

Estudos dos constituintes químicos e atividade antibacteriana do óleo essencial de *Lippia gracilis* a *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* “in vitro”

Morgana Mateus Santos; Ana Rosa Peixoto¹; Esmailly de Sousa Pessoa¹; Helena Brandão dos Santos Nepa¹; Cristiane Domingos da Paz¹; Ana Valéria Vieira de Souza²

¹Departamento de Tecnologia e Ciências Sociais, Universidade do Estado da Bahia, CEP 48900-000, Juazeiro, BA. ²EMBRAPA- Semiárido, Cx. Postal 23, CEP 56302-970, Petrolina, PE.

Autor para correspondência: Morgana Mateus Santos (morganamateuss@hotmail.com)

Data de chegada: 17/12/2013. Aceito para publicação em: 28/07/2014.

10.1590/0100-5405/1958

RESUMO

Santos, M.M.; Peixoto, A.R.; Pessoa, E.S.; Nepa, H.B.S.; Paz, C.D.; Souza, A.V.V. **Estudos dos constituintes químicos e atividade antibacteriana do óleo essencial de *Lippia gracilis* a *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* “in vitro”.** *Summa Phytopathologica*, v.40, n.3, p.277-280, 2014.

Este trabalho foi realizado com o objetivo de estudar a eficácia de óleos essenciais de *Lippia gracilis*, no crescimento in vitro de Xcv. Foram utilizados oito óleos extraídos de *L. gracilis*, obtidos de diferentes manejos de cultivo, em três dosagens diferentes (200; 250 e 300 µL.L⁻¹), testemunha com o oxicleto de cobre (controle padrão) e a testemunha absoluta. A suscetibilidade do isolado Xcv3 aos óleos testados foi avaliada na primeira etapa pela presença e ausência do crescimento bacteriano e, na

segunda etapa, pela porcentagem de inibição do crescimento bacteriano. A análise da composição química dos óleos essenciais extraídos de *L. gracilis*, mostrou, o carvacrol (73,9 a 77%) como composto majoritário e o timol (4,9 a 10,3%). Os óleos referentes aos tratamentos 01, 06 e 07 foram os que proporcionaram maiores porcentagens de inibição no crescimento bacteriano de Xcv: 94,75%, 96,50% e 94,02%, respectivamente, sendo superiores ao oxicleto de cobre (49,6%).

Palavras-chave adicionais: timol, carvacrol, ação antimicrobiana, oxicleto de cobre, cancro bacteriano.

ABSTRACT

Santos, M.M.; Peixoto, A.R.; Pessoa, E.S.; Nepa, H.B.S.; Paz, C.D.; Souza, A.V.V. **Studies of chemical compounds and antibacterial activity of the essential oil from *Lippia gracilis* against *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* “in vitro”.** *Summa Phytopathologica*, v.40, n.3, p.277-280, 2014.

This study aimed to verify the efficacy of essential oils from *Lippia gracilis* on the in vitro growth of Xcv. Eight oils were extracted from *L. gracilis* and obtained from different cultivation management types at three different doses (200, 250 and 300 µL.L⁻¹), control using copper oxychloride (standard control) and absolute control. The susceptibility of the isolate Xcv3 to the tested oils was evaluated in the first step based on the presence and absence of bacterial growth,

and in the second step based on the percentage of bacterial growth inhibition. Analysis of the chemical composition of essential oils extracted from *L. gracilis* showed carvacrol (73.9 to 77%) as the major compound, and thymol (4.9 to 10.3%). The oils corresponding to treatments 01, 06 and 07 provided the largest percentages of Xcv bacterial growth inhibition: 94.75%, 96.50% and 94.02%, respectively, greater than that of copper oxychloride (49.6%).

Additional keywords: thymol, carvacrol, antimicrobial action, copper oxychloride, grapevine canker disease

Dentre as doenças que ocorrem em videira no Submédio do Vale do São Francisco, destaca-se o cancro bacteriano, causado por *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (Nayudu) Dye (Xcv). O controle da doença é considerado difícil e o uso de produtos cúpricos nem sempre é efetivo, devido à existência de isolados de Xcv que apresentam tolerância a esses compostos. Um dos enfoques da agricultura moderna é o controle alternativo de doenças, o qual inclui o controle biológico e o uso de óleos essenciais com atividade antimicrobiana.

Vários trabalhos vêm sendo realizados buscando demonstrar o potencial da utilização desses óleos no controle de fitopatógenos. Como exemplo o alecrim da chapada, (*Lippia gracilis* Schauer) é uma planta rica em óleo essencial, constituído pelo timol (10%) e pelo carvacrol (41,7%), e que apresenta atividade antimicrobiana (2).

Este trabalho foi realizado com o objetivo de estudar a ação antimicrobiana do óleo essencial de *Lippia gracilis*, obtido de diferentes

manejos de cultivo, no crescimento in vitro de *X. campestris* pv. *viticola*.

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Fitopatologia da Universidade do Estado da Bahia (UNEB), no Departamento de Tecnologia e Ciências Sociais (DTCS), Campus III, Juazeiro, BA. O plantio e condução das mudas de *lippia gracilis* foram realizados no campo experimental de Bebedouro da Embrapa Semiárido, localizado Petrolina-PE. Os tratamentos constituíram de diferentes doses de adubação orgânica (esterco de animal – ovino/caprino curtido), com adubação ou não de 100 gramas do adubo mineral NPK para a formulação 15-9-20, com e sem irrigação (Tabela 1). As plantas foram irrigadas por gotejamento uma vez ao dia, durante quatro horas.

O experimento foi instalado em delineamento em blocos ao acaso em três repetições cada parcela constituindo-se de três plantas. A colheita de *L. gracilis* foi realizada após 120 dias de cultivo no período matutino. Após a coleta, as folhas de *L. gracilis* foram secas a 40 ±

Tabela 1. Procedencia de óleos essenciais de *Lippia gracilis* obtidos de diferentes manejo de cultivo da espécie, Embrapa Semiárido, Petrolina-PE.

Tratamento	Óleo Essencial	Adubação orgânica (t/ha)	Adubação mineral (15-9-20)	Irrigação por gotejamento
T1	01	0	Presença	Presença
T2	02	0	Ausência	Presença
T3	03	20	Ausência	Presença
T4	04	40	Presença	Presença
T5	05	40	Ausência	Presença
T6	06	60	Presença	Presença
T7	07	60	Presença	Ausência
T8	08	60	Ausência	Ausência

1°C por quatro dias em estufa de secagem (Marconi MA 037). O óleo essencial foi obtido através da hidrodestilação do pó das folhas, em aparelho do tipo Clevenger.

As análises dos componentes dos óleos essenciais foram realizadas utilizando Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-MS) e Cromatografia Gasosa acoplada com Detector por Ionização de Chama (CG-DIC) (9). A identificação dos constituintes foi realizada com base na comparação dos índices de retenção obtidos com os da literatura (1). Para o índice de retenção foi utilizada a equação de Vandendool & Kratz (9) em relação a uma série homóloga de n-alcenos (nC_9 - nC_{18}).

Para estudo da atividade antimicrobiana dos óleos obtidos foi utilizado o isolado *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (Xcv3), proveniente da coleção de culturas bacterianas do Laboratório de Fitopatologia do DTCS/UNEB e se encontrava preservado em água destilada esterilizada (ADE) a temperatura de 25°C. Sua identificação foi confirmada por *Polymerase Chain Reaction* (PCR) com primers específicos (Xcv1F/Xcv3R).

Inicialmente testes qualitativos foram realizados a fim de selecionar uma dose mínima dos óleos essenciais de *L. gracilis* capazes de inibir o isolado Xcv3. O crescimento bacteriano foi transferido pelo método de estrias com alça de platina, em meio NYDA solidificado, contendo separadamente os óleos de *L. gracilis* diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) a 2% do volume total do meio de cultura. Foram utilizados oito óleos de *L. gracilis* obtidos de diferentes manejos de cultivo e cada óleo foi testado nas concentrações de 100, 200, 300 e 400 $\mu\text{L L}^{-1}$. Cada tratamento foi repetido quatro vezes, sendo avaliada a presença e ausência de crescimento bacteriano na placa de Petri.

Os resultados obtidos neste experimento preliminar foram utilizados para estabelecimento das dosagens a serem utilizadas posteriormente. A ação inibidora foi avaliada utilizando-se suspensão bacteriana em água destilada esterilizada com uma concentração aproximadamente de 10^8 UFC mL^{-1} ($A_{580} = 0,4$). Aliquotas de 1 mL da suspensão bacteriana foram adicionadas em tubos de ensaio rosqueados contendo 10 mL de meio de NYDA sem ágar. Os tratamentos foram constituídos pelos oito óleos de *L. gracilis* obtidos de diferentes manejos do cultivo (Tabela 1), nas dosagens de 200, 250 e 300 $\mu\text{L L}^{-1}$ (estabelecidos após experimento preliminar), testemunha absoluta e oxiclreto de cobre na dosagem de 32 mg mL^{-1} (produto utilizado pelos produtores da região para o controle do patógeno, em condições de campo). A absorbância das suspensões foi avaliada após 48 horas. Determinou-se a porcentagem de inibição do crescimento da bactéria pela aplicação da fórmula: $I = [(CB_c - CB_t) / CB_c] \times 100$, onde I = porcentagem de inibição; CB_c = crescimento bacteriano no controle; CB_t = crescimento bacteriano no tratamento. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado,

constituído por 26 tratamentos, sendo oito óleos de *L. gracilis* obtidos de diferentes manejos de cultivo, três dosagens para cada óleo (200; 250 e 300 $\mu\text{L L}^{-1}$), testemunha com o oxiclreto de cobre (controle padrão) e a testemunha absoluta. Cada tratamento constou de quatro repetições. As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade pelo software ASSISTAT 7.5, sendo a testemunha absoluta comparada com a média geral dos tratamentos.

A análise da composição química dos óleos essenciais extraídos de *L. gracilis* por GC/MS e GC/FID, sob diferentes práticas agrícolas, revelou o carvacrol (73,9 a 77%) como composto majoritário, além de timol (4,9 a 10,3%), p-cimeno (1,68 a 3,19%), Éter metil timol (0,46 a 2,36%) e o E-cariofileno (1,33 a 3,85) (Tabela 2). Resultados semelhantes foram encontrados por Albuquerque (2) para os principais componentes do óleo de *L. gracilis*: 10% de timol, e 47% de carvacrol, este último resultado um pouco diferente dos obtidos no presente estudo. Flutuações nas porcentagens dos compostos majoritários também foram verificados nos dados obtidos com relação às diferentes práticas agrícolas, a que as plantas de *L. gracilis* foram submetidas. Pode-se verificar, também que a maior porcentagem de timol (10,3%) foi obtida no tratamento 06, no qual as plantas de *L. gracilis* foram submetidas a 60 t ha^{-1} de adubação orgânica e também adubação química. Entretanto, Corrêa *et al.* (4), verificaram que a utilização de adubação orgânica embora tenha maximizado o rendimento de óleo essencial de *Origanum vulgare* L., diminuiu a produção de timol. Gomes *et al.* (5), relataram que a composição química do óleo de *L. gracilis* apresenta flutuações quantitativas dos componentes majoritários e essas variações, provavelmente, podem ser devidas a condições genéticas, em função do local e condições em que a planta foi cultivada.

No presente trabalho, nos testes para obtenção da concentração mínima inibitória para Xcv3, os dados obtidos mostraram diferenças na inibição do crescimento bacteriano para todos os óleos testados: nas concentrações de 300 e 400 $\mu\text{L L}^{-1}$ houve inibição total do crescimento bacteriano; na dosagem de 200 $\mu\text{L L}^{-1}$ houve inibição total do crescimento bacteriano apenas quando se utilizaram os óleos referentes aos tratamentos T1, T5 e T6 e na dosagem de 100 $\mu\text{L L}^{-1}$, não houve inibição do crescimento bacteriano (Tabela 3). Portanto, de acordo com esses resultados, dosagens de 200, 250 e 300 $\mu\text{L L}^{-1}$, foram testadas no segundo experimento.

Diferenças significativas para a porcentagem de inibição do crescimento do patógeno foram observadas para todos os óleos de *L. gracilis*, estudados, apresentando valores entre 62,67% a 96,50%. Os tratamentos T1 a T3, T6 e T12 a T18 proporcionaram as maiores porcentagens de inibição de Xcv3, variando de 96,50% (T13) a 90,80% (T17), não diferindo estatisticamente entre si ($P=0,05$). Todos os tratamentos testados apresentaram porcentagens de inibição maiores

Tabela 2. Composição química dos óleos essenciais de *L. gracilis* caracterizados por GC/MS¹ e GC/FID², sob diferentes práticas agrícolas.

Composto	IR ^a	T1	T4	T6	T2	T3	T5	T7	T8
		Adubação orgânica (t ha ⁻¹)							
		0	40	60	0	20	40	60	60
		Irrigação presente				Irrigação ausente			
	Presença NPK (15-9-20)		Ausência NPK (15-9-20)		Presença NPK (15-9-20)		Ausência NPK (15-9-20)		
α -tujeno	945		0,07 ^b	0,1	0,07	0,06	0,02	0,03	
α -pineno	951			0,04	0,07		0,02		
1-octen-3-ol	984		0,06	0,15		0,05	0,09	0,04	0,08
Mirceno	994	0,31	0,36	0,37	0,32	0,37	0,28	0,46	0,31
α -terpineno	1020	0,15	0,24	0,24	0,26	0,2	0,12	0,25	0,06
ρ -cimeno	1027	2,22	2,37	2,23	2,32	2,63	1,68	3,19	2,68
1,8-cineol	1034	0,56	1,66		0,85			0,16	0,64
E-b-ocimeno	1048	0,03				0,07			
Cis-sabinene hydrate	1069	0,29	0,42	0,42	0,38	0,29	0,21	0,25	0,38
Linalol	1102	0,58	0,63	0,41	0,89	0,6	1,06	0,38	0,45
Ipsdienol	1148	0,68	0,51	0,51	0,42	0,65	0,76	0,63	0,63
Terpinen-4-ol	1181	0,64	0,68	0,61	0,82	0,66	0,7	0,71	0,56
Éter metil timol	1238	1,82	1,35	1,31	2,36	2,3	0,46	2,05	1,36
Éter metil carvacrol	1247	0,2	0,25	0,25	0,23	0,35	0,26	0,3	0,32
Timol	1297	5,7	6,0	10,3	4,9	4,9	8,0	5,4	7,0
Carvacrol	1311	74,9	73,9	75,9	76,2	77,3	74,8	74,9	77,0
Acetato de timol	1358	0,16	0,39	0,06		0,13		0,21	
Acetato de carvacrol	1375	1,03	1,78		0,38	0,65	0,45	1,7	0,12
E-cariofileno	1425	3,85	2,65	1,33	2,55	1,56	4,53	2,85	1,28
Aromadendreno	1443	0,07			0,41	0,25	0,33	0,06	0,24
α -humuleno	1458	0,27		0,4			0,3	0,2	0,04
α -curcumeno	1484						0,2		
α -zingibereno	1496						0,67		
Espatulenol	1584	0,2	0,35	0,14	0,61	0,33	0,22	0,32	0,68
Óxido de cariofileno	1591	1,41	1,29	0,64	1,2	1,28	1,11	1,05	1,98
Epóxido de humuleno	1616								
Total detectado (%)		96,4	97	97,4	97,7	96,3	97,8	97,2	96,5

¹ Técnica analítica de Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas

² Técnica analítica de Cromatografia Gasosa/Detector por Ionização em Chama

^a Índice de retenção calculado utilizando a equação de Vandendool e Kratz (1963) em relação a uma série homóloga de *n*-alcanos (*n*C9- *n*C18).

^b Valores do conteúdo dos compostos obtidos pela média de três diferentes determinações obtidas por GC/MS e GC/FID. Traços indicam que o composto não foi encontrado.

que a proporcionada pelo oxicleto de cobre (46,6%), produto comercial utilizado pelos produtores da região do Submédio São Francisco, para manejo do cancro bacteriano da videira, em condições de campo (Tabela 04).

Os ótimos resultados obtidos neste trabalho, com alta porcentagem de inibição do crescimento de Xcv, bactéria Gram-negativa, podem estar relacionados com as observações de Knowles *et al.* (6). De acordo com esses autores o carvacrol e o timol podem desintegrar a membrana externa de bactérias Gram-negativas, liberando lipopolissacarídeos e, consequentemente, gerando alterações na permeabilidade da membrana plasmática, o que resulta na morte da célula bacteriana. Ainda, segundo Burt (3), existe interação entre o carvacrol e o timol, que resulta em uma ação sinérgica entre eles potencializando a ação de ambos frente

ao controle das células bacterianas e o óleo de *L. gracilis* apresenta o carvacrol e o timol como componentes majoritários.

O óleo essencial e extrato de pimenta-longa (*Piper aduncum*) e extrato etanólico de comigo-ninguém-pode (*Dieffenbachia picta*) também foram eficientes na inibição apresentam capacidade de inibição do crescimento de *Ralstonia solanacearum* (10). Além disso, de acordo com Amorim *et al.* (4), o óleo essencial de citronela (*Cymbopogon nardus*), de cravo-da-índia (*Caryophyllus aromaticum*) e de gengibre (*Zingiber officinale*) foram capazes de inibir o crescimento de *R. solanacearum in vitro* em todas as concentrações testadas, sendo o óleo de citronela capaz de controlar a incidência da doença em 100%, quando testado em mudas de bananeira.

Conforme já citado anteriormente, no presente trabalho todos

Tabela 3: Seleção da concentração mínima inibitória dos óleos essenciais de *Lippia gracilis*, obtidos de diferentes manejos de cultivo, sobre crescimento bacteriano do isolado Xcv3. Juazeiro-BA, 2013.

Óleo	Dosagem (uL.L ⁻¹) ¹			
	100	200	300	400
T1	SI ²	IT ³	IT	IT
T2	SI	IP ⁴	IT	IT
T3	SI	IP	IT	IT
T4	SI	IP	IT	IT
T5	SI	IT	IT	IT
T6	SI	IT	IT	IT
T7	SI	IP	IT	IT
T8	SI	IP	IT	IT
ADE ⁵	SI	SI	SI	SI

¹ Dosagem utilizada do óleo essencial de *Lippia gracilis*.

² SI – Sem inibição do crescimento bacteriano do isolado Xcv3.

³ IT – Inibição total do crescimento bacteriano do isolado Xcv3.

⁴ IP – Inibição parcial do crescimento bacteriano do isolado Xcv3.

⁵ ADE – Água Destilada Esterilizada

Tabela 4. Porcentagem de inibição do crescimento *in vitro* de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*, cultivada em meio líquido (NYD) com diferentes concentrações de óleo essencial de *Lippia gracilis* obtidos de distintos manejos de cultivo, Juazeiro,BA, 2013.

Tratamento	Óleo essencial ¹	Concentração (uL.L ⁻¹) ²	Porcentagem de inibição (%)
T1	01	200	93,67 a
T2	01	250	93,70 a
T3	01	300	94,75 a
T4	02	200	62,67 d
T5	02	250	62,67 d
T6	02	300	91,20 a
T7	03	200	81,35 c
T8	03	250	80,62 c
T9	03	300	81,60 c
T10	04	200	85,20 c
T11	04	250	86,25 b
T12	04	300	94,37 a
T13	05	200	96,50 a
T14	05	250	91,17 a
T15	05	300	94,40 a
T16	06	200	92,97 a
T17	06	250	90,80 a
T18	06	300	94,02 a
T19	07	200	83,07 c
T20	07	250	86,95 b
T21	07	300	86,95 b
T22	08	200	78,87 c
T23	08	250	81,70 c
T24	08	300	79,95 c
T25	Oxicloreto de cobre	32mg.ml ⁻¹	49,6 e
T26	Testemunha absoluta	----	0,0 f
	CV%	4,90	

¹ Tratamento do óleo essencial extraído de *Lippia gracilis* em diferentes manejos de cultivo.

² Concentração do óleo essencial de *Lippia gracilis* no meio de cultura NYD.

CV% - coeficiente de variação

os óleos testados proporcionaram uma porcentagem de inibição do crescimento bacteriano significativamente superior ao oxicloreto de cobre, produto padrão utilizado no campo para o controle de Xcv, que inibiu apenas 49,6 %. Segundo Marques *et al.* (7), os isolados brasileiros de Xcv diferem em sua sensibilidade aos produtos a base de cobre, apresentando estirpes naturalmente mais tolerantes. Os óleos de plantas conferem menor risco em promover resistência microbiana, já que são misturas de vários compostos que apresentam diferentes ações aos patógenos.

O uso do óleo essencial de *L. gracilis* mostrou potencial para inibir o crescimento de Xcv3, *in vitro*, podendo constituir uma alternativa no manejo integrado do cancro bacteriano da videira. Entretanto, pesquisas em condições de casa de vegetação e de campo devem ser realizadas para comprovação dos resultados obtidos.

REFERÊNCIAS

- Adams, R.P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy, 4th ed. Illinois, Allured, 2007. 804p.
- Albuquerque, C.C. **Ação do óleo essencial *L. gracilis* Schauer sobre fungos contaminantes do ar e bactérias endofíticas cultivadas de helicônias *in vitro***. 2005. 85 f. Tese (Doutorado em Botânica)-Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.
- Burt, S. A. **Antibacterial activity of essential oils: potential application in food**. 2007. 136 f. Ph. D. Thesis, Institute for Risk Assessment Sciences, Utrecht University. Utrecht.
- Corrêa, R. M.; Pinto, J. E. B. P.; Reis, E. S.; Costa, L. C. B.; Alves, P. B.; Niculan, E.S.; Brant, R.S. Adubação orgânica na produção de biomassa de plantas, teor e qualidade de óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare* L.) em cultivo protegido. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.12, n.1, p.80-89, 2010.
- Gomes, S. V. F.; Nogueira, P. C. L.; Moraes, V. R. S. Aspestos químicos e biológicos do gênero *Lippia* enfatizando *Lippia gracilis* Schauer. **Eclética Química**, São Paulo, v. 36, n. 1, p. 64-77. 2011.
- Knowles, J. R.; Roller, S.; Murray, D. B.; Naidu, A. S. Antimicrobial action of carvacrol at different stages of dual-species biofilm development by *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Applied and Environmental Microbiology**. Washington, v. 71, n. 2, p. 797-803. 2005.
- Marques, E.; Uesugi, C. H.; Ferreira, M. A. S. V. Sensitivity to cooper in *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. **Tropical Plant Pathology**, Brasília-DF, v.34, n.6, p. 406-411, 2009.
- Neves, I. A. ; Oliveira, J. C. S. ; Camara, C. A. G. ; Schwartz, M. O. E. Chemical composition of the leaf oils of *Lippia gracilis* Schauer from two localities of Pernambuco. **The Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 20, n. 2, p. 157-160, 2008.
- Vandendool, H.; Kratz, J.D.J. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 11, p. 463-471. 1963.
- Véras, S. M.; Kaoru, Y.; Rocha, S. N.; Pinheiro, C. C. Extratos e óleos voláteis vegetais com potencial para controle de *Ralstonia solanacearum*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v.27, supl., p. 5-72, 2002.