

CONTROLE DE *Xanthomonas axonopodis* UTILIZANDO ÓLEO ESSENCIAL DE MELALEUCA (TEA TREE OIL)

Luis Carlos da Silva Soares ¹; Clinton Júnior Garcia Quintão ²; Fernanda Aparecida Pires Fazon³; Natália Risso Fonseca ⁴

1 Luis Carlos da Silva Soares, Bolsista IFMG, Engenharia Florestal, IFMG Campus São João Evangelista, São João Evangelista- MG; luiscbbvvp@gmail.com

2 Clinton Júnior Garcia Quintão, Agronomia, IFMG Campus São João Evangelista, São João Evangelista- MG;

3 Fernanda Aparecida Pires Fazon, coordenadora: Pesquisador do IFMG, São João Evangelista- MG; fernanda.fazon@ifmg.edu.br

4 Natália Risso Fonseca, Orientadora: Pesquisador do IFMG, São João Evangelista- MG; natalia.fonseca@ifmg.edu.br

RESUMO

A mancha bacteriana causada por *Xanthomonas axonopodis* é uma das principais bacterioses de viveiros de mudas clonais de eucalipto. De difícil controle, o manejo da doença envolve diferentes medidas visando a redução das fontes de inóculo e as condições favoráveis à infecção. Desse modo, existe a necessidade em buscar novas estratégias eficazes para integrar o manejo desse patógeno nos viveiros. Atualmente, muitos são os estudos que visam combater diferentes microrganismos com o uso de óleos essenciais. Um desses óleos que possui grande espectro de inibição de bactérias é o óleo de *Melaleuca alternifolia*. Deste modo, este trabalho objetivou avaliar a capacidade de inibição de *X. axonopodis*, em condições *in vitro*, utilizando o óleo de melaleuca, também conhecido como Tea Tree Oil (TTO), por meio de um antibiograma. O teste foi feito através da técnica de difusão em disco, avaliando oito diluições do óleo essencial (100, 50, 25, 12,5, 10, 7,5, 5 e 2,5 % v/v). O teste foi feito em placas de Petri contendo meio de cultura inoculado com uma suspensão da bactéria *X. axonopodis* na concentração de 10⁸ UFC/mL. Três discos de papel embebidos com uma das diluições do óleo foram depositados na superfície do meio. O ensaio foi realizado em DIC com oito diluições do óleo e cinco repetições, sendo cada placa contendo os discos considerada uma unidade experimental. Adicionalmente, foram avaliados dois controles, um antibiótico e o próprio diluente (DMSO). Os halos de inibição formados foram medidos diariamente após transcorridas 24h. Dentre as diluições avaliadas, a diluição de 12,5% v/v configurou-se como a Concentração Mínima Inibitória (CIM), com diâmetro médio dos halos de inibição de 5,6 mm. Diluições inferiores a esta não foram capazes de conter o crescimento bacteriano. As diluições de 50 e 100% v/v não diferiram estatisticamente entre si, apresentando halos de inibição com diâmetros médios de 11,7 e 14,3 mm, respectivamente.

INTRODUÇÃO:

Entre as doenças bacterianas de maior importância para a cultura do eucalipto, a mancha bacteriana causada, predominantemente, pela espécie *Xanthomonas axonopodis* é uma das principais doenças em viveiros clonais de eucalipto, podendo causar danos significativos em materiais genéticos suscetíveis (GONÇALVES et al., 2008; FERRAZ et al., 2018).

O manejo da mancha bacteriana, atualmente, envolve diferentes estratégias visando reduzir as fontes de inóculo e evitar as condições favoráveis à infecção. No entanto, existe a necessidade da integração de novas medidas de manejo eficazes, sendo que o estudo de métodos de controle alternativo, como a utilização de óleos essenciais, apresenta-se como uma medida que deve ser explorada (BAJPAI et al., 2011).

Diversas pesquisas demonstram a eficiência da utilização de extratos brutos ou óleos essenciais obtidos de uma grande variedade de espécies botânicas no controle de microrganismos. Das espécies arbóreas, a *Melaleuca alternifolia* possui importância na indústria farmacêutica por produzir o Tea Tree Oil (TTO) o qual possui ação fungicida e bactericida (OLIVEIRA, 2011, ZHANG et al., 2018; BRUN, 2019).

Trabalhos na literatura demonstram o poder do TTO frente a diversas bacterioses. Trabalho de Oliva e colaboradores (2018) apresentaram efeito positivo contra *Staphylococcus aureus* sensível à *meticilina* (MSSA), *Escherichia coli* e cepas clínicas de *S. aureus* resistente à *meticilina* (MRSA), beta lactamases de espectro estendido produtoras de *Klebsiella pneumoniae* sensível aos carbapenem (ESBL-CS-Kp), *K. pneumoniae* resistente a carbapenem (CR-Kp), *Acinetobacter baumannii* (CR-Ab) e *Pseudomonas aeruginosa* (CR-Pa). Ainda, é visto na literatura o potencial uso desse óleo no controle dos fungos *Penicillium expansum* e *Mycosphaerella fijiensis* “*in vitro*” (REUVENI; BARBIER, 2020).

Visto o espectro de ação do TTO em diversas espécies de bactérias, buscou-se nesse trabalho avaliar o potencial do TTO frente à *X. axonopodis* visando explorar o seu potencial uso como uma forma de controle alternativo e sustentável a ser inserido no manejo da mancha bacteriana no eucalipto.

METODOLOGIA:

Os ensaios foram conduzidos no Laboratório de Fitopatologia do Instituto Federal de Minas Gerais – *campus* São João Evangelista (IFMG-SJE), localizado na cidade de São João Evangelista - MG, a qual situa-se a uma altitude média de 689 metros, latitude sul de 18° 32' e longitude oeste de 42° 45'.

Nos ensaios foi utilizado o isolado BSC 475 de *X. axonopodis*, obtido a partir de folhas doentes de eucalipto coletadas no sul da Bahia (GONÇALVES et al., 2003) e disponibilizado pelo Laboratório de Patologia Florestal da Universidade Federal de Viçosa. A bactéria foi semeada em placas de Petri contendo meio de cultura Luria-Bertani (meio LB) (SAMBROOK et al., 1989) e incubada a 28°C por 24h.

Após o crescimento do isolado bacteriano nas placas contendo meio LB sólido, a bactéria foi repicada para frascos Erlenmeyer contendo meio LB líquido e mantidas incubadas a 28°C, sob agitação, por 18 a 24 horas ou até que o meio começasse a ficar nitidamente turvo.

O óleo de *M. alternifolia* foi adquirido comercialmente. Este foi diluído em dimetilsulfóxido (DMSO) nas proporções de 100; 50; 25; 12,5; 10; 7,5; 5.0 e 2.50% v/v. Para a realização dos ensaios, foram preparadas escalas de diluições do óleo, em tubos de ensaio numerados de 1 a 8 conforme as diferentes diluições. No tubo 1, correspondente a 100%, foi colocado 1 mL do óleo puro (100%) e nos demais tubos (2 a 8) 0,5 mL de DMSO à 0,5 mL do tubo anterior.

Para os discos utilizados no antibiograma foi empregado papel-filtro cortado com o auxílio de um furador de papel comum, de 0,6 mm de diâmetro. Após a confecção dos discos, eles foram acondicionados em um recipiente e esterilizados em estufa, por um período de 4 horas, a 100°C.

O antibiograma, realizado por meio do teste de difusão em disco, foi adaptado da metodologia descrita por Romeiro (2001). Para a realização do teste, foi feita a montagem de duas camadas de meio de cultura nas placas de Petri. A primeira camada, denominada camada básica, ficou em contato com a placa de Petri, com a finalidade de garantir a uniformidade e o correto assentamento da segunda camada, chamada de sobrecamada, a qual abrigou a suspensão bacteriana. Para o preparo da camada básica foi dispensado e esterilizado o meio de cultura ágar-água a 2% em Erlenmeyer. Posteriormente, o meio foi fundido, aguardando seu resfriamento a 50 °C. Após atingir a temperatura correta, foi vertido na placa de maneira a formar uma camada uniforme.

A segunda camada foi preparada utilizando um meio semissólido de ágar-água (0,6 a 0,8%). Com a temperatura do meio inferior a 50°C, aferida por um termômetro, foi adicionado 100 µL da suspensão de *X. axonopodis*, cultivada em meio LB líquido ajustada para a concentração de 10⁸ UFC/mL, a cada tubo de ensaio contendo 8 mL do meio, fazendo o tubo girar na palma das mãos para homogeneizar rapidamente o conteúdo e atentando-se para não se formar bolhas de ar. Em seguida, o conteúdo do tubo foi vertido rapidamente na superfície da camada básica, formando assim a sobrecamada.

Após a solidificação, três discos de papel foram embebidos em 10 µl das diluições do óleo a serem testadas e posicionados equidistantes na superfície da sobrecamada em cada placa de Petri. Em seguida, as placas foram seladas com filme plástico e incubadas em B.O.D à 28°C.

O diâmetro dos halos de inibição formados foi medido diariamente a partir de 24h após a montagem do ensaio até o total crescimento das colônias na placa de Petri, sendo que de cada diâmetro obtido foi descontado o diâmetro do disco.

Os diâmetros dos halos de inibição foram interpretados de acordo com os critérios de interpretação preconizados pelo Committee For Clinical Laboratory Standards International (1997). A CIM (Concentração Inibitória Mínima) foi considerada como a menor diluição do tratamento testado capaz de inibir o desenvolvimento bacteriano.

O teste foi realizado empregando um Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC) composto pelo óleo essencial de *M. alternifolia* em oito diluições e cinco repetições, além de um controle positivo (antibiótico Rifamicina) e um negativo (DMSO), formando um esquema 8x5+2. Cada placa contendo três discos foi considerada uma unidade experimental. Para a comparação das diluições com os controles foi adotado o

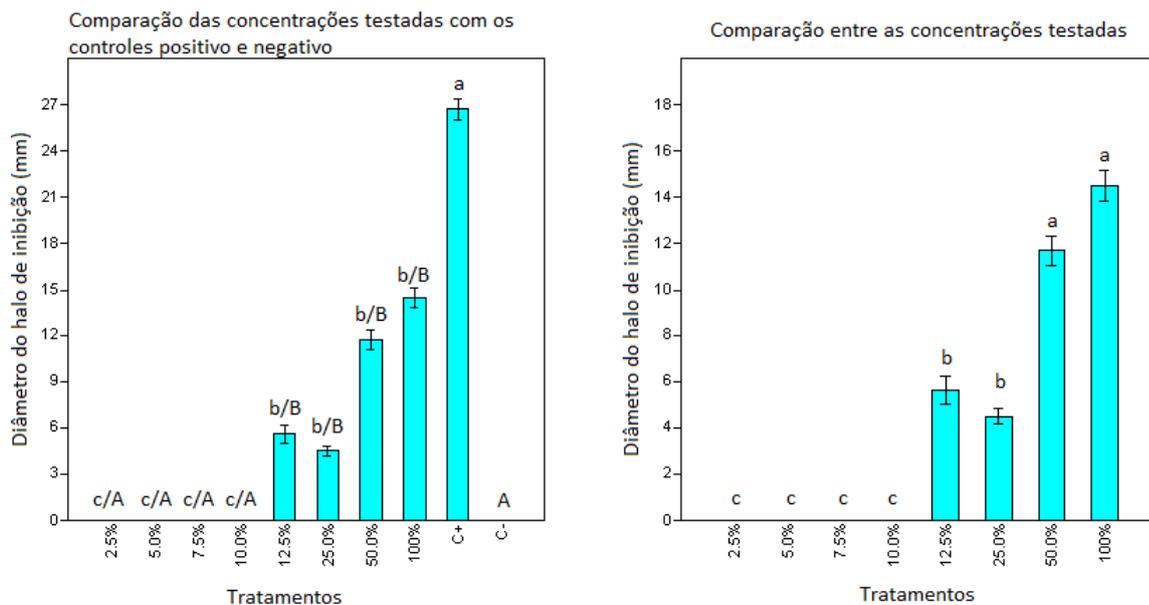
Teste de Dunnett (0,05) e para a comparação das médias obtidas entre as diluições empregou-se o Teste de Tukey (0,05).

RESULTADOS E DISCUSSÕES:

Das diluições do óleo de melaleuca avaliadas constatou-se uma ineficiência na inibição do crescimento bacteriano para os valores $\leq 10\%$ v/v (Figura 1). Todos os tratamentos testados que inibiram o crescimento bacteriano diferenciaram-se dos controles positivos e negativos pelo teste de Dunnett. O controle positivo foi superior a todas as concentrações avaliadas.

O controle negativo (DMSO) não teve poder de inibição de *X. axonopodis* o que, quando comparado com os tratamentos que foram efetivos, permite inferir que o DMSO não interferiu no efeito inibitório do óleo nas diluições avaliadas.

Figura 1 – Comparação das médias de halos de inibição obtidas a partir das Diluições testadas com os controles positivos e negativos (à esquerda) e comparação dos resultados obtidos entre as concentrações testadas (à direita).



Na figura à esquerda, as letras minúsculas referem-se à comparação das médias obtidas nas diluições em relação ao controle positivo e as letras maiúsculas referem-se à comparação das médias com o controle negativo (Teste de Dunnett, 0.05). Na figura à direita, as letras minúsculas referem-se a comparação das médias obtidas entre as diluições testadas. Valores em % referem-se as diluições do óleo de melaleuca avaliadas. C+ Refere-se ao controle positivo (antibiótico Rifamicina) e C- refere-se ao controle negativo (DMSO) (Tukey, 0.05). Fonte: Autores (2021).

A comparação entre as médias obtidas apresentou diferenças entre as diluições. As diluições de 50% v/v e 100% v/v diferenciaram-se dos demais tratamentos. Para estas observou-se, respectivamente, halos de inibição médios de 14,3 mm e 11,7 mm, configurando os maiores valores entre as diluições testadas. As diluições de 12,5% v/v e 25% v/v não diferiram entre si e apresentaram diâmetros de 5,6 mm e 4,5 mm, respectivamente.

Das diluições avaliadas com potencial inibitório *in vitro* de *X. axonopodis*, a concentração de 12,5% v/v configurou-se como a Concentração Mínima Inibitória (CIM). Este valor está próximo ao relatado por Lucas et al. (2012), onde foi verificado a CIM do óleo de *M. alternifolia* próximo à 10% na inibição de *X. vesicatoria*.

O amplo espectro de inibição de *M. alternifolia* está vinculado, principalmente, a alta concentração do composto ativo conhecido como terpien-4-ol, presente em torno de 36,6% da composição total do óleo essencial (CASTELO et al., 2012). Outros estudos encontraram variações na concentração do terpien-4-ol nos óleos essenciais obtidos de melaleuca, como os estudos de Silva et al. (2013) e de Ramos et al. (2012) que encontraram, respectivamente, 46,38 e 40% do composto terpineno-4-ol nos óleos avaliados. Essa variação existente na concentração do composto terpien-4-ol presente nos óleos essenciais de melaleuca, como apresentado entre os estudos, pode justificar a pequena diferença entre a CIM encontrada nesse trabalho e o estudo de Lucas et al. (2012).

CONCLUSÕES:

Os resultados deste trabalho mostraram o potencial do uso do óleo de *M. alternifolia* (TTO) no controle de *X. axonopodis* *in vitro*, por meio do seu efeito de inibição do crescimento bacteriano em diluições superiores a 12,5% v/v obtido a partir do óleo essencial puro.

Dessa forma, os resultados aqui apresentados configuram-se como ponto de partida para uma pesquisa estendida sobre o uso do TTO em ensaios *in vivo*. Esses ensaios serão importantes para avaliar a interação ambiente-planta-solução de TTO, ensaios econômicos e métodos de aplicação em plantas, para que essa se torne uma possível nova medida de controle para auxiliar no manejo da mancha bacteriana em *Eucalyptus*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- BAJPAI, V. K.; SHARMA, A.; BAEK, K. H. Modo de ação antibacteriano do óleo essencial de frutas de *Cudrania tricuspidata*, afetando a permeabilidade da membrana e as características da superfície de patógenos de origem alimentar. **Controle de Alimentos** 32 582-590. 10.1016 / j. foodcont.2013.01.032, 2013.
- BRUN, Paola et al. In vitro antimicrobial activities of commercially available tea tree (*Melaleuca alternifolia*) essential oils. **Current microbiology**, v. 76, n. 1, p. 108-116, 2019.
- CASTELO, A. V. M., AFONSO, S. R., de Melo, Rafael R., Del Menezzi, Cláudio H. S., Camillo, Julcéia, Vieira, Roberto F. Rendimento e composição química do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Chell, na região do Distrito Federal. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias** [en linea]. 2013, 8(1), 143-147[fecha de Consulta 24 de Marzo de 2021]. ISSN: 1981-1160.
- Committee For Clinical Laboratory Standards International (CLSI). **Approved standard M2-A7: Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests**. 7. ed. Wayne, PA, 1997. 92 p.
- FERRAZ, H. G. M.; BADEL, J. L.; GUIMARÃES, L. M. S.; REIS, B. P.; TÓTOLA, M. R.; GONÇALVES, R. C.; ALFENAS, A. C. *Xanthomonas axonopodis* pv. *eucalyptorum* pv. nov. Causing Bacterial Leaf Blight on Eucalypt in Brazil. **The Plant Pathology Journal**, Rio Branco, v.34, n.4, p. 269-285, 2018.
- GONÇALVES, R. C.; LAU, D.; OLIVEIRA, J. R.; MAFFIA, L. A.; CASCARDO, J. C. M.; ALFENAS, A. C. **Etiology of bacterial leaf blight of eucalyptus in Brazil. Tropical Plant Pathology**. Brasília, v. 33, n. 3, p. 180-188, 2008.
- LUCAS, G.C, et al. "Antibacterial activity of essential oils on *Xanthomonas vesicatoria* and control of bacterial spot in tomato." **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 47.3 (2012): 351-359.
- OLIVA, A. et al. High potency of *Melaleuca alternifolia* essential oil against multi-drug resistant gram-negative bacteria and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Molecules**, v. 23, n. 10, p. 2584, 2018.
- OLIVEIRA, A. R. M. F. Produção de óleo essencial de mentha x piperita var. Citrata sob diferentes condições de manejo. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, BA, Brasil, 83p., 2011.

REUVENI, M; BARBIER, M. VITI, Agnelo J. Essential tea tree oil as a tool to combat black Sigatoka in banana. **Outlooks on Pest Management**, v. 31, n. 4, p. 180-186, 2020.

SAMBROOK, J.; FRITCH, E. F; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual** (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, ed. 2, 1989. 1626 p.

SANTOS, J.C., FILHO, C.D. C. GUIMARÃES, A.G., 2011. Atividade antimicrobiana in vitro dos óleos essenciais de orégano, alho, cravo e limão sobre bactérias patogênicas isoladas de vôngole. **Semina: Ciências Agrárias** 32, 1557–1564. doi:10.5433/1679-0359.2011. v32. p1557

SILVA, S., R., S. et. al. Análise dos constituintes químicos e da atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel, **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 6, n. 1, p.63-70, 2003.

ZHANG, Xiaofeng et al. In vitro evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of *Melaleuca alternifolia* essential oil. **BioMed research international**, v. 2018, 2018.