

## **Atividade antifúngica do óleo essencial de *Lippia alba* em *Aspergillus welwitschiae***

<sup>1</sup> Zuleide Silva de Carvalho, <sup>1</sup> Rosimar Neri de Souza, <sup>1</sup> Jamile de Jesus Moreira, <sup>1</sup> Simone Teles,  
<sup>2</sup> José Alberto Pereira, <sup>1</sup> Franceli da Silva

<sup>1</sup> Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Rua Rui Barbosa, n. 710, Centro, CEP 44380.000, Cruz das Almas, BA, Brasil. E-mails: zuleidescarvalho@gmail.com, rosytica4@gmail.com, jamiles2@msn.com, telessimone@gmail.com, franceli.silva@gmail.com

<sup>2</sup> Instituto Politécnico de Bragança, Escola Superior Agrária, *Campus* Santa Apolónia, n. 253, CEP 5300-252, Bragança, Portugal. E-mail: jpereira@ipb.pt

**Resumo:** Dentre os diversos compostos do metabolismo secundário vegetal os óleos essenciais apresentam grande potencial antimicrobiano. Estudos têm avaliado sua ação no controle de pragas e doenças. Neste contexto para validar essa propriedade, a atividade antifúngica do óleo essencial de *Lippia alba*, foi avaliado no ensaio *in vitro* em *Aspergillus welwitschiae*. Foram utilizados os óleos essenciais de dois acessos de *L. alba* (L01 e L02), extraídos de folhas de plantas com a idade de 30, 60 e 90 dias após o transplântio (DAT). Os componentes majoritários identificados para o acesso L01 foram carvona, limoneno e germagreno D e para o acesso L02 o-cimeno, óxido de cariofileno,  $\alpha$ -citrál e  $\beta$ -citrál. As porcentagens dos compostos majoritários variaram significativamente em função da idade da planta. Os acessos mostraram capacidade de inibição do crescimento micelial de *A. welwitschiae*, reduzindo a velocidade de crescimento e produção de esporos. Os resultados deste estudo indicam que os óleos essenciais de *L. alba* tem potencial como agentes antifúngicos frente a *A. welwitschiae*.

**Palavras chave:** Atividade antimicrobiana, Metabolismo secundário, Cidreira.

### **Antifungal activity of the essential oil from *Lippia alba* against *Aspergillus welwitschiae***

**Abstract:** Among the various compounds found in plant secondary metabolism, essential oils have shown significant antimicrobial potential. Studies have assessed their action in pest and disease control. In this context, to validate this property, the antifungal activity of the essential oil from *Lippia alba* was evaluated in an *in vitro* assay against *Aspergillus welwitschiae*. The essential oils from two accessions of *L. alba* (L01 and L02) were used, extracted from leaves of plants aged 30, 60, and 90 days after transplantation (DAT). The major components identified for accession L01 were carvone, limonene, and germacrene D, while for accession L02 they were o-cymene, caryophyllene oxide,  $\alpha$ -citral, and  $\beta$ -citral. The percentages of major components varied significantly depending on the plant's age. The accessions demonstrated the ability to inhibit the mycelial growth of *A. welwitschiae*, reducing its growth rate and spore production. The results of this study indicate that the essential oils from *L. alba* have potential as antifungal agents against *A. welwitschiae*.

**Keywords:** Antimicrobial activity, Secondary metabolism, Lemon verbena.

## Introdução

O sisal (*Agave sisalana* Perrine) é uma planta pertencente à família *Asparagaceae*, originária do México, e no Brasil ocupa uma extensa área da região semiárida dos Estados da Bahia, Paraíba e Rio Grande do Norte (Coleman-Derr et al., 2016). A cultura do sisal possui grande importância socioeconômica para o Brasil, principalmente no semiárido baiano, pois é a maior geradora de emprego, cerca de 850 mil empregos diretos e indiretos por meio de sua cadeia de serviços (Silva et al., 2021).

A podridão vermelha é uma das principais doenças que ameaça a produtividade do sisal na Bahia. O fungo *Aspergillus welwitschiae* (Bres.) Henn é o agente causal da podridão vermelha do sisal, que invade as plantas de sisal e se comporta como um patógeno necrotrófico típico, que uma vez dentro do hospedeiro destrói as células do parênquima e do cilindro vascular, crescendo inter e intracelular através das células mortas induzindo a necrose dos tecidos internos do caule e provocando a morte da planta sisal (Duarte et al., 2018).

Os fungicidas sintéticos largamente utilizados na agricultura são eficientes e rápidos no controle de doenças de plantas, contudo, o uso contínuo causa danos à saúde humana e ao ambiente (Gama et al., 2015). Os produtos extraídos de plantas, como os óleos essenciais, apresentam potencial na substituição aos fungicidas sintéticos, pois apresentam degradação mais rápida do que a maioria dos produtos sintéticos, e esta degradação pode ocorrer em alguns dias ou até mesmo horas, além de serem menos propensos a matar pragas benéficas (Al-Samarrai et al., 2012).

A *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. ex Britton & P. Wilson, arbusto aromático nativo da América do Sul é utilizado na medicina popular (Leite et al., 2023). Pesquisas têm demonstrado uma variedade de atividades biológicas a esta espécie e seu óleo essencial, incluindo atividades repelente, antifúngicas, antibacterianas, antivirais, antiinflamatórias, antioxidantes e citotóxicas (Malik et al., 2021, Camilo et al., 2022 & Santos et al., 2023). Em geral os estudos revelam alta variação no perfil químico dos óleos essenciais de *Lippia alba*, sugerindo um agrupamento dos genótipos em quimiotipos, separados pelos seus compostos químicos majoritários (Costa et al., 2020 & Sales et al., 2022). Neste contexto, o presente estudo objetivou avaliar o potencial

antifúngico do óleo essencial de dois acessos de *Lippia alba*, coletados em diferentes períodos de desenvolvimento da planta, frente à *Aspergillus welwitschiae*.

## Material e métodos

### Material vegetal e extração e determinação da composição do óleo essencial

O experimento foi conduzido no campo experimental do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia [UFRB], localizado no município de Cruz das Almas, Bahia, Brasil (12°40'0" S e 39°06'0" W, altitude 200 m). A partir da coleção do Banco de Germoplasma de *Lippia alba* da UFRB dois acessos foram selecionados (L01 e L02). Exsiccatas dos acessos encontram-se depositadas no Herbário da UFRB sob os números de registro 8793 (L01) e 8794 (L02). As plantas utilizadas no experimento foram propagadas por estaquia em substrato (areia lavada + esterco + solo, em proporção de 1:1:2). Após a propagação as mudas, foram transplantadas para o campo em espaçamento de 0,50 m x 0,50 m. O delineamento experimental utilizado consistiu em blocos casualizados em esquema fatorial 2x3, com três repetições (compostas de 12 plantas), com dois principais fatores em estudo, os acessos de *L. alba* (L01 e L02) e a idade da planta (30, 60 e 90 dias após o transplante – DAT).

A coleta do material para extração do óleo essencial foi realizada aos 30, 60 e 90 DAT entre oito e nove horas da manhã. Todo o material foi obtido pelo menos 15 cm acima do solo. As folhas foram secas a 45 °C até massa constante. A extração de óleo essencial foi realizada utilizando o método de hidrodestilação (Teles et al., 2013) com algumas modificações. O rendimento de extração foi calculado em percentual de óleo por 100 g de material vegetativo seco. As análises para identificação dos componentes dos óleos essenciais foram realizadas por cromatografia gasosa em Cromatógrafo Shimadzu® CG-2010 acoplado a Espectrômetro de Massas CG/EM-QP2010SE Shimadzu®. A identificação dos constituintes foi realizada por meio do cálculo do índice de Kovats de cada um dos picos e pelos dados de espectrometria de massas. Cada pico do cromatograma foi identificado pelo seu espectro de massas, pela comparação com a biblioteca do equipamento (NIST 11), pela

consulta da literatura especializada (Adams, 2007, Joulain & Konig, 1998) e pela injeção de padrões. A quantificação dos constituintes identificados foi obtida com base nas áreas dos picos cromatográficos correspondentes utilizando-se o método da normalização.

#### **Atividade antifúngica**

#### **Análise de crescimento micelial e Índice de velocidade de crescimento**

O fungo *Aspergillus welwitschiae* foi isolado de plantas de sisal (*Agave sisalana* Pirrine) obtido da biblioteca de culturas de microrganismos do Laboratório de Microbiologia do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. A cepa encontra-se depositada na Coleção de Cultura de Microrganismos da Bahia sob o código CCMB676. O fungo foi cultivado em Batata Dextrose Agar (BDA E. Merck, Alemanha) suplementado com 50  $\mu\text{L mL}^{-1}$  do antibiótico Clorofenicol e incubado durante sete dias a 28 °C.

Os óleos essenciais foram previamente diluídos em Tween 20® a 10% e adicionados ao meio de cultura BDA para obtenção das seguintes concentrações 0,25; 0,50; 0,75; 1,50; 3,00 e 6,00  $\mu\text{L mL}^{-1}$ . A suspensão fúngica foi preparada por raspagem suave da superfície da cultura e introduzidas em microtubos contendo solução de água-ágar. Para avaliação dos diferentes tratamentos no crescimento micelial do fungo *A. welwitschiae* foram transferidos 10  $\mu\text{L}$  da suspensão fúngica para o centro da placa de Petri. O tratamento controle consistiu na inoculação do fungo em meio BDA e BDA com Tween 20® a 10%. As avaliações foram realizadas por meio de medições do diâmetro da colônia, em dois sentidos perpendiculares, e efetuadas a cada 48 horas até a colônia atingir toda a superfície do meio de cultura no tratamento controle, o que ocorreu depois de 12 dias de incubação. O índice de velocidade de crescimento (IVC) foi calculado conforme a seguinte equação (Oliveira, 1991):  $IVC = [(\sum(D - D_a))/N]$ , onde, IVC: índice de velocidade de crescimento micelial, D: diâmetro médio atual da colônia,  $D_a$ : diâmetro médio da colônia do dia anterior, N: número de dias após a inoculação.

#### **Número de esporos**

A avaliação do número de esporos de *A. welwitschiae* foi realizada conjuntamente com o dia de avaliação de crescimento micelial. Para tanto, foi preparada suspensão com a colônia de cada tratamento, onde ocorreu crescimento micelial e o controle. Para o preparo da

suspensão, em cada placa, foi adicionada 10 mL de solução de água destilada e duas gotas de Tween 20®, após raspagem das placas as suspensões foram transferidas para microtubos. A contagem de esporos de *A. welwitschiae* foi feita em câmara de Neubauer e microscópio óptico.

#### **Concentração inibitória mínima**

A concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada por meio da técnica de microdiluição descrita no documento M38-A2 da *Clinical and Laboratory Standards Institute*, com modificações [CLSI] (2008). Inicialmente foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de meio de cultura Batata Dextrose (BD), suplementado com 50  $\mu\text{L mL}^{-1}$  do antibiótico Cloranfenicol, nos orifícios das placas de microdiluição contendo 96 poços. Em seguida foram distribuídos em triplicata, na primeira fileira 100  $\mu\text{L}$  da emulsão (óleo essencial + Tween 20® a 10%), a uma concentração inicial de 10  $\mu\text{L mL}^{-1}$ . Seguiu-se a técnica de microdiluição seriada que resultou nas seguintes concentrações: 5,00; 2,50; 1,25; 0,625; 0,312; 0,156; 0,008  $\mu\text{L mL}^{-1}$ . Como controle negativo foi utilizado uma solução de Tween 20® a 10% e o controle positivo foi realizado utilizando o antifúngico Ciclopirox olamina, pela técnica de microdiluição, na concentração inicial de 400  $\mu\text{L mL}^{-1}$ . Foram realizados controle de esterilidade para os óleos essenciais e o meio de cultura. Os ensaios foram desenvolvidos em triplicata, e em cinco repetições. Posteriormente em cada poço foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de suspensão de esporos de *A. welwitschiae* na concentração de  $2 \times 10^6$  esporos  $\text{mL}^{-1}$ . As microplacas foram incubadas a  $28 \pm 2$  °C durante 72 horas. A menor concentração sem crescimento visível (no microscópio binocular) foi definida como a concentração inibitória mínima.

#### **Concentração fungicida mínima e germinação de esporos**

A concentração fungicida mínima (CFM) foi realizada com modificações da técnica descrita por Simić et al. (2004), onde a concentração correspondente à inibitória e as maiores concentrações foram subcultivadas em placa de Petri contendo meio de cultura BDA suplementado com 50  $\mu\text{L mL}^{-1}$  do antibiótico Cloranfenicol. Após 48 horas de incubação a  $28 \pm 2$  °C foi considerada a CFM do óleo essencial que impediu o crescimento visível do subcultivo. O mesmo protocolo descrito para a CIM foi utilizado para o ensaio da germinação de esporos, e as microplacas incubadas a  $28 \pm 2$  °C

durante 12 horas. Após a incubação, o processo foi paralisado com lactoglicerol e avaliou-se a porcentagem de germinação em microscópio de luz foi avaliado. Os esporos foram considerados germinados quando o comprimento do tubo germinativo fosse duas vezes maior que o tamanho do esporo.

#### Análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado para todos os ensaios de atividade antifúngica e submetida à análise de variância. Todos os parâmetros foram avaliados comparando as médias dos dados pelo teste de Scott-Knott ( $P < 0,05$ ) utilizando o programa estatístico do software *Statistical Analysis System* (SAS, 2006). Para as análises de composição química do óleo essencial, concentração inibitória

mínima e concentração fungicida mínima foi utilizado o teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

## Resultados e discussão

A composição química do óleo essencial dos acessos de *L. alba* está representada na Tabela 1. Os componentes majoritários do acesso L01 foram a carvona, limoneno e o germacreno D, e para o acesso L02 foram o óxido de cariofileno,  $\alpha$ -citral e  $\beta$ -citral. Ao comparar a composição química dos óleos essenciais observou-se que os acessos L01 e L02 apresentam diferentes variações quantitativas de acordo com a idade da planta.

**Tabela 1** - Componentes majoritários do óleo essencial de dois acessos de *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. ex Britton & P. Wilson cultivados em Cruz das Almas, Bahia, Brasil.

| Composto químico     | Índice de Kovats | Acesso L001 |        |        | Acesso L002 |        |        |
|----------------------|------------------|-------------|--------|--------|-------------|--------|--------|
|                      |                  | 30          | 60     | 90     | 30          | 60     | 90     |
|                      |                  | %           |        |        |             |        |        |
| Carvona              | 1243             | 44,37c      | 55,54a | 49,02b | -           | -      | -      |
| Limoneno             | 1029             | 19,84a      | 15,18b | 19,18a | -           | -      | -      |
| Germacreno D         | 1480             | 7,23a       | 6,05b  | 4,86c  | -           | -      | -      |
| o-cimeno             | 1026             | -           | -      | -      | 30,71a      | 26,98b | 10,08c |
| Óxido de cariofileno | 1583             | -           | -      | -      | 9,56a       | 7,71a  | 2,52b  |
| $\alpha$ -citral     | 1267             | -           | -      | -      | 8,31a       | 6,41ab | 3,29b  |
| $\beta$ -citral      | 1238             | -           | -      | -      | 6,59a       | 6,35a  | 6,10a  |

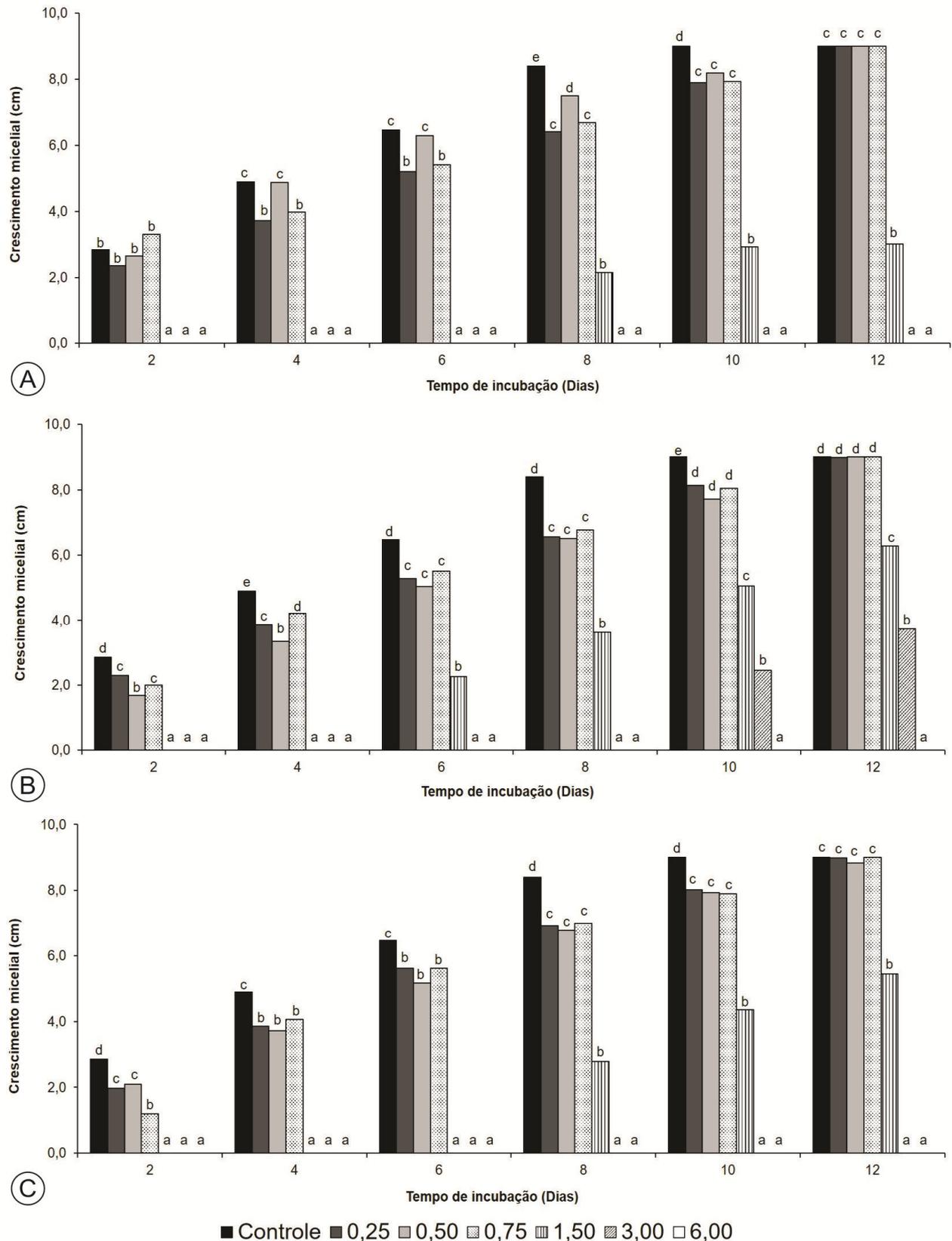
Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha não diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

**Fonte:** Dados da pesquisa.

Os tratamentos com óleos essenciais do acesso L01 aos 30 e 90 DAT retardaram o crescimento micelial do fungo durante seis dias na concentração de  $1,50 \mu\text{L mL}^{-1}$  (Figuras 1A e 1C). O L01 aos 60 DAT nas concentrações de  $1,50$  e  $3,00 \mu\text{L mL}^{-1}$  retardou o crescimento micelial até o quarto e o oitavo dia de avaliação, respectivamente (Figura 1B). A inibição do crescimento micelial durante os dois primeiros dias de incubação foi obtida na concentração  $3,00 \mu\text{L mL}^{-1}$  pelo óleo essencial L02 30DAT (Figura 2A). Inibição por período maior, dez e seis dias,

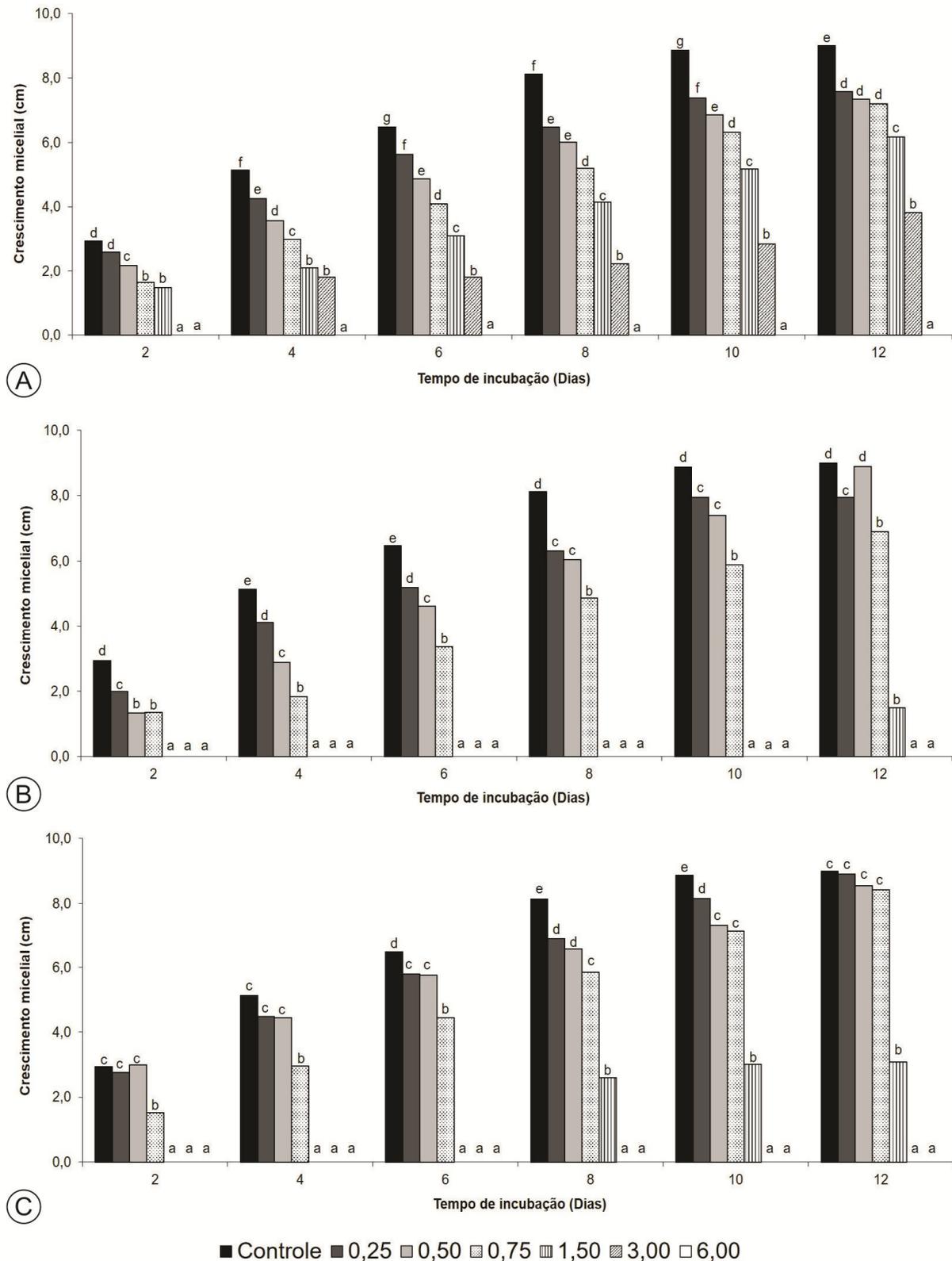
foram obtidas na concentração de  $1,50 \mu\text{L mL}^{-1}$  pelo óleo essencial do acesso L02 60 e 90DAT, respectivamente (Figuras 2B e 2C). O maior tempo de controle na inibição do crescimento micelial do *A. welwitschiae* obtido pelos óleos essenciais dos acessos L01 e L02 de *L. alba* sugerem que estes óleos podem contribuir para retardar o aparecimento dos sintomas de doenças relacionadas a este agente fitopatológico, porém estudos *in vivo* devem ser realizados para verificar a viabilidade do uso dos óleos essenciais no controle fitossanitário do fungo.

**Figura 1** - Efeito de diferentes concentrações ( $\mu\text{L mL}^{-1}$ ) do óleo essencial do acesso L001 de *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. ex Britton & P. Wilson no crescimento micelial *in vitro* do fungo *Aspergillus welwitschiae*. (A) idade da planta: 30 dias após o transplante (DAT); (B) idade da planta 60 DAT, e (C) idade da planta: 90 DAT. Médias seguidas pela mesma letra minúscula no mesmo tempo de incubação não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott ( $P < 0,05$ ).



Fonte: Dados da pesquisa.

**Figura 2** - Efeito de diferentes concentrações ( $\mu\text{L mL}^{-1}$ ) do óleo essencial do acesso L002 de *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. ex Britton & P. Wilson no crescimento micelial *in vitro* do fungo *Aspergillus welwitschiae*. (A) idade da planta: 30 dias após o transplante (DAT); (B) idade da planta 60 DAT, e (C) idade da planta: 90 DAT. Médias seguidas pela mesma letra minúscula no mesmo tempo de incubação não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott ( $P < 0,05$ ).

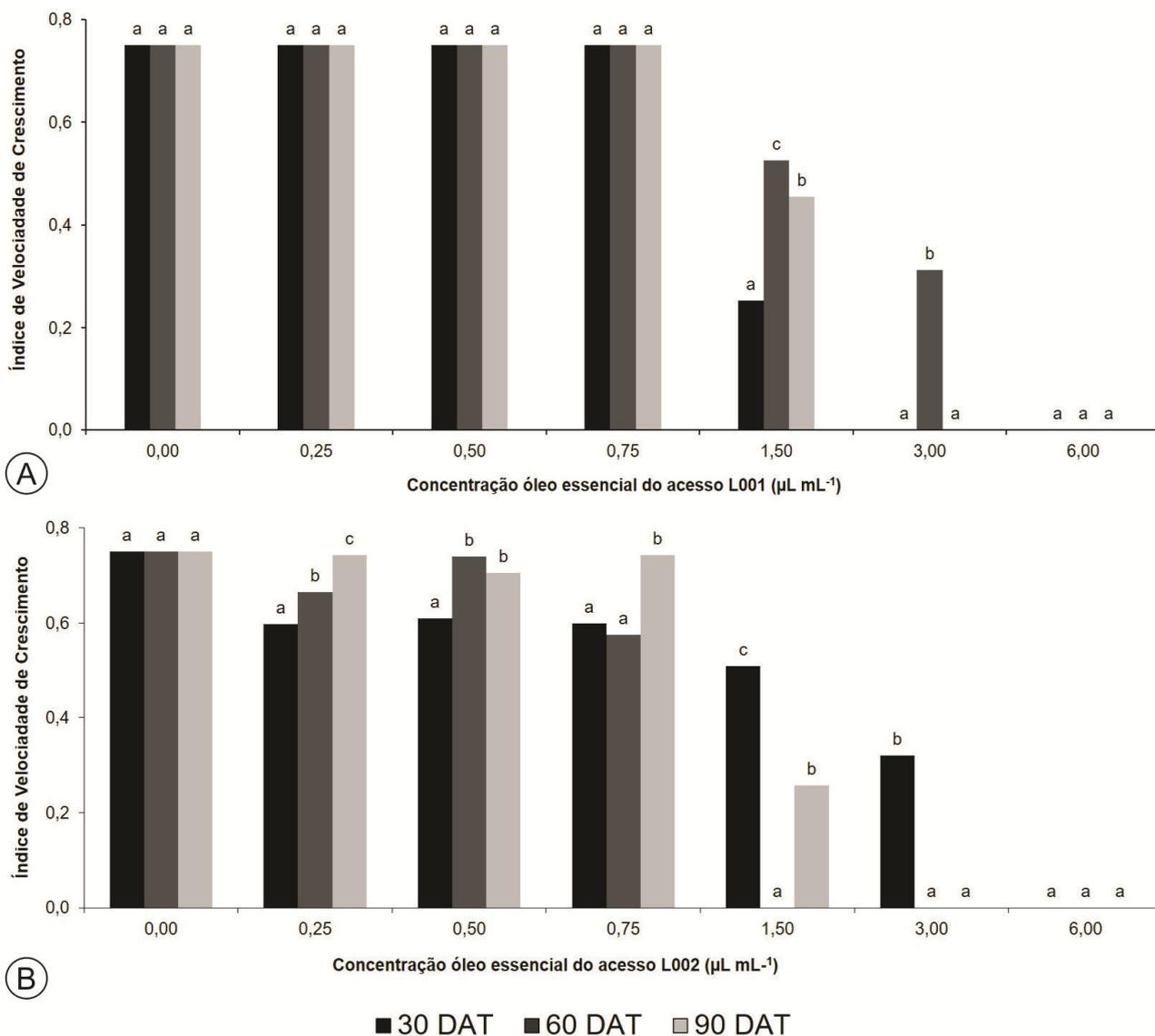


Fonte: Dados da pesquisa.

O índice de velocidade de crescimento micelial foi significativamente menor ( $P<0,05$ ) em relação a testemunha a partir da concentração de  $1,50 \mu\text{L mL}^{-1}$  para o óleo essencial do acesso L01 em todas as idades da planta (Figura 3A), e nas concentrações de  $0,25$ ,  $0,75$  e  $1,50 \mu\text{L mL}^{-1}$  para acesso L02 de folhas colhidas aos 30, 60 e 90 DAT, respectivamente (Figura 3B). Inibição completa do crescimento micelial foi obtida a partir da concentração de  $3,00 \mu\text{L mL}^{-1}$  para os óleos L01 30 e 90DAT e L02 60 e 90DAT e na concentração de  $6,00 \mu\text{L mL}^{-1}$  para os óleos L01 60DAT e L02 30DAT. A produção de esporos foi

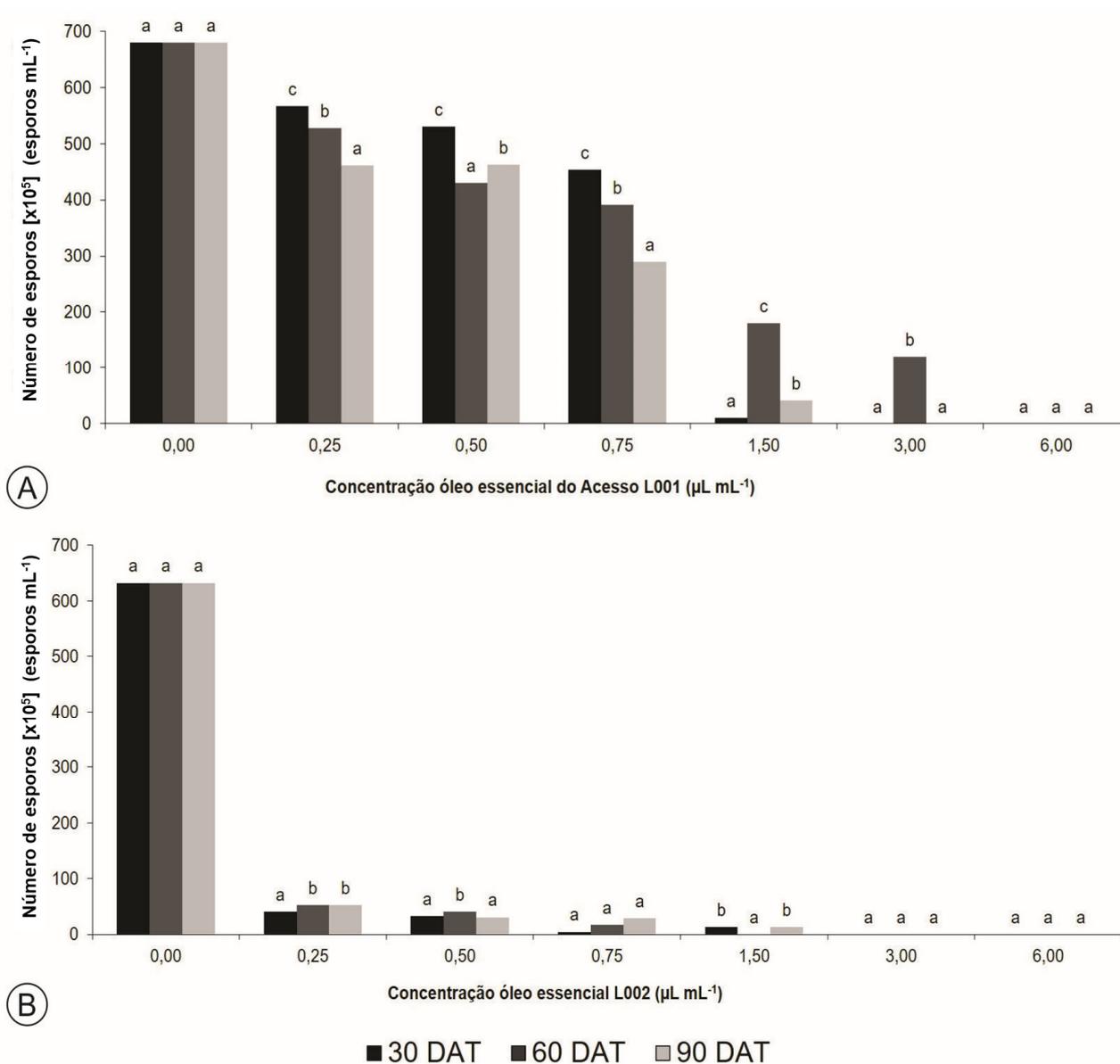
totalmente inibida na concentração de  $3,00 \mu\text{L mL}^{-1}$  para L01 30 e 90 DAT e na concentração  $6,00 \mu\text{L mL}^{-1}$  para L01 60 DAT. Os efeitos dos óleos essenciais do acesso L02 foram maiores do que os do acesso L01 sobre a produção de esporos (Figura 4A). A inibição da produção de esporos na menor concentração ( $0,25 \mu\text{L mL}^{-1}$ ), do óleo essencial do acesso L02 nas três épocas de colheita variou entre 91,77% e 93,52%, obtendo 100% de inibição a partir da concentração  $3,00 \mu\text{L mL}^{-1}$  para L02 30 e 90DAT e  $1,50 \mu\text{L mL}^{-1}$  para L02 60DAT (Figura 4B).

**Figura 3** - Efeito de diferentes concentrações do óleo essencial de *Lippia alba* ((Mill.) N.E.Br. ex Britton & P. Wilson no índice de crescimento micelial do fungo *Aspergillus welwitschiae*. (A) acesso L001 e (B) acesso L002. Médias seguidas pela mesma letra minúscula na mesma concentração não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott ( $P<0,05$ ).



Fonte: Dados da pesquisa.

**Figura 4** - Efeito de diferentes concentrações do óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. ex Britton & P. Wilson no número de esporos do fungo *Aspergillus welwitschiae*. (A) acesso L001 e (B) acesso L002. Médias seguidas pela mesma letra minúscula na mesma concentração não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott ( $P < 0,05$ ).



Fonte: Dados da pesquisa.

Os óleos essenciais L01 30, 60 e 90 DAT e L02 60 e 90 DAT apresentaram concentração inibitória mínima de 1,25 µL mL<sup>-1</sup> e o L002 30DAT de 2,50 µL mL<sup>-1</sup>. O efeito fungicida dos óleos essenciais testados foi obtido nas concentrações de 2,50 µL mL<sup>-1</sup> para os óleos L01, 30, 60 e 90 DAT e L02 30DAT e de 1,25 µL mL<sup>-1</sup> para o óleo L02 60 e 90 DAT (Tabela 2). Em relação ao teste de germinação dos esporos os controles

negativos mostraram que os esporos estavam viáveis. Adicionalmente, o antifúngico ciclopirox olamina inibiu 100% da germinação dos esporos em todas as diluições testadas do controle positivo. Os óleos essenciais dos acessos L01 e L02 nas diferentes épocas de coleta avaliadas inibiram 100% a germinação de esporos a partir da concentração 1,25 µL mL<sup>-1</sup> (Figuras 5A e 5B).

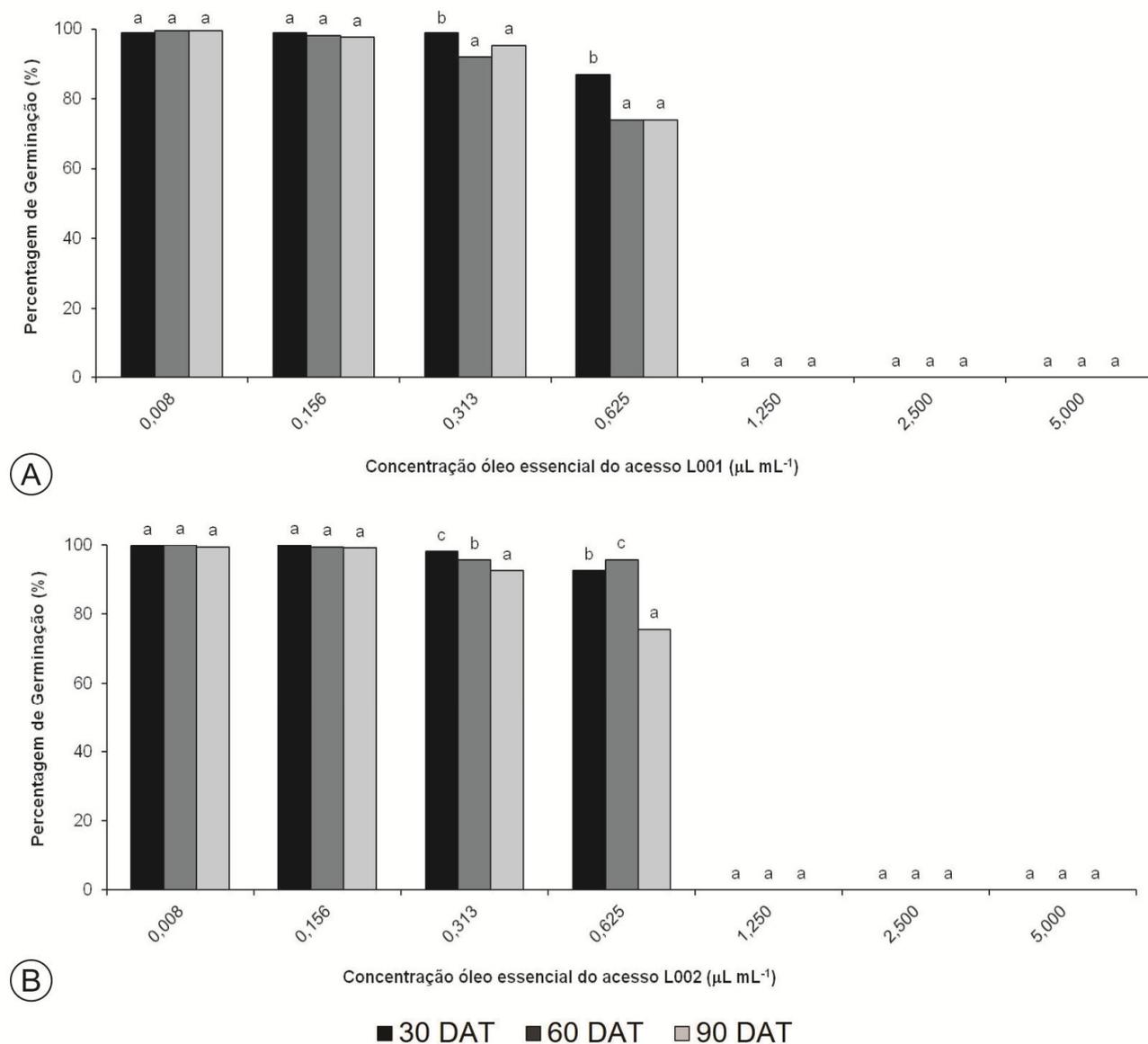
**Tabela 2** - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) do óleo essencial de acessos de *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. ex Britton & P. Wilson.

| DAT | Acesso L001  |       | Acesso L002 |       |
|-----|--|-------|-------------|-------|
|     | Concentração do óleo essencial ( $\mu\text{L mL}^{-1}$ ) |       |             |       |
|     | CIM  | CFM   | CIM         | CFM   |
| 30  | 1,25a  | 2,50a | 2,50b       | 2,50b |
| 60  | 1,25a  | 2,50a | 1,25a       | 1,25a |
| 90  | 1,25a  | 2,50a | 1,25a       | 1,25a |

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).  
 DAT: dias após o transplante.

Fonte: Dados da pesquisa.

**Figura 5** - Efeito de diferentes concentrações do óleo essencial dos acessos L001 (A) e L002 (B) de *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. ex Britton & P. Wilson na germinação de esporos *in vitro* do fungo *Aspergillus welwitschiae*. Médias seguidas pela mesma letra minúscula na mesma concentração não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott ( $P < 0,05$ ).

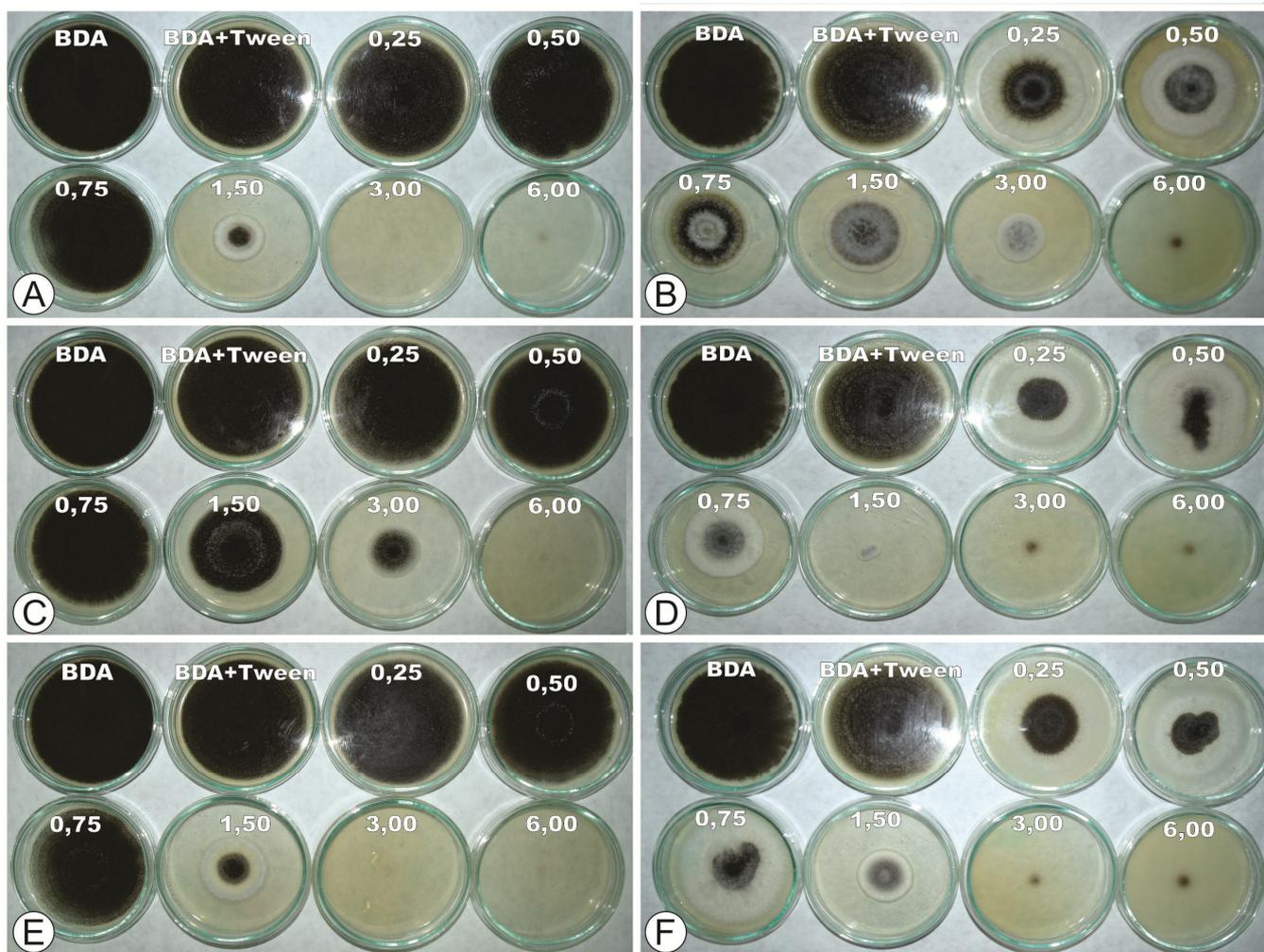


Fonte: Dados da pesquisa.

O efeito da atividade antifúngica dos óleos essenciais dos acessos de *L. alba* testados neste experimento após 12 dias de incubação está representado na Figura 6. No presente trabalho o efeito fungicida e fungistático dos óleos essenciais de *L. alba* sofreu influência tanto pelo tipo de acesso utilizado, quanto pela idade da planta. A idade da planta associada a fatores bióticos e abióticos afetam a composição química dos óleos essenciais e contribuem para a formação de diferentes variações quimiotípicas, essa alteração na composição química pode induzir a mudança na eficácia biológica destes metabólitos (Petropoulos et al., 2018). Estudos têm demonstrado que os compostos voláteis e lipofílicos emitidos pelos óleos essenciais

penetram facilmente na membrana plasmática dos fungos e atuam na inibição do crescimento celular devido sua capacidade de ruptura da integridade da membrana plasmática, com inibição do ergosterol, proporciona o vazamento do conteúdo citoplasmático e morte celular. Além disso, atuam na interrupção entre a fase vegetativa e reprodutiva do desenvolvimento fúngico, que pode causar alterações na estrutura do micélio, que resultam em hifas vazias, desestruturação da parede celular e irregularidade na membrana citoplasmática, bem como alteração da percepção de sinais fisiológicos responsáveis pela mudança de fase vegetativa para reprodutiva (Lew, 2011 & Chen et al., 2013).

**Figura 6** - Crescimento micelial de *Aspergillus welwitschiae* em meio BDA com diferentes concentrações de óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. ex Britton & P. Wilson, em sete concentrações. Acesso L001: (A) 30DAT; (C) 60DAT e (E) L001 90DAT. Acesso L002: (B) 30DAT; (D) 60DAT e (F) L002 90DAT.



Fonte: Dados da pesquisa

Os resultados observados para o acesso L01 com óleos essenciais nos quais a carvona e o limoneno estão presentes como componentes majoritários. Nas condições em que o experimento foi realizado os melhores resultados no retardamento e a inibição completa do crescimento micelial, inibição da produção de esporos obtidos pelo óleo essencial L01 aos 30 DAT e 60DAT, indicam efeito potencial do limoneno. Costa et al. (2020) avaliaram o óleo essencial de *Lippia alba*, cujo principais componentes foram sabineno (19,34%), E-cariofileno (18,21%), limoneno (16,47%) e  $\gamma$ -elemeno (9,09%), e verificaram atividade *in vitro* contra *Trichophyton rubrum*. Estudos com o óleo essencial de *Lippia alba* do quimiotipo carvona também apresentaram considerável atividade antifúngica no controle de *Lasiodiplodia theobromae*, *Fusarium pallidoroseum* e *Fusarium solani* (Peixoto et al., 2018). Apesar de não existir relatos da atividade antimicrobiana do germacreno D, este é um dos constituintes majoritários de óleos essenciais com atividade antimicrobiana comprovada (Gonzaga et al., 2003 & Chavan et al., 2006).

Neste estudo, ocorreu uma concentração elevada de o-cimeno no óleo essencial do acesso L002 (Tabela 1.). O o-cimeno é precursor do timol e carvacrol. Testes *in vitro* avaliando os possíveis mecanismos de ação antifúngica dos compostos timol e carvacrol frente ao fungo *Saccharomyces cerevisiae*, revelaram a capacidade destes compostos em facilitar a troca de íons no meio celular dos fungos, aumentando, portanto, a permeabilidade da membrana e dificultando a sobrevivência da célula por atrapalhar os processos essenciais como o transporte de elétrons (Rao et al., 2010). O óxido de cariofileno,  $\alpha$ -citral e  $\beta$ -citral também foram identificados como componentes majoritários o óleo essencial do acesso L02 (Tabela 1.). Os compostos  $\alpha$ -citral (geranial) e  $\beta$ -citral (neral) formam o citral. Testes com os óleos essenciais de *L. alba* quimiotipos Citral e Carvona e seus principais terpenos bioativos (limoneno e óxido de cariofileno) demonstraram atividade tripanocida sobre *Trypanosoma cruzi*, e a melhor atividade sinérgica do terpeno foi exibida pela combinação de limoneno e óxido de cariofileno (Moreno et al., 2018).

Estudos com o quimiotipo citral revelaram potencial efeito fungicida para os microorganismos *Aspergillus ochraceus* K. Wilhelm, *A. versicolor* (Vuill.) Tirab., *A. niger*

Tieghem, *A. fumigatus* Fresen, *Penicillium ochrochloron* Biourge, *P. funiculosum* (Thom) Samson, Yilmaz, Frisvad & Seifert e *Trichoderma virid* Persoon e, sendo que o geranial pode ser o principal componente fungicida do óleo essencial de *L. alba* estudado (Glamočlija et al., 2011). Portanto, o relevante efeito antifúngico observado em consequência da aplicação do óleo essencial do acesso L02 sugere um efeito potencializado resultante da composição química deste óleo, quando considerado o efeito inibitório estabelecido frente ao crescimento micelial, índice de velocidade de crescimento e produção de esporos *in vitro* do *A. welwitschiae*.

## Conclusão

O óleo essencial de *Lippia alba* apresentou diferentes níveis de inibição frente à *Aspergillus welwitschiae*, dependendo do tipo de acesso e idade da planta. Estes resultados sugerem que estudos adicionais *in vivo* devem ser realizados para avaliar o desempenho desses óleos essenciais, bem como confirmar se esta espécie é promissora no controle de doenças decorrentes da ação do *Aspergillus welwitschiae* e contribuir para elaboração de novos produtos antifúngicos.

## Referências

- Adams, R.P. (2007). Review of identification of oil components by gas chromatography/mass spectrometry, 4th edition. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 18 (4), 803-806. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2007.01.001>
- Al-Samarrai, G., Singh, H., & Syarhabil, M. (2012). Evaluating eco-friendly botanicals (natural plant extracts) as alternatives to synthetic fungicides. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 19 (4), 673-676. Recuperado de: [https://www.aaem.pl/pdf-71842-9068?filename=Evaluating%20eco\\_friendly.pdf](https://www.aaem.pl/pdf-71842-9068?filename=Evaluating%20eco_friendly.pdf)
- Camilo, C. J., et al. (2022). Traditional use of the genus *Lippia* sp. and pesticidal potential: a review. *Biocatalysis And Agricultural Biotechnology*, 40, 102296. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2022.102296>
- Chavan, M. J., Shinde, D. B. & Nirmal, S.A. (2006). Major volatile constituents of *Annona*

- squamosa L. bark. *Natural Product Research*, 20 (8), 754-757. DOI: <https://doi.org/10.1080/14786410500138823>
- Chen, Y., et al. (2013). Antifungal mechanism of essential oil from *Anethum graveolens* seeds against *Candida albicans*. *Journal of Medical Microbiology*, 62 (8), 1175-1183. DOI: <https://doi.org/10.1099/jmm.0.055467-0>
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2008). *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast; approved standard* (Documento M27-A2, second ed, vol.22, n.15). Pennsylvania:CLSI.
- Coleman-Derr, D., et al. (2016). Plant compartment and biogeography affect microbiome composition in cultivated and native *Agave* species. *New Phytologist*, 209 (2), 798–811. DOI: <https://doi.org/10.1111/nph.13697>
- Costa, P. S., et al. (2020). Antifungal activity and synergistic effect of essential oil from *Lippia alba* against *Trichophyton rubrum* and *Candida* spp. *Revista Virtual de Química*, 12 (6), 1529-1540. DOI: <https://doi.org/10.21577/1984-6835.20200119>
- Duarte, A. A. E., et al. (2018). Putting the mess in order: *Aspergillus welwitschiae* (and not *A. niger*) is the etiological agent of sisal bole rot disease in Brasil. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1-21. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01227>
- Gama, E. V. S., et al. (2015). Homeopathic drugs to control red rot disease in sisal plants. *Agronomy for Sustainable Development*, 35, 649–656. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13593-014-0255-0>
- Glamočlija, J., et al. (2011). Chemical characterization of *Lippia alba* essential oil: an alternative to control green molds. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42 (4), 1537-1546. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1517-83822011000400041>
- Gonzaga, W. A., et al. (2003). Composition and antibacterial activity of the essential oils from *Zanthoxylum rhoifolium*. *Planta Medica*, 69 (8), 773-775. DOI: <http://dx.doi.org/10.1055/s-2003-42783>
- Joulain, D., & König, W. A. (1998). *The atlas of spectral data of sesquiterpene hydrocarbons* (658p).Hamburg-Germany: EB-Verlag.
- Leite, P. M., et al. (2023). Antithrombotic potential of *Lippia alba*: a mechanistic approach. *Journal of Ethnopharmacology*, 301, 115744. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2022.115744>
- Lew, R. R. (2011). *How does a hypha grow? The biophysics of pressurized growth in fungi*. *Nature Reviews Microbiology*, 9, 509-518. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrmicro2591>
- Malik, S., et al. (2021). New insights into the biotechnology and therapeutic potential of *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. ex P. Wilson. *Journal of Essential Oil Research*, 33 (6), 523-535. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/10412905.2021.1936667>
- Moreno, E. M., et al. (2018). Induction of programmed cell death in *Trypanosoma cruzi* by *Lippia alba* essential oils and their major and synergistic terpenes (citral, limonene and caryophyllene oxide). *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 18 (225), 1-16. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12906-018-2293-7>
- Oliveira, J. A. (1991). Efeito do tratamento fungicida em sementes no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativas* L.) e pimentão (*Capsicum annanum* L.) (111 f). Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Agricultura de Lavras, Lavras, MG, Brasil. Recuperado de: <http://repositorio.ufla.br/handle/1/33483>
- Peixoto, M. G., et al. (2018). Activity of essential oils of *Lippia alba* chemotypes and their major monoterpenes against phytopathogenic fungi. *Bioscience Journal*, 34 (5), 1136-1146. DOI: <https://doi.org/10.14393/BJ-v34n5a2018-39385>
- Petropoulos, S., et al. (2018). Antimicrobial and antioxidant properties of various Greek garlic genotypes. *Food Chemistry*, 245, 7-12. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.078>
- Rao, A., et al. (2010). Mechanism of antifungal activity of terpenoid phenols resembles calcium stress and inhibition of the TOR pathway. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54 (12), 5062–5069.

DOI: <https://doi.org/10.1128/AAC.01050-10>

Sales, G., et al. (2022). Antifungal and modulatory activity of Lemon Balm (*Lippia alba* (MILL.) N. E. BROWN) Essential Oil. *Scientia Pharmaceutica*, 90 (31), 1-16. DOI: <https://doi.org/10.3390/scipharm90020031>

Santos Filho, L. G. A., et al. (2023). Chemical composition and biological activities of the essential oils from *Lippia alba* and *Lippia origanoides*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 95 (1): e20220359. DOI: <https://doi.org/10.1590/0001-3765202320220359>

Statistical Analysis System. (2006). *SAS/STAT Technical Report* (Version 9.1.3.) [Software]. Cary: SAS Institute Inc.

Silva, R. R. F., et al. (2021). *Sisal: importância socioeconômica*. Embrapa, Recuperado de: <https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/cultivos/sisal/pre-producao/socioeconomia/importancia-socioeconomica>

Simić, A., et al. (2004). The chemical composition of some Lauraceae essential oils and their antifungal activities. *Phytotherapy Research*, 18 (9), 713-717. DOI: <https://doi.org/10.1002/ptr.1516>

Teles, S., et al. (2013). Effect of geographical origin on the essential oil content and composition of fresh and dried *Mentha x villosa* Hudson leaves. *Industrial Crops and Products*, 46, 1-7. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.12.009>

Aceito em: 25/05/2023  
Publicado em: 26/05/2023