

**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DO SERTÃO PERNAMBUCANO
CAMPUS PETROLINA ZONA RURAL**

CURSO DE BACHARELADO EM AGRONOMIA

**O USO DO ÓLEO ESSENCIAL DE MANJERICÃO NO CONTROLE DE
Pectobacterium aroidearum NA CULTURA DA ALFACE**

MARIA ANIELE DOS SANTOS LOPES

**PETROLINA, PE
2021**

MARIA ANIELE DOS SANTOS LOPES

**O USO DO ÓLEO ESSENCIAL DE MANJERICÃO NO CONTROLE DE
Pectobacterium aroidearum NA CULTURA DA ALFACE**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao IF SERTÃO-PE *Campus*
Petrolina Zona Rural, exigido para a
obtenção de título de Engenheiro Agrônomo.

**PETROLINA, PE
2021**



SECRETARIA DE EDUCAÇÃO PROFISSIONAL E TECNOLÓGICA
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO
SERTÃO PERNAMBUCANO

FOLHA DE APROVAÇÃO
Maria Aniele dos Santos

**O USO DO ÓLEO ESSENCIAL DE MANJERICÃO NO CONTROLE
DE *Pectobacterium aroidearum* NA CULTURA DA ALFACE**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como requisito parcial para
obtenção do título de Engenheiro
Agrônomo, pelo Instituto Federal de
Educação, Ciências e Tecnologia Sertão
Pernambucano, Campus Petrolina Zona
Rural.

Aprovada em: 16 de dezembro 2021

Flavia Cartaxo
Ramalho
Vilar:75250985491

Assinado de forma digital
por Flavia Cartaxo Ramalho
Vilar:75250985491
Dados: 2021.12.28 20:59:15
-03'00'

Orientadora – Prof^a Dra. Flávia Cartaxo Ramalho Vilar - Instituto Federal de
Educação, Ciência e Tecnologia do Sertão Pernambucano

Dra. Ana Rosa Peixoto - Universidade do Estado da Bahia

VITOR PRATES
LORENZO:05261851475

Assinado digitalmente por VITOR PRATES LORENZO 05261851475
DN: C=BR, O=ICP-Brasil, OU=Secretaria da Receita Federal do Brasil -
RFB, OU=RFB-e-CPF A3, OU=(EM BRANCO), OU=10680051000105,
CN=VITOR PRATES LORENZO 05261851475
Razão: Eu sou o autor deste documento
Localização: sua localização de assinatura aqui
Data: 2021.12.28 09:04:38-03'00'
Foxit PDF Reader Versão: 11.0.1

Dr. Vitor Lorenzo Prates - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia
do Sertão Pernambucano

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

L864 Lopes, Maria Aniele dos Santos.

O uso do óleo essencial de manjeriço no controle de *Pectobacterium aroidearum* na cultura da alface / Maria Aniele dos Santos Lopes. - Petrolina, 2022.
34 f.

Trabalho de Conclusão de Curso (Agronomia) - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sertão Pernambucano, Campus Petrolina Zona Rural, 2022.
Orientação: Prof. Dr. Flávia Cartaxo Ramalho Vilar.

1. Ciências Agrárias. 2. *Ocimum basilicum*. 3. Produtos Naturais. 4. Fitotoxidade. I. Título.

CDD 630

RESUMO

O estudo teve como objetivo verificar os efeitos do óleo essencial de *Ocimum basilicum* (manjeriço), na inibição do crescimento de *Pectobacterium aroidearum*, agente causal da podridão mole, em alface. As plantas de manjeriço foram coletadas no Horto Medicinal Orgânico do IF Sertão/PE Petrolina Zona Rural, e submetidas à extração do óleo essencial por hidrodestilação. O isolado foi obtido na coleção de culturas do Laboratório de Fitopatologia da Universidade do Estado da Bahia. O óleo essencial foi adicionado ao meio de cultura NYDA para os seguintes tratamentos: concentração de 0,25%; 0,5%; 0,75% e 1,0% (v/v) dos óleos essenciais e a testemunha, com 4 repetições em cada tratamento. O meio de cultura misturado ao óleo com sua respectiva concentração foi adicionado em placas de Petri e em seguida, a suspensão bacteriana de *P. aroideraum* foi espalhada sobre o meio de cultura com uma alça de Drigalski. As placas de Petri foram incubadas a 28 °C por 72 h em incubadora BOD. Após 72 h, observou-se que o percentual de inibição do crescimento das colônias da bactéria foi de 100% em comparação à testemunha.

Palavras-chave: *Ocimum basilicum*; Produtos Naturais; Fitotoxicidade.

DEDICATÓRIA

Aos verdadeiros amores da minha vida, meus pais Eronildo de Souza Lopes e Marileide Ferreira dos Santos Lopes, pelo exemplo de vida, caráter, dedicação e amor.

OFERECIMENTO

Ao meu digníssimo futuro esposo Misael Santana dos Passos pelo amor, companheirismo e apoio em todos os momentos. Aos meus irmãos Mariclécia Santos Lopes e Neandro Santos Lopes por todo apoio e amizade na minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida, amor, graça e misericórdia e pela força e coragem que me concedeu e por não ter permitido desistir;

A professora Dra. Flávia Cartaxo pelo carinho, orientação, ensinamentos, paciência e pela oportunidade de participação em seus projetos;

Ao Laboratório de Produtos Naturais em nome do professor Dr. Vitor Lorenzo por todo o suporte e ceder espaço para extração do óleo essencial;

A Universidade Federal da Bahia - UneB em nome da professora Dra. Ana Rosa e seus bolsistas por ceder o Laboratório de Fitopatologia e pelo auxílio na realização dos experimentos;

Ao Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise, do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos da Universidade Federal da Paraíba (LMCA-IPeFarM/UFPB);

Aos meus pais, Eronildo de Souza Lopes e Marileide Ferreira dos Santos Lopes pelo amor, incentivo e conselhos, meu eterno agradecimento;

Ao meu futuro esposo, Misael Santana dos Passos, pelo amor, incentivo, companheirismo e pelo apoio em todos os momentos.

Aos meus irmãos, Neandro Santos Lopes e Mariclecia Santos Lopes, pelo amor, apoio, amizade e incentivo em todos os momentos de dificuldades.

E a todos que colaboraram direta e indiretamente, na execução deste trabalho.

EPÍGRAFE

*Que darei eu ao Senhor, por todos
os benefícios que me tem feito ?
(Salmos 116:12)*

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	10
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	12
2.1 Cultura da alface.....	12
2.2 Podridão mole.....	13
2.3 Óleos Essenciais.....	16
3. OBJETIVO GERAL.....	19
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
4.1 Localização.....	20
4.2 Coleta e Produção do Óleo essencial.....	20
4.3 Obtenção do patógeno.....	22
4.4 Diluição seriada e sensibilidade <i>in vitro</i> de <i>Pectobacterium aroidearum</i> ao óleo essencial de manjeriço.....	22
4.5 Teste de fitotoxicidade com o óleo essencial em plantas de alface.....	23
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
5.1 Sensibilidade <i>in vitro</i> de <i>Pectobacterium aroidearum</i> ao óleo essencial.....	25
5.2 Teste de fitotoxicidade com o óleo essencial em plantas de alface.....	26
6. CONCLUSÃO OU CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	28
7. REFERÊNCIAS.....	29

1. INTRODUÇÃO

Os óleos essenciais (OEs) são compostos voláteis presentes em órgãos de algumas plantas (Possel, 2019), e desempenham importante papel na natureza, protegendo as plantas através de ações antifúngicas, antivirais, antibacterianas, inseticidas e contra herbívoros. Também ajudam alguns insetos na dispersão do pólen e sementes e repelem outros artrópodes indesejáveis (Santos, 2017). Possuem uma mistura complexa de componentes químicos (Pereira, 2017), sendo esta composição química determinada por fatores genéticos, pelas interações planta/microrganismos, planta/insetos e planta/planta, idade e estágio de desenvolvimento, além da ação antrópica, e, também, por fatores abióticos: luminosidade, temperatura, pluviosidade, nutrição, época e horário de coleta, além do método empregado para a sua extração (Alcantara, 2018).

Esses compostos são bem conhecidos pela indústria cosmética, farmacêutica, química e alimentícia, assim como, na medicina popular (Possel, 2019), e, nos últimos tempos, vem sendo descoberto novos compostos químicos de diferentes plantas, capazes de controlar o desenvolvimento de fitopatógenos, apresentando-se como alternativa ao uso de produtos químicos, visto que, o uso indiscriminado desses produtos empregados na agricultura, além de contaminar o meio ambiente, acarretando riscos para a sociedade, tem provocado falhas de controle decorrente do surgimento de microrganismos resistentes. Contudo, o uso de óleos essenciais na agricultura ainda requer muitos estudos, mas constitui reflexo da preocupação ambiental, bem como com a saúde pública (Alves, 2019).

A bactéria *Pectobacterium aroidearum*, é um fitopatógeno responsável por causar a podridão mole em diversas culturas e são encontradas frequentemente tanto no campo como após a colheita caracteriza-se como a mais destrutiva e importante doença em muitas áreas produtoras de hortaliças do Brasil (Rezende, 2017). A busca pela utilização dos óleos essenciais como uma fonte natural para o controle de fungos e bactérias é de suma importância para a qualidade do produto final e conseqüentemente para uma alimentação saudável (Alves, 2019).

A alface (*Lactuca sativa* L.) é classificada como umas das espécies mais importantes produzidas sobre o ponto de vista econômico e social. Podendo ser cultivada em todas as regiões brasileiras, ocupando uma área de plantio de aproximadamente 35.000 hectares, tanto pela produção intensiva, quanto por produtores familiares, gerando em torno de cinco empregos por hectare (Lobo, 2018). De acordo com o último levantamento divulgado pela Associação Brasileira do Comércio de Sementes e Mudas (ABCSEM), a alface é a folhosa de maior consumo no Brasil e a 3ª hortaliça mais produzida nacionalmente, com 1,5 milhão de toneladas, movimentando anualmente R\$ 8 bilhões, apenas no varejo (Corrêa, 2018). Devido ao cultivo ser realizado de forma intensiva e escalonado em pequenas áreas, é extremamente prejudicado por problemas fitossanitários (Echer et al., 2016), principalmente por doenças causadas por fungos e bactérias, em especial a podridão mole.

Nesse contexto, o estudo teve como objetivo verificar os efeitos do óleo essencial vegetal de *Ocimum basilicum* na inibição do crescimento de *Pectobacterium aroidearum*.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Cultura da alface

Hortaliça folhosa mais consumida no Brasil, pertence à família botânica Asteraceae, tem como centro de origem a região Asiática e o Mediterrâneo, introduzida no Brasil pelos portugueses no século XVI, foi uma das primeiras hortaliças cultivadas pelo homem (Azevedo Filho, 2017).

É uma planta de porte herbáceo, com folhas lisas ou crespas, que crescem em forma de roseta em volta de um caule diminuto, fechando-se ou não na forma de uma "cabeça", apresentando varias tonalidades de cores em verde ou roxa a depender da cultivar (Silva, 2018). O sistema radicular é do tipo pivotante, porém muito ramificado e superficial, explorando apenas os primeiros 25 centímetros de solo, quando a cultura é transplantada em plantios diretos, a raiz principal do sistema pivotante, pode atingir até 60 centímetros de profundidade. Quando a planta atinge seu grau de maturidade o caule se alonga e inicia-se a fase reprodutiva, a inflorescência é do tipo capítulo, cada capítulo possui em torno de doze a vinte floretes (Cruz, 2019).

É classificada como umas das espécies mais importantes produzidas sobre o ponto de vista econômico e social. Podendo ser cultivada em todas as regiões brasileiras, ocupando uma área de plantio de aproximadamente 35.000 hectares, tanto pela produção intensiva, quanto por produtores familiares, gerando em torno de cinco empregos por hectare (Lobo, 2018). De acordo com o último levantamento divulgado pela Associação Brasileira do Comércio de Sementes e Mudas (ABCSEM), a alface (*Lactuca sativa* L.) é a folhosa de maior consumo no Brasil e a 3ª hortaliça mais produzida nacionalmente, com 1,5 milhão de toneladas, movimentando anualmente R\$ 8 bilhões, apenas no varejo (Corrêa, 2018).

É uma cultura anual, de ciclo curto. A colheita é realizada depois de 30 dias da sementeira (bandeja) mais 35 dias de cultivo no campo após o transplante (65 dias de ciclo) em condições de temperaturas amenas. Para temperaturas mais elevadas 30 dias da sementeira (bandeja) mais 32 dias de cultivo no campo (62 dias

de ciclo), quando as plantas apresentam-se completamente desenvolvidas (Resende; Yuri; Costa, 2018).

De acordo com as características das folhas, as cultivares de alface são classificadas em grupos. De acordo com o “Programa Horti&Fruti Padrão”, da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, as cultivares são classificadas em: Americana, Crespa, Lisa, Mimosa e Romana. O Grupo Americana apresenta formação de cabeça com folhas grossas; o Grupo Crespa não há formação de cabeça e apresenta folhas crespas; o Grupo Lisa ou Manteiga há formação de cabeça com folhas lisas; o Grupo Mimosa não há formação de cabeça com folhas com borda repicada e Grupo Romana há formação de cabeça alongada com folhas lisas, alongadas, duras e grossas (Azevedo Filho, 2017).

A produção da alface é praticada em diferentes sistemas de cultivo, como o orgânico, convencional e hidropônico, os quais apresentam diferentes características na produção, podendo influenciar nas características químicas dessas hortaliças (Santos, 2018). O cultivo em campo aberto ainda é predominante, apesar das perdas e limitações ainda existentes no cultivo da alface durante o verão. O cultivo em condições de ambiente protegido, seja no solo ou em sistema hidropônico, vem crescendo em função da redução dos riscos de perda, previsibilidade e constância da produção, principalmente durante o período de verão (Azevedo Filho, 2017).

Devido ao cultivo ser realizado de forma intensiva e escalonado em pequenas áreas, é extremamente prejudicado por problemas fitossanitários. Dentre as principais doenças no cultivo da alface estão: mancha-de-cercospora (*Cercospora longissima*), septoriose (*Septoria lactucae*), podridão-mole (*Pectobacterium* spp. ou *Dickeya* spp. = *Erwinia* sp.), murcha-de-fusário (*Fusarium oxysporum*), murcha-de-esclerócio (*Sclerotium rolfsii*), míldio (*Bremia lactucae*), tombamento de mudas provocado por *Pythium* spp., *Rhizoctonia solani* e *Phytophthora* spp. (Echer et al., 2016).

2.2 Podridão mole

A podridão mole caracteriza-se como a mais destrutiva e importante doença em muitas áreas produtoras de hortaliças do Brasil e do mundo. Causada por

bactéria é frequentemente encontrada tanto no campo como após a colheita. É considerado um fator limitante no cultivo de hortaliças como, alface, couve-chinesa, pimentão, abobrinhas e tomate (Rezende, 2017).

Essa doença ocorre em condições de desequilíbrio nutricional das plantas, principalmente quando há o excesso de nitrogênio, ou fitotoxidez por agrotóxicos, o qual pode favorecer o aparecimento de ferimentos nos tecidos e a colonização pela bactéria. Além disto, a penetração da bactéria pode ser provocada por insetos, vento e equipamentos agrícolas (Pavan & Kurozawa, 2005; Barroso, 2018).

A bactéria penetra na planta por meio de aberturas naturais (estômatos, nectários, hidatódios e lenticelas) ou ferimentos por tratos culturais, insetos ou atrito entre plantas, posteriormente, localizam-se nos espaços intercelulares dos tecidos do parênquima e eventualmente no tecido vascular, no qual se multiplicam e produzem as enzimas pectinolíticas que atuam na lamela média. O tecido afetado se desintegra em uma massa pastosa de células desorganizadas rodeadas por bactérias e suas enzimas, ocasionando o sintoma de podridão mole. A maceração do tecido vegetal é resultante da perda de componentes da parede celular e liberação de fluidos celulares (Felix et al.,2016).

Na alface, os sintomas aparecem, inicialmente, como murcha nas folhas mais externas, causada pelo colapso dos tecidos vasculares (Figura 1A), apresentando coloração entre rosa e marrom, Com o progresso da doença, o caule pode apresentar maceração e a planta pode apodrecer (Figura 1B). Ocorrendo principalmente em condições de temperatura e umidade elevadas, provocando rápida decomposição aquosa dos tecidos, devido à ação de enzimas pectinolíticas que agem na lamela média e parede primária das células vegetais, exalando um odor desagradável e característico. Estas enzimas pectinolíticas são produzidas pelas bactérias, as chamadas pectobactérias, e também por plantas, fungos filamentosos e leveduras, favorecendo o processo de penetração, colonização e obtenção de nutrientes pelos microrganismos, já nas plantas interfere nas reações de defesa (Raid, 1997; Barroso, 2018).



Figura 1. Sintomas da ocorrência de podridão mole causada por pectobactérias em (A) folhas (B) e caule (Baysal-Gurel & Mirell, 2010; Barroso, 2018).

As pectobactérias estão alocadas no filo Proteobacteria, classe Gamaproteobacteria, ordem Enterobacteriales, família Enterobacteriaceae (mesma família de algumas bactérias que causam patologias em humanos como a *Salmonella*) e gênero *Pectobacterium* (anteriormente classificado como *Erwinia*) (Felix, et al., 2016). Bactérias desse gênero são cosmopolitas e geralmente se encontram na superfície das plantas e no solo, podendo causar infecção nas plantas através de ferimentos ou de aberturas naturais (Chagas, 2017).

O principal fator de patogenicidade e virulência das pectobactérias são as enzimas pectinolíticas (também chamadas de pectinases), que quando são liberadas nos espaços intercelulares ocorre à dissolução da lamela média e a separação das células umas das outras, ocasionando a perda da rigidez dos tecidos, os quais se tornam moles. Após a maceração dos tecidos ocorrem fermentações sucessivas, seguindo-se a invasão dos tecidos afetados por microrganismos saprofitos, o que resulta na liberação de gases com odor fétido (Rezende, 2017). Por essas características, as pectobactérias são classificadas como necrotróficas anaeróbicas facultativas e foram classificadas, recentemente, como sendo das mais importantes bactérias patogênicas de plantas, por conta o impacto negativo na produção e no armazenamento de alimentos em todo o mundo (Barroso, 2018).

As espécies/subespécies de *Pectobacterium* sobrevivem epifiticamente na filosfera de plantas hospedeiras, como saprófitas no solo, em restos culturais infectados, em material de plantio, em associação com plantas invasoras ou na rizosfera de plantas cultivadas. A disseminação é através de sementes, mudas, raízes e tubérculos infectados, pela água, insetos, tratos culturais, homem e implementos agrícolas (Rezende, 2017).

Apesar da importância da podridão mole na alface e nas mais diversas culturas, além de sua ampla distribuição geográfica, poucos estudos têm sido realizados em condições tropicais e a maioria das informações disponíveis é relativa a países de clima temperado (Silva et al., 2008; Barroso, 2018). Sabe-se que o gênero *Pectobacterium* possui cinco espécies, das quais *Pectobacterium antrosepticum* e *Pectobacterium carotovorum* são as mais estudadas (Pérombelon, 2002; Barroso, 2018). Entretanto, ainda existem outras que devem ser profundamente conhecidas. Atualmente, estudos comprovam a ocorrência de uma espécie nova, denominada *Pectobacterium aroidearum*, que acomoda pectobactérias que infectam principalmente, mas não exclusivamente, monocotiledôneas. A espécie *P. aroidearum* constitui bactérias gram-negativas, não formadoras de esporos, em forma de haste, anaeróbicas facultativas e tolerantes a eritromicina, caracterizadas por apresentar colônias brancas, pequenas e planas (Nabhan et al., 2013; Barroso, 2018).

2.3 Óleos Essenciais

Os óleos essenciais são compostos voláteis presentes em vários órgãos de plantas. São considerados óleos devido à composição lipofílica, apesar de serem quimicamente diferentes dos óleos vegetais e gorduras. E são chamadas essenciais por estarem associadas a funções de defesa e atração de polinizadores nas plantas, funções essas consideradas essenciais para a sobrevivência vegetal (Possel, 2019). Estes são biossintetizados por algumas plantas, e são armazenados em células secretoras especializadas, como tricomas glandulares, cavidades e canais secretores por onde são liberados e evaporam quando em contato com o ar (Pereira, 2017).

Os OEs possuem uma mistura complexa de componentes químicos. Seus principais componentes são hidrocarbonetos, como os terpênicos, álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas, até compostos de sulfurados (Pereira, 2017). Na mistura, esses compostos se apresentam em diferentes concentrações, sendo um deles é o composto majoritário, acompanhado de outros estão em menores concentrações e mais alguns em quantidades ínfimas. Numa determinada espécie, a

concentração de cada um dos constituintes do seu óleo volátil pode variar durante o desenvolvimento do vegetal. A qualidade comercial do óleo essencial depende das proporções relativas de seus diferentes constituintes. São caracterizados por apresentar forte odor, sendo encontrados em diversas partes dos vegetais, como raízes, flores, caules, folhas, sementes e frutos. Desempenham importante papel na natureza, protegendo as plantas através de ações antifúngicas, antivirais, antibacterianas, inseticidas e contra herbívoros. Também ajudam alguns insetos a favorecerem a dispersão do pólen e sementes e repelem outros artrópodes indesejáveis (Santos, 2017).

A composição química dos OEs é determinada por fatores genéticos, pelas interações planta/microrganismos, planta/insetos e planta/planta, idade e estágio de desenvolvimento, além da ação antrópica, e, também, por fatores abióticos: luminosidade, temperatura, pluviosidade, nutrição, época e horário de coleta, além do método empregado para a sua extração (Alcantara, 2018). O óleo essencial de muitas espécies possui diversas aplicações desde a área de limpeza (desinfetantes sanitários), como alto poder germicida que pode ser explorado na área médica e odontológica, bem como repelentes. Além de vários outros efeitos anti-inflamatório, antibacteriano, e ainda para tratar hemorragias, diabetes, diarreia e infestações de vermes intestinais, anticonvulsivante e analgésica. Estes ainda podem ser utilizados como matéria-prima, principalmente na produção de alimentos e bebidas, como aromatizantes, e com crescente utilização na área farmacêutica, particularmente na produção de cosméticos. Tais ações já são exploradas pela medicina popular há diversos anos, e vêm sendo analisados pela ciência para comprovar todos os efeitos já usados pela população (Possel, 2019).

A busca pela utilização dos óleos essenciais é considerada uma fonte natural para o desenvolvimento de novos produtos. E, nos últimos tempos, vem sendo descoberto novos compostos químicos de diferentes plantas, capazes de controlar o desenvolvimento de fitopatógenos. Com isso, o uso indiscriminado desses produtos químicos, empregados na agricultura, além de contaminar o meio ambiente, acarretando riscos para a sociedade, tem provocado falhas de controle decorrente do surgimento de microrganismos resistentes. Dessa forma, o uso de óleos essenciais na agricultura ainda requer muitos estudos, mas constitui reflexo da preocupação ambiental, bem como com a saúde pública e, portanto, o seu emprego

surge como alternativa ao uso de produtos químicos (Alves, 2019). A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais pode ser atribuída a vários fatores, dentre eles à origem da planta, época de colheita, técnica aplicada, tipo de microrganismo e a cepa utilizada no teste, preparo dos extratos e concentração de óleo essencial testada. Esta ação é devida ao dano causado à integridade da membrana celular pelos componentes lipofílicos do óleo essencial, o que acaba afetando a manutenção do pH celular e o equilíbrio de íons inorgânicos (Vivian, 2017).

No manjeriço podem ser encontrados constituintes químicos como taninos, flavonóides, saponinas, cânfora, e no óleo essencial timol, estragol, linalol, eugenol, cilenol e pireno. De acordo com os componentes majoritários do óleo essencial do manjeriço este pode ser classificado em quatro quimiotipos: linalol-metil chavicol (Europeu), metil chavicol (Reunião), metil cinamato (Tropical) e eugenol (Java). O óleo essencial dessa espécie é muito valorizado no mercado internacional principalmente o Europeu, que apresenta como principais constituintes o linalol (40,5 - 48,2%) e o metil chavicol (estragol) (28,9 - 31,6%), utilizados em larga escala pela indústria de cosméticos e condimentos (Maia, 2007).

3. OBJETIVO GERAL

Verificar os efeitos do óleo essencial vegetal de *Ocimum basilicum* na inibição do crescimento de *Pectobacterium aroidearum*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Localização

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Produtos Naturais e horta do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sertão Pernambucano (IF SERTÃO-PE), *Campus* Petrolina Zona Rural, localizado na cidade de Petrolina-PE, Submédio São Francisco (Latitude: 9° 20' S; Longitude: 40° 42' W; Altitude: 418m), bem como no Laboratório de Fitopatologia da Universidade do Estado da Bahia (UNEB), *Campus* III, Juazeiro-BA, Brasil (Latitude: 09° 24' 50" S; Longitude: 40° 30' 10' W; Altitude: 368m).

4.2 Coleta e Produção do Óleo essencial

No presente estudo foi utilizado o óleo essencial 100% puro e natural de *Ocimum basilicum* L., uma planta aromática e medicinal que pertence à família Lamiaceae. As plantas de manjeriço (*O. basilicum* L.) foram coletadas no Horto Medicinal Orgânico do *Campus* Petrolina Zona Rural/IFSERTÃO PE, cultivadas em canteiros, sob manejo orgânico.

Após a coleta, as plantas foram reduzidas a porções menores com um auxílio de uma tesoura de poda e em seguida submetidas para a extração do óleo essencial por hidrodestilação com aparelho do tipo Clevenger no Laboratório de Produtos Naturais do referido *Campus*.

Os aparelhos do tipo Clevenger (Figura 2) consistem em um balão de vidro com volume variável que é conectado ao condensador por um aparato também de vidro. A manta aquecedora, que é conectada a energia elétrica, fica em contato com o balão de vidro, sendo a temperatura regulada por um termostato (LOREGIAN, 2013).

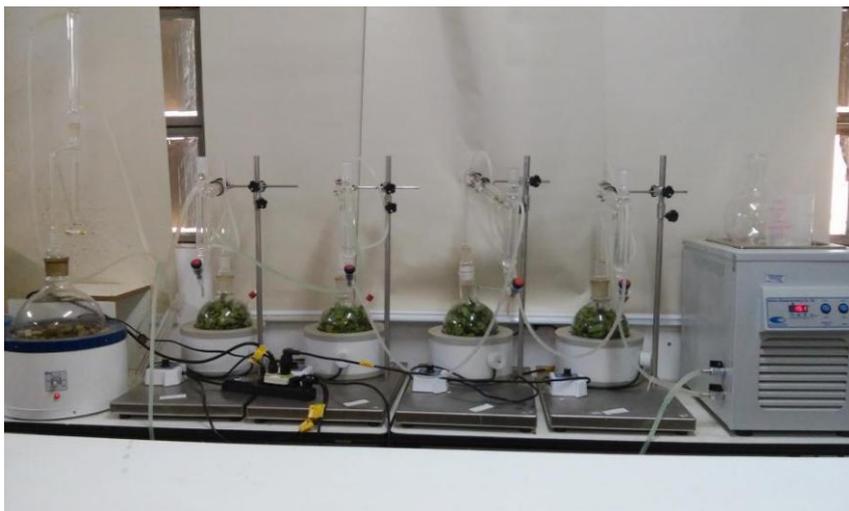


Figura 2. Equipamento de Clevenger. (Foto: arquivo Pessoal)

Por esse método (hidrodestilação - método recomendado pela Farmacopeia Brasileira), o material vegetal foi colocado no balão de fundo redondo com capacidade de 6000 ml, com aproximadamente 1,5 l de água destilada, e então aquecida na manta em temperatura inferior a 100 °C por 2 horas. A amostra fica imersa em água, ocorrendo o contato direto. Ao ser aquecido, a água entra em ebulição e o vapor d'água arrasta o óleo essencial passando por um condensador, como óleo e água são imiscíveis, se separam em uma escala volumétrica existentes no aparelho. Ao final do período de extração pôs-se o óleo essencial em recipiente *eppendorf* e estes em recipiente para diminuir à exposição à luminosidade e mantidos sob-refrigeração (entre 2 e 8°C).

A caracterização química do OE foi obtido por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (Shimadzu®, GCMS-QP2010 Ultra).

Antes da injeção do óleo essencial de cada planta uma alíquota de 20 µL do óleo foi transferido para balão analítico de 10 mL contendo n-hexano grau HPLC. A ionização dos componentes foi realizada por impacto eletrônico com energia de ionização de 0,84 kV. O espectrômetro foi operado no modo SCAN, varrendo uma faixa de massa de 40 à 600 m/z. A temperatura da fonte de íons foi de 280 °C. A temperatura do injetor foi programada para 150 °C. Foi utilizada uma coluna capilar (RTX-5MS) como fase estacionária composta de 5% de Difenil e 95% de Dimetilpolissiloxano, nas dimensões 30 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de tamanho de partícula. A coluna foi aquecida a partir da

temperatura inicial (50 °C) com uma taxa de aquecimento de 5 °C/min até a temperatura final de 280 °C. O gás hélio foi usado como gás de arraste com fluxo de 3mL/min e razão de split de 1:10. O corte do solvente em 2,5 min foi utilizado para eliminar o pico do diluente da amostra (n-hexano). A identificação dos constituintes foi realizada através da comparação dos espectros e dos fragmentos de massa obtido na análise cromatográfica contra o banco de dados das bibliotecas de espectros Wiley9, NIST08 e FFNSC1.3 disponíveis no software do equipamento.

4.3 Obtenção do patógeno

A bactéria *Pectobacterium aroidearum* foi adquirida na coleção de culturas do Laboratório de Fitopatologia da Universidade do Estado da Bahia (UNEB), Juazeiro-BA, preservado em água destilada esterilizada (ADE) pelo método proposto por Castellani (1939).

Inicialmente, preparou-se meio de cultura CPG (1 g de caseína hidrolisada, 10 g de peptona, 10 g de glicose, 18 g de ágar, 1000 ml de água destilada), conforme instruções do rótulo da embalagem. O meio de cultura foi vertido, em temperatura fundente e sob condições assépticas (câmara de fluxo laminar), em placas de Petri.

4.4 Diluição seriada e sensibilidade *in vitro* de *Pectobacterium aroidearum* ao óleo essencial de manjeriço

Foram utilizados as concentrações de 0,25%; 0,50%; 0,75% e 1,0% (v/v) de óleo essencial de manjeriço e a testemunha, com 4 repetições em cada tratamento. Inicialmente, o óleo essencial testado foi emulsificado em tween 80 (na relação 1:1 v/v) para melhorar a solubilização e qualidade do óleo. Em seguida, foi adicionado 30 ml de meio de cultura CPG ao óleo essencial. Utilizando-se 0,0075 ml/ 75µl de óleo na concentração de 0,25%; 0,15 ml/ 150µl para 0,50%; 0,225 ml/ 225µl para 0,75% e 0,3 ml/ 300µl para a concentração de 1,0% do óleo essencial, obtido pela fórmula de concentração comum ($C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$), onde C_1 corresponde a concentração inicial do óleo (100%); V_1 é o volume inicial (a nossa incógnita); C_2 concentração do óleo nos tratamentos (0,25; 0,50; 0,75 e 1,0) e V_2 o volume do meio

de cultura utilizado (30 ml). Posteriormente, o composto foi vertido em placas de Petri e após a solidificação, adicionou-se com auxílio de um micropipetador/ponteira estéril 10 µl da suspensão bacteriana de *P. aroideraum*, diluída da seguinte maneira, transferiu-se, com auxílio de um micropipetador/ponteira estéril, um volume de 1 ml (1.000 µl) da suspensão bacteriana de *P. aroideraum* para um tubo de ensaio com 9 mL de água estéril identificado com 10^{-8} UFC ml⁻¹. Homogeneiza-se por agitação o conteúdo do tubo da diluição 10^{-8} UFC ml⁻¹ e transfere, com auxílio de um micropipetador/ponteira estéril, um volume de 1 ml (1.000 µl) da amostra para um tubo com 9 ml de água estéril identificado com 10^{-7} UFC ml⁻¹ e assim sucessivamente. A suspensão bacteriana de *P. aroideraum* foi diluída em ADE até 10^{-4} UFC ml⁻¹, e posteriormente, foi espalhado sobre o meio de cultura CPG com uma alça de Drigalski e lacradas com papel filme. As placas de Petri foram incubadas a 28 °C por 48 h em incubadora tipo BOD.

A sensibilidade *in vitro* do isolado de *P. aroideraum* ao óleo essencial foi determinada por meio da percentagem de inibição (I) aplicando-se a fórmula de Edington et al., (1971), a saber: $I = [(CT - CTrat) / CTrat] \times 100$, onde: I= percentagem de inibição; CT= Crescimento Testemunha e CTrat= crescimento no tratamento, comparando-se o número médio de colônias nos tratamentos e na testemunha após 72 horas de incubação. O experimento foi constituído por 2 tratamentos (1 óleo essencial + testemunha) com quatro repetições cada, sendo cada repetição representada por uma placa de Petri. As médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott (1974) a 5% de significância.

4.5 Teste de fitotoxicidade com o óleo essencial em plantas de alface

O teste foi realizado utilizando alface crespa com aproximadamente 30 dias de transplântio. Inicialmente o óleo essencial testado foi emulsificado em tween 80 (na relação 1:1 v/v) para melhorar a solubilização e qualidade do óleo e em seguida, diluído em água destilada para obter as concentrações de 0,1%; 0,2%; 0,3%; 0,4% e 0,5% (v/v) de óleo essencial de manjerição e a testemunha. Posteriormente, pulverizadas até o completo molhamento da superfície foliar das plantas de alface. Após 48 horas, foi verificadas se houve alguma anormalidade no desenvolvimento

ou alteração na coloração das plantas causada pela aplicação do óleo essencial nas determinadas concentrações.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Sensibilidade in vitro de *Pectobacterium aroidearum* ao óleo essencial

Em comparação à testemunha após 72h de incubação, observou-se que o óleo essencial vegetal de manjerição obteve resultados positivos quanto à inibição do crescimento das colônias da bactéria. Apresentando percentual de inibição de 100%, em todos os tratamentos, inclusive para a menor concentração do óleo essencial.

A literatura é muito escassa sobre os efeitos do óleo essencial de manjerição *P. aroidearum*. No entanto, Barroso (2018), utilizando óleos essenciais de laranja (*Citrus aurantium*); bergamota (*Citrus bergamia*); capim-limão (*Cymbopogon citratus*); palmarosa (*Cymbopogon martinii*); citronela (*Cymbopogon winterianus*); cravo (*Eugenia caryophyllata*); melaleuca (*Melaleuca alternifolia*); alecrim (*Rosmarinus officinalis*); sálvia (*Salvia sclarea*) e gengibre (*Zingiber officinale*) no manejo da podridão mole causada por *P. aroidearum* em alface *in vitro*, observou que os óleos de palmarosa, citronela, capim-limão e cravo proporcionaram resultados positivos quanto à inibição do crescimento das colônias da bactéria a 0,25%, e o óleo de sálvia a 0,75%.

Almeida et al. (2020), no manejo da podridão mole causada por *P. aroidearum* em pimentão *in vitro*, observaram que os óleos essenciais de melaleuca (*Melaleuca alternifolia*), cravo (*Eugenia caryophyllata*), bergamota (*Citrus bergamia*) e citronela (*Cymbopogon winterianus*), inibiram completamente o crescimento da *P. aroidearum*, independentemente da concentração utilizada foram significativamente superiores à testemunha.

Estudos têm mostrado que a atividade antimicrobiana do óleo essencial do manjerição está associada aos seus constituintes majoritários metil chavicol (estragol) e linalol. Porém os compostos de menores proporções também desempenham as suas funções, provavelmente interagindo com os compostos majoritários (Martins, 2010).

Segundo o resultado da Cromatografia Gasosa o OE do manjerição utilizado no presente estudo constitui-se de 82 componentes químicos, sendo os componentes majoritários Estragol (54.80 %), Eucaliptol (13.54%) e Linalol (8.25%).

Atribui-se a atividade antimicrobiana de óleos essenciais principalmente aos terpenos presentes em sua composição, como por exemplo, o carvacrol e o 1,8-cineol (eucaliptol). Os possíveis mecanismos de ação são: alteração da bicamada lipídica da membrana celular microbiana, com aumento da permeabilidade e posterior liberação de constituintes intracelulares vitais, além de danos causados nos sistemas enzimáticos do micro-organismo. Acredita-se que estes compostos se dissolvam na membrana microbiana e desta forma penetrem na célula onde podem interagir com mecanismos essenciais para o metabolismo celular (Sousa, 2012).

O linalol tem sido largamente usado como composto de partida para várias sínteses importantes, como a do acetato de linalila, e testado como acaricida, bactericida e fungicida (Luz et al., 2009).

5.2 Teste de fitotoxicidade com o óleo essencial em plantas de alface

Após os dados obtidos, foi realizado o teste de fitotoxicidade na cultura da alface no campo, visando verificar se o óleo essencial de manjeriço causa injúrias na cultura, tornando inviável a sua aplicação para o controle da podridão mole.

Após 48h de aplicação, verificou-se que as plantas de alface não apresentaram nenhum sintoma de fitotoxicidade (anormalidade no seu desenvolvimento, coloração das plantas, com características de queima em suas folhas).

A fitotoxicidade dos óleos essenciais sobre as plantas é pouco relatada na literatura, pois os estudos, em sua maioria, ainda são feitos *in vitro* (Fialho et al, 2015). No entanto, Barroso (2018), utilizando óleos essenciais de laranja (*Citrus aurantium*); bergamota (*Citrus bergamia*); capim-limão (*Cymbopogon citratus*); palmarosa (*Cymbopogon martinii*); citronela (*Cymbopogon winterianus*); cravo (*Eugenia caryophyllata*); melaleuca (*Melaleuca alternifolia*); alecrim (*Rosmarinus officinalis*); sálvia (*Salvia sclarea*) e gengibre (*Zingiber officinale*) no manejo da podridão mole causada por *P. aroidearum* em alface em ensaio em casa de vegetação para verificar a fitotoxicidade em plantas de alface da variedade suscetível "Mônica", observou que os óleos de cravo e laranja (1,0%), palmarosa e citronela (0,75 e 1,0%) e capim-limão (0,5, 0,75 e 1,0%) foram fitotóxicas. As plantas com

sintomas de fitotoxicidade apresentaram anormalidade no seu desenvolvimento e na coloração das plantas, com características de queima em suas folhas.

6. CONCLUSÃO OU CONSIDERAÇÕES FINAIS

O óleo essencial vegetal de manjeriço é eficiente em inibir o crescimento das colônias da bactéria *Pectobacterium aroidearum* e por não causar nenhum sintoma de fitotoxidade possui potencial como alternativa de defensivo natural para o combate da referida bactéria. Porém novos estudos precisam ser desenvolvidos a fim de validar o efeito de fitotoxidade.

7. REFERÊNCIAS

- ALCANTARA, F.D. de. O. et al., Teor e fitoquímica de óleo essencial de manjeriço em diferentes horários de colheita. *Revista de Agricultura Neotropical*, Cassilândia-MS, v. 5, n. 4, p. 1-6, out./dez. 2018. ISSN 2358-6303
- ALMEIDA, C. de.O. et al., Óleos essenciais no manejo da podridão mole em pimentão. *Revista Brazilian Journal of Development*, Curitiba, v. 6, n.12, p.101759-101770 dec. 2020. ISSN 2525-8761
- ALVES, F.M. de. F. Potencial fungitóxico do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* no controle de alternariose em sementes de feijão-caupi. 2019. 38 f. Dissertação (Mestrado em Sistemas Agroindustriais) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia Agroalimentar, 2019)
- AZEVEDO FILHO, J.D. A cultura da alface. PAES MANSO, T.C.P. et al., Boletim Técnico Aspectos Fitossanitários da Cultura da Alface. Instituto Biológico. n. 29. 2017. p. 9-14.
- BARROSO, K.A. Ocorrência de *Pectobacterium aroidearum* e manejo alternativo da podridão mole. 2018. 73 f. Dissertação (Mestrado em Horticultura Irrigada) – Universidade do Estado da Bahia. Departamento de Tecnologia e Ciências Sociais. PPGHI. Campus III, 2018
- CHAGAS, R.R. Reação de clones de batata tolerantes ao calor à pinta preta (*Alternaria* spp.), podridão mole (*Pectobacterium carotovorum*), PVY e PVX. 2017. 65 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Lavras. Lavras, MG, 2017
- CORRÊA, R. Produção da alface se consolida com comercialização próxima a R\$ 1 milhão em MS. Disponível em: <https://www.douradosagora.com.br/noticias/rural/producao-da-alface-se-consolida-com-comercializacao-proxima-a-r-1-milhao-em-ms>. Acesso em 04 de Fev. de 2020
- CRUZ, R. da. Curva de acúmulo de nutrientes em dois cultivares de alface crespa. 2019. 57 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrônomicas, Botucatu, 2019
- ECHER, R. et al., Alface à mesa: implicações sócio-econômicas e ambientais da semente ao prato. *Revista Thema*, Volume 13, nº 3, p. 17 a 29, 2016
- FELIX, K.C. da. S. et al., Manejo da podridão mole em hortaliças. In: GAMA, M.A.S. et al., Estado da arte em fitobacterioses tropicais. Recife: EDUFRPE, 2016. p. 177-192.
- FIALHO, R.O. et al., Efeito fungitóxico de óleos essenciais sobre *Phakopsora euvitis*, agente causal da ferrugem da videira. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo-SP, v. 82, n. 1, p. 1-7, 2015.
- LOBO, L. das. D. Custo de Produção e rentabilidade do Cultivo de Alface (*Lactuca sativa* L.) em Silvânia – GO. 2018. 32 f. Trabalho de Conclusão de Curso – Curso de Agronomia – Centro Universitário de Anápolis – GO, UniEvangélica, 2018

- LUZ, J.M.Q. et al., Teor, rendimento e composição química do óleo essencial de manjeriço sob doses de cama de frango. *Horticultura Brasileira* 27: 349-353, 2009
- MAIA, J.T.L.S. Cultivo de Plantas Medicinais e Aromáticas em Consórcio com Hortaliças. 2007. 75p. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Fitotecnia – Universidade Federal de Minas Gerais, Montes Claros, 2007
- MARTINS, A.G.L. de A. Atividade antibacteriana dos óleos do manjeriço (*Ocimum basilicum* Linnaeus) e do gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) frente a linhagens de *Escherichia coli* enteropatogênicas isoladas de hortaliças. 2010. 179p. Tese (doutorado) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, 2010.
- PEREIRA, A.I.S. Atividade antibacteriana e caracterização físico-química de óleos essenciais extraídos das plantas medicinais comumente utilizadas pela população de São Luís do Maranhão. 2017. 104 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. São José do Rio Preto, 2017
- POSSEL, R.D. Atividade inseticida e repelente de plantas do Cerrado no controle alternativo de do mosquito da *Aedes aegypti*. 2019. 113 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Tocantins - Campus Universitário de Gurupi - Curso de Pós-Graduação (Mestrado) em Biotecnologia. Gurupi, TO, 2019
- RESENDE, G.M. de.; YURI, J.E.; COSTA, N. D. Cultivo de alface-crespa no Submédio do Vale do São Francisco. Instruções Técnicas da Embrapa Semiárido. Embrapa Semiárido, Petrolina, PE, 2018
- REZENDE, J.S. Caracterização epidemiológica da podridão mole da couve-chinesa causada por *Pectobacterium atrosepticum*. 2017. 53 f. Dissertação de mestrado – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Recife, BR-PE, 2017
- SANTOS, C.D. dos. Sistema de produção de alface em cultivo convencional e cultivo hidropônico: alimento de qualidade? 2018. 40 f. Dissertação de Mestrado (Ciências Ambientais - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Unioeste/Campus Toledo) – Toledo, PR, 2018
- SANTOS, F.D.P. dos. Rendimento, componentes do óleo essencial e propagação de genótipos de Manjeriços no Distrito Federal. 2017. 87 f. Dissertação de mestrado – Universidade de Brasília / Faculdade de Agronomia e Veterinária, 2017
- SILVA, J. B. da. Influência de diferentes concentrações de extrato de algas na produtividade de alface (*Lactuca sativa* L.). 2018. Trabalho de Conclusão de Curso – Curso de Agronomia – Centro Universitário de Anápolis – GO, UniEvangélica, 2018.
- SOUSA, J.P. Aplicação dos fitoconstituintes carvacrol e 1,8-cineol como sanitizantes naturais em hortaliças folhosas minimamente processadas. 2012. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Nutrição, 2012.
- VIVIAN, P.G. Atividade Antimicrobiana de Óleos Essenciais de *Origanum vulgare* (orégano) e *Ocimum basilicum* (manjeriço) e sua Aplicação em Massa para Embutido Carne. 2017. 51 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação

em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas,
2017