Agroecologia.

Introdução

A banana (*Musa* spp.) é uma importante commodity agrícola, sendo uma das frutas mais produzidas e comercializadas no mundo. Seu maior índice de produção está na Ásia, América Latina e África (FAO, 2023). O Brasil, em 2021, produziu 6.811.374 toneladas, com uma área colhida de 453.273 hectares (IBGE, 2021), o que possibilitou a geração de emprego e renda para inúmeras famílias (FAO, 2023).

Apesar de sua importância econômica e social, a banana é alvo de diferentes fitopatógenos, como *Colletotrichum musae*, fungo que causa a antracnose, doença responsável por perdas no pós-colheita em frutos (SILVA JÚNIOR, 2018). O controle de doenças no pós-colheita, na maioria das vezes, é feito com produtos químicos sintéticos, que apesar de serem importes para agricultura, se usados em excesso, pode favorecer o desenvolvimento de patógenos resistentes, além de comprometer o meio ambiente e saúde humana (EL KHETABE *et al.*, 2022; RODRIGUES *et al.*, 2021).

Nesse cenário, surgem as propostas de substituir ou alternar o manejo com tais defensivos por métodos alternativos de controle (KALHORO *et al.*, 2022). O uso de produtos de origem vegetal, como o óleo essencial (OE) da *Melaleuca alternifolia* vem atraindo a atenção da comunidade científica, pois são capazes de inibir o desenvolvimento de importantes fitopatógenos da agricultura (PEIXOTO *et al.*, 2023; CHIDI, BOUHOUDAN, KHADDOR, 2020).

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial antifúngico *in vitro* do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*, sobre o fungo *Colletotrichum musae*.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Metodologia

O OE de *Melaleuca alternifolia* foi adquirido de forma comercial (BioEssencia; Lote L200731). A caracterização química foi realizada através de análises por cromatografia gasosa com detector de ionização em chamas (CG-DIC) (Shimadzu GC-2010 Plus) e por cromatografia gasosa acoplada ao detector de espectrometria de massas (CG-EM) (Shimadzu QPMS-2010). A identificação dos componentes do OE foi realizada pela comparação dos espectros de massas com a espectroteca disponível no CG-EM com índices de retenção LTPRI, o qual foi calculado por meio do cromatograma obtido da injeção da mistura de n-alcenos no mesmo método utilizado para injetar o óleo. O índice de retenção calculado foi comparado com o índice de retenção descrito na literatura (ADAMS, 2007).

Obtenção do isolado e Teste biológico

O fungo *C. musae* cepa CCF 243 foi obtido do banco de fungos do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa – MG. Sete dias antes do teste, discos de micélio do isolado fúngico foram repicados para placas de Petri contendo meio de cultura BDA e incubados a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, sob fotoperíodo de 12 horas claro/escuro, com umidade relativa de $70 \pm 10^\circ\text{C}$, em estufa do tipo BOD.

Para o teste biológico, preparou-se uma solução estoque contendo 5% OE, água destilada e 1% de emulsificante Span 85, a qual foi misturada em cuba de ultrassom marca Cristófoli, na frequência de 42 kHz. As concentrações utilizadas foram 1,5; 2,5, 3,5, 4,5 e 5,5 $\mu\text{L/mL}$, as quais foram incorporadas ao meio de cultura BDA, que continha também amoxicilina, que posteriormente foram vertidas em placas de Petri de 8,0 centímetros de diâmetro. Cada tratamento contou com 5 repetições. Como controle negativo, foi preparada uma solução contendo 1% de SPAN 85 e água destilada. Como controle positivo, foi utilizado o fungicida comercial Tecto® SC, na concentração de 0,92 $\mu\text{L/mL}$, adaptado à recomendação do fabricante. O procedimento foi realizado dentro da câmara de fluxo laminar horizontal. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado.

Após a solidificação do meio com os respectivos tratamentos, um disco de micélio do fungo com 4 milímetros de diâmetros foi adicionado ao centro de cada placa. Posteriormente, foram vedadas com plástico filme e incubadas em estufa BOD com temperatura $25 \pm 1^\circ\text{C}$, sob período de 12 horas claro/escuro e umidade relativa de $70 \pm 10^\circ\text{C}$ durante 5 dias. Os resultados obtidos foram avaliados por meio de duas medições diametralmente opostas com o auxílio de um paquímetro digital calibrado em milímetros.

Para obtenção da concentração inibitória de 50% (CI_{50}), aplicou-se a regressão linear, ajustando as escalas logarítmicas das concentrações dos óleos essenciais. Os dados referentes à inibição do crescimento micelial foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e as diferenças significativas observadas pelo teste F ($p < 0,01$) foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), usando o programa R Studio versão 4.3.1.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Resultados

A tabela 1 mostra a composição química do OE de *M. alternifolia*, cujos nove compostos foram identificados.

Tabela 1. Identificação da composição do óleo essencial de *M. alternifolia* por comparação dos índices de retenção e pelo CG-EM^[a].

TR (minutos)	IR _C ^[b]	IR _T ^[c]	Composto	Área Relativa (%) ^[d]
8,837	936	932	α-Pineno	2,38
12,399	1013	1014	α-Terpineno	9,84
12,663	1019	-	NI ^[e]	2,96
12,934	1024	-	NI ^[e]	3,26
14,405	1056	1054	γ-Terpinene	22,25
15,684	1084	1086	Terpinoleno	3,57
19,927	1176	1174	Terpinen-4-ol	48,51
20,349	1185	1186	α-Terpineol	3,29
31,222	1435	1439	Aromadendrene	1,12
33,522	1492	1496	Ledene	1,44
34,602	1517	1522	δ-Cadinene	1,4

[a] Os compostos foram identificados por índice LTPRI (CG-DIC) e espectrometria de massa (CG-EM) usando coluna Rtx®-5MS. [b] Índice de retenção calculado a partir de dados obtidos por amostragem de n-alcenos saturados (C7-C40). [c] Índice de retenção tabulado (Adams, 2007 e NIST, 2011). [d] Foram identificados compostos com áreas relativas > 1%. [e] Composto não identificado.

Fonte: Os autores (2023).

Os resultados que associam as concentrações do OE de *M. alternifolia* estão representados na Tabela 2 e Figura 1.

Tabela 2. Efeito dos tratamentos com diferentes concentrações do OE de *M. alternifolia* sobre o crescimento micelial do *C. musae* ^[a].

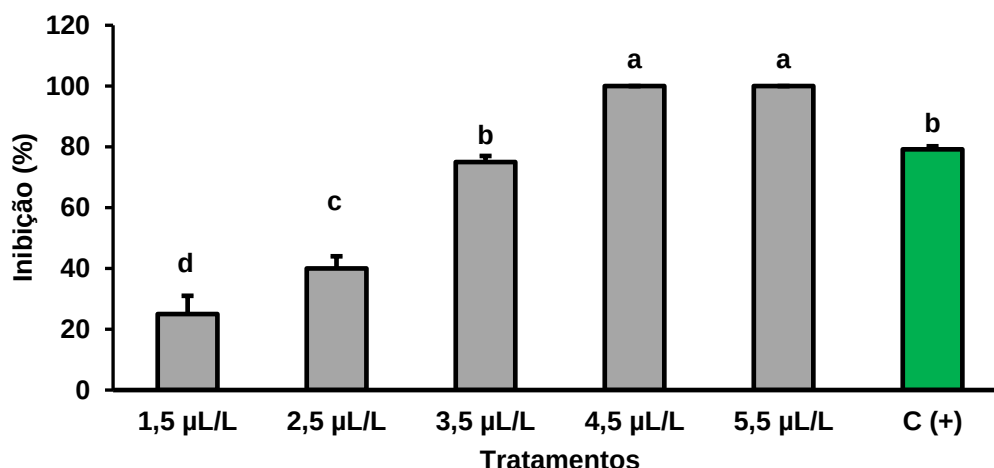
Concentração (μL/mL)	Inibição (%)
1,5	25 ± 6 d
2,5	40 ± 4 c
3,5	75 ± 2 b
4,5	100 ± 0 a
5,5	100 ± 0 a
CP ^b	79 ± 1 b
CI ₅₀	2,63 μL/mL

^a Médias de inibição ± desvio padrão. As médias seguidas pelas mesmas letras não se diferenciam entre si, teste de Tukey (p<0,05). ^b Controle positivo fungicida comercial.

Fonte: Os autores (2023).

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Figura 1. Influência do OE de *M. alternifolia* sobre a inibição do crescimento micelial do *C. musae*^[a].



^a As médias seguidas pelas mesmas letras não se diferenciam entre si, teste de Tukey ($p < 0,05$).

Fonte: Os autores (2023).

Discussão

Foram identificados nove compostos no OE de *M. alternifolia*, sendo os majoritários o Terpinen-4-ol (48,51%), γ -Terpinene (22,25%) e α -Terpineno com (9,84%). Mesmo sendo a mesma espécie botânica, o tipo e porcentagem de compostos químicos presentes em OE pode variar (BOROTOVÁ *et al.*, 2022; BRUN *et al.*, 2019) devido as características edafoclimáticas de sua região de origem, genética, idade e método de secagem da planta (GUNASENA *et al.* 2022, KALHORO *et al.*, 2022; KUMARI *et al.*, 2021).

O OE de *M. alternifolia* mostrou potencial antifúngico sobre *C. musae*, nas diferentes concentrações avaliadas. A partir da concentração de 4,5 $\mu\text{L/mL}$, o crescimento micelial foi inibido em 100%. A CI_{50} foi estimada em 2,63 $\mu\text{L/mL}$. Nessas condições (*in vitro*), as maiores concentrações do OE *M. alternifolia* foram efetivas para inibir o crescimento micelial do fungo. Na concentração de 3,5 $\mu\text{L/mL}$ do OE de *M. alternifolia* apresentou 75% de inibição para o fungo, similar ao fungicida comercial. Há uma grande vantagem em usar o OE para controlar fitopatógenos comparados aos fungicidas convencionais, visto que produtos à base de materiais vegetais podem ser menos agressivo ao meio ambiente e diminuir a incidência de patógenos resistentes (EL KHETABE *et al.*, 2022; RODRIGUES *et al.*, 2021).

A atividade antifúngica do OE de *M. alternifolia* também já foi avaliada sobre *Fusarium oxysporum* e os resultados foram promissores. Nas concentrações de 1,5 $\mu\text{L/mL}$ o óleo inibiu 100% o crescimento micelial do fungo responsável por causar murcha vascular na cultura do tomate (PEIXOTO *et al.*, 2023).

Outra espécie fitopatogênica na qual o OE de *M. alternifolia* interferiu no desenvolvimento foi a *Alternaria solani*. Na concentração de 2500 $\mu\text{L/L}$ o crescimento micelial do fungo foi inibido em cerca de 56%, apesar de menor que o fungicida comercial o tratamento com OE de melaleuca se mostrou efetivo, pois além de interferir no desenvolvimento micelial, também aumentou a atividade de enzimas de defesa do tomate.

O OE de *M. alternifolia* inibiu o crescimento micelial e a produção de micotoxinas das espécies fúngicas *Penicillium verrucosum* e *P. griseofulvum*. A inibição do micélio foi expressiva a partir da concentração de 0,16% e totalmente inibida na concentração de 2,75% do OE de *M. alternifolia* em ambas espécies de *Penicillium* (CHIDI, BOUHOUDAN, KHADDOR, 2020).

Resultados como os expostos mostram o potencial promissor do uso de OE para o manejo de doenças que afetam culturas agrícolas de grande importância econômica (PEIXOTO *et al.*, 2023; HENDGES, 2021 e CHIDI, BOUHOUDAN, KHADDOR, 2020).

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Conclusão

A caracterização química do OE de *M. alternifolia*, mostrou que 80,6% dos seus compostos majoritários foram representados por terpinen-4-ol, γ -Terpinene e α -Terpineno. No ensaio biológico, as concentrações de 4,5 e 5,5 $\mu\text{L/mL}$ inibiram 100% o crescimento micelial do *C. musae*. Além disso foi possível determinar a CI_{50} do óleo, estimada em 2,63 $\mu\text{L/mL}$.

Pode-se concluir, com esse trabalho, que o OE de *M. alternifolia* possui atividade antifúngica sobre *C. musae*, fungo que causa a antracnose na banana (*Musa spp.*) e seu uso pode contribuir para o desenvolvimento de uma agricultura sustentável.

Referências

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. 4° ed. Linois, Allured Publishing Corporation, EUA, Carol Stream, 2007.

BOROTOVÁ, P. *et al.* Chemical and Biological Characterization of *Melaleuca alternifolia* Essential Oil. **Plants**, v. 11, p. 558, 2022.

BRUN, P. *et al.* *In vitro* Antimicrobial Activities of Commercially Available Tea Tree (*Melaleuca alternifolia*) Essential Oils. **Curr. Microbiol.**, v. 76, p. 108-116, 2019.

CHIDI, F.; BOUHOUDAN, A.; KHADDOR, M. Antifungal effect of the tree essential oil (*Melaleuca alternifolia*) Against *Penicillium griseofulvum* and *Penicillium verrucosum*. **J King Saud Univ. Sci.**, v. 32, p. 2041-2045, 2020.

FAO. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Disponível em: <https://www.fao.org/markets-and-trade/commodities/bananas/en/>. Acesso em: 9 ago. 2023.

EL KHETABI, A. *et al.* Role of plant extracts and essential oils in fighting against postharvest fruit pathogens and extending fruit shelf life: A review. **Trends in Food Sci. Technol.**, p. 402-417, 2022.

GUNASENA, M. T. G. *et al.* Phytochemicals Profiling, Antimicrobial Activity and Mechanism of Action of Essential Oil Extracted from Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe cv. Bentong) against *Burkholderia glumae* Causative Agent of Bacterial Panicle Blight Disease of Rice. **Plants**, v.11, n. 11, p. 1466, 2022.

HENDGES, C. *et al.* Antifungal activity and control of the early blight in tomato through tea tree essential oil. **Crop Prote.**, v. 148, p. 105728, 2021.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Índice Brasileiro de Geografia e Geografia e estatística – Produção de Banana**. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/banana/br>. Acesso em 9 de ago. 2023.

KALHORO, M. T. *et al.* Fungicidal properties of ginger (*Zingiber officinale*) essential oils against *Phytophthora colocasiae*. **Sci. Rep.**, v. 12, n. 1, p. 1-10, 2022.

KUMARI, A. *et al.* Impact of Different Drying Techniques on Quality Traits of Ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) Rhizomes. **Inter. J. Env. Climat. Chang.**, v.11, n. 12, p. 30-37, 2021.

PEIXOTO, P. M. C. Fungicide potencial of citronella and tea tree essential oils against tomato cultivation's phytopathogenic fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* and analysis of their chemical composition by GC/MS. **Nat. Prod. Res.**, p.1-6, 2023.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

RODRIGUES, J. P. *et al.* Current technologies to control fungal diseases in postharvest papaya (*Carica papaya* L.). **Biocatal. Agrc. Biotechnol.**, v. 36, p. 102128, 2021.

SILVA *et al.* Draft genome assembly of *Colletotrichum musae*, the pathogen of banana fruit. **Data Brief**, v. 17, p. 256-260, 2018.

ZAKARIA, L. Diversity of *Colletotrichum* Species Associated with Anthracnose Disease in Tropical Fruit Crops — A Review. **Agriculture**, v.11, p. 297, 2021.

Agradecimentos

Ao Instituto Federal do Espírito Santo (IFES) - Campus de Alegre, pela disponibilidade da infraestrutura, à Universidade Federal do Espírito Santo – Campus de Alegre, pela disponibilidade em realizar as análises por CG-EM, à Universidade Federal de Viçosa (UFV) – Campus de Viçosa, pela doação do isolado de *C.musae*, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo (FAPES) pelo apoio financeiro.