



Ação antifúngica de *Lavandula stoechas* subsp. *luisieri* e *Lavandula pedunculata* no controlo de fungos isolados de medronho

Marciana Baptista Soares

Orientadores

Professora Doutora Cristina Maria Baptista Santos Pintado

Mestre Joana Lopes Domingues

Relatório de Estágio apresentado à Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Licenciatura em Produção de Alimentos e Nutrição Humana, realizado sob a orientação científica da Professora Doutora Cristina Maria Baptista Santos Pintado, do Instituto Politécnico de Castelo Branco, e da Mestre Joana Lopes Domingues, do Centro de Biotecnologia de Plantas da Beira Interior.

Novembro, 2020

Composição do júri

Presidente do júri

Grau académico, nome do presidente do júri”

Vogais

Grau académico, nome do presidente do júri”

Categoria profissional e o nome da Instituição

Grau académico, nome do presidente do júri”

Categoria profissional e o nome da Instituição

Grau académico, nome do presidente do júri”

Categoria profissional e o nome da Instituição

Agradecimentos

Como qualquer experiência na vida, completar mais uma etapa da vida não envolve apenas uma pessoa, mas existem várias pessoas que me apoiaram direta ou indiretamente ao longo desta jornada. De modo particular gostaria de agradecer:

A Deus, minha fonte inesgotável de fé e força maior.

Ao Instituto Politécnico de Castelo Branco (IPCB) e à cidade de Castelo Branco pelo acolhimento durante estes 4 anos e, de um modo particular, aos meus docentes da Escola Superior Agrária que muito contribuíram significativamente para a minha formação.

À minha orientadora, Professora Doutra Cristina Pintado, pelo seu apoio e disposição durante sua orientação.

À minha coorientadora, Joana Domingues por me ter guiado, pela compreensão e por estar sempre à disposição, partilhando os seus conhecimentos e ajudando sempre que precisei até eu conseguir concluir este trabalho.

À engenheira Manuela Goulão, do Laboratório Microbiologia da Escola Superior Agrária, pela constante ajuda e disponibilidade em auxiliar na parte experimental.

À minha mãe (*in memoriam*) que onde estiveres, espero que tenhas orgulho de mim.

Ao meu pai e ao meu irmão, por estarem sempre ao meu lado, pelo apoio incondicional, força e inspiração necessária para ultrapassar mais uma etapa da minha vida.

Ao meu companheiro Flaviano T. B. da Costa Silva pelo incentivo, paciência, amor e dedicação.

Aos meus colegas e amigas do curso, pelo companheirismo e pela partilha de experiências que foram proporcionados durante o nosso percurso académico, repleta por todos os momentos que nos fizeram crescer, amadurecer e aprender. Nunca esquecerei a forma como me mostraram que aquilo que é humano vai além da fronteira.

Ao Ministério de Educação de Timor-Leste pela bolsa concedida.

A todos aqueles que não mencionei aqui, mas com os quais convivi e que jamais irei esquecer. Pelo vosso carinho e amizade, Muito Obrigada.

Resumo

Este trabalho teve como principal objetivo verificar a atividade antifúngica de produtos naturais de *Lavandula stoechas* subsp. *luisieri* e *Lavandula pedunculata* contra nove fungos isolados de medronho: *Penicillium simile*, *Penicillium crustosum*, *Penicillium glabrum*, *Aspergillus tubingensis*, *Aspergillus niger*, *Alternaria* secção *Alternaria*, *Meyerozyma guilliermondii*, *Aureobasidium* sp. e *Hanseniaspora* sp.. Foram também testadas duas culturas de referência a *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 e *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404.

As partes aéreas das plantas foram recolhidas em época de floração na Serra da Malcata e os óleos essenciais e os extratos aquosos foram obtidos por hidrodestilação em aparelho de *Clevenger*. Estes sub-produtos foram testados numa primeira fase quanto à sua ação antifúngica, usando o método de difusão em placa, com disco e com gota. Como ambos os óleos essenciais apresentaram ação inibitória nos ensaios prévios, foram realizados ensaios para a determinação da concentração mínima inibitória (MIC) e da concentração mínima fungicida (MFC). A composição química dos óleos essenciais das duas espécies foi efetuada através de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS). Testou-se ainda uma formulação de revestimento edível à base de quitosano, previamente definida a sua composição, com incorporação do óleo essencial que demonstrou maior atividade antifúngica.

Dos resultados obtidos, ambos os óleos essenciais demonstraram atividade antifúngica contra as culturas usadas, no entanto foi o óleo essencial de *L. stoechas* subsp. *luisieri* que demonstrou uma maior eficácia, com valores de MIC e MFC inferiores, comparativamente ao óleo essencial de *L. pedunculata*. Para o óleo essencial de *L. stoechas* subsp. *luisieri*, a MIC mais baixa foi encontrada contra as leveduras *Aureobasidium* sp., *Hanseniaspora* sp. e *S. cerevisiae* ATCC 9763, com valores de 0,12% (v/v). Para os mesmos microrganismos obtiveram-se também os valores de MFC mais baixos, com 0,23% (v/v). No caso do óleo essencial de *L. pedunculata* a MIC mais baixa foi encontrada contra *Aureobasidium* sp. e *S. cerevisiae* ATCC 9763, com valores de 0,23% (v/v) e MFC de 0,47% (v/v). No caso do óleo essencial de *L. stoechas* subsp. *luisieri*, com as concentrações testadas, não foi possível determinar a MFC relativamente a três microrganismos, isto é, a MFC será superior à concentração máxima testada (>7,47%), enquanto que para o óleo essencial de *L. pedunculata* o número sobe para quatro culturas, em que o valor da MFC é superior à concentração máxima testada (>7,47%). De acordo com os resultados de atividade antifúngica dos filmes com o óleo essencial, verificou-se a ausência desta ação para a *Alternaria* secção *Alternaria*, *Aspergillus tubingensis* e *Aspergillus niger*. Enquanto as culturas mais suscetíveis à ação antifúngica foram a *S. cerevisiae* ATCC 9763 e *Meyerozyma guilliermondii*, com valores médios de halos de inibição de 15 e 13 mm, respetivamente.

Palavras chave

Óleo essencial; Extrato aquoso; Concentração mínima inibitória; Concentração mínima fungicida; Revestimentos edíveis antimicrobianos

Abstract

The main objective of this work was to verify the antifungal activity of *Lavandula stoechas* subsp. *luisieri* and *Lavandula pedunculata* natural products against nine fungi isolated from strawberry tree fruits. The isolates belong to different taxonomic groups, namely *Penicillium simile*, *P. crustosum*, *P. glabrum*, *Aspergillus tubingensis*, *A. niger*, *Alternaria* section *Alternaria*, *Meyerozyma guilliermondii*, *Aureobasidium* sp. and *Hanseniaspora* sp., and as well as two reference cultures (*Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 and *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404).

The plants were collected during flowering season, in the Serra da Malcata and the essential oils and extracts of flowers and leaves were obtained by hydrodistillation in *Clevenger* apparatus, which were tested firstly for their antifungal action, using the method of diffusion in plate, with disc and with drop. As both essential oils presented an inhibitory action in the previous trials, subsequent tests were performed to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum fungicide concentration (MFC). The chemical composition of the essential oils of the two species was performed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). It was also tested a formulation of edible coating based on chitosan, previously defined its composition, with incorporation of the essential oil that showed greater antifungal activity.

Concerning the results obtained, both essential oils demonstrated an antifungal activity against the cultures used, nevertheless, the essential oil of *L. stoechas* subsp. *luisieri* demonstrated a higher efficacy, with lower MIC and MFC values, compared to the *L. pedunculata*. The lowest MIC for *L. stoechas* subsp. *luisieri* essential oil was found against *Aureobasidium* sp., *Hanseniaspora* sp. and *S. cerevisiae* ATCC 9763, with values of 0.12% (v/v). Considering the same microorganisms, the lowest MFC values were also found for these with 0.23% (v/v). In the case of *L. pedunculata* essential oil, the lowest MIC was found against *Aureobasidium* sp. and *S. cerevisiae* ATCC 9763, with MIC values of 0.23% (v/v) and MFC values of 0.47% (v/v). In the case of *L. stoechas* subsp. *luisieri* essential oil, with the concentrations tested, it was not possible to determine MFC for three microorganisms, because the MFC values will be higher than the maximum concentration tested (>7.47%), while for the essential oil of *L. pedunculata* the number rises to four cultures, in which the value of the MFC is higher than the maximum concentration tested (>7.47%). According to the results of antifungal activity of the coating with the essential oil. No antifungal action has been verified for the *Alternaria* section *Alternaria*, *Aspergillus tubingensis* and *Aspergillus niger*, while the cultures most susceptible to antifungal action were *S. cerevisiae* ATCC 9763 and *Meyerozyma guilliermondii*, with mean values of inhibition halos of 15 and 13 mm, respectively.

Keywords

Essential oil; Plant extracts; Minimum Inhibitory Concentration; Minimum Fungicide Concentration; Edible antimicrobial coatings

Índice Geral

| | | |
|-------------|--|-----------|
| I. | Introdução | 1 |
| II. | Revisão Bibliográfica | 2 |
| 1. | <i>Lavandula stoechas</i> subsp. <i>luisieri</i> e <i>Lavandula pedunculata</i> | 2 |
| 1.1 | Caracterização morfológica e distribuição geográfica em Portugal | 2 |
| 1.2 | Composição química dos óleos essenciais | 3 |
| 1.3 | Atividade antimicrobiana dos subprodutos | 4 |
| 2. | Características dos fungos filamentosos estudados | 6 |
| 2.1 | <i>Alternaria</i> | 6 |
| 2.2 | <i>Aspergillus</i> | 6 |
| 2.3 | <i>Penicillium</i> | 7 |
| 3. | Características dos fungos unicelulares estudados | 7 |
| 3.1 | <i>Aureobasidium</i> | 7 |
| 3.2 | <i>Hanseniaspora</i> | 8 |
| 3.3 | <i>Meyerozyma</i> | 8 |
| 3.4 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 9 |
| 4. | Modo de ação e avaliação da atividade antimicrobiana | 9 |
| 5. | Aplicações dos subprodutos de <i>Lavandula</i> spp. | 10 |
| 5.1 | Revestimentos edíveis com atividade antimicrobiana | 10 |
| 5.2 | Outras aplicações | 10 |
| III. | Materiais e Métodos | 11 |
| 1. | Material vegetal e obtenção dos subprodutos | 11 |
| 1.1 | Recolha do material vegetal | 11 |
| 1.2 | Extração dos óleos essenciais e obtenção dos extratos aquosos e hidroetanólicos | 11 |
| 2. | Análise dos compostos químicos dos óleos essenciais | 12 |
| 3. | Reagentes, meios de cultura e suspensões fúngicas | 13 |
| 4. | Ensaio prévios da atividade antifúngica | 13 |
| 5. | Método da microdiluição em caldo para determinação da concentração mínima inibitória (MIC) | 14 |
| 6. | Determinação da concentração mínima fungicida (MFC) | 15 |
| 7. | Revestimentos edíveis | 15 |
| 7.1 | Preparação das soluções filmogénicas e dos filmes | 15 |
| 7.2 | Avaliação das propriedades físicas e da espessura | 16 |
| 7.3 | Avaliação da ação antifúngica dos revestimentos | 18 |
| 8. | Análise estatística | 18 |
| IV. | Resultados e Discussão | 19 |
| 1. | Rendimentos de extração..... | 19 |
| 2. | Caracterização química dos óleos essenciais | 19 |
| 3. | Verificação da ação antifúngica dos óleos essenciais e dos extratos | 21 |
| 4. | Determinação dos valores de MIC e de MFC | 21 |
| 5. | Caracterização e atividade antifúngica dos revestimentos | 23 |
| V. | Considerações Finais | 27 |
| VI. | Referências Bibliográficas | 28 |

Índice de Figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1- <i>Lavandula stoechas</i> subsp. <i>luisieri</i> (Rozeira) Rozeira (A) e <i>Lavandula pedunculata</i> (Miller) Cavanille (B)..... | 3 |
| Figura 2- Método de microdiluição para determinar a concentração mínima inibitória (MIC) | 15 |
| Figura 3- Texturómetro TA-XTplus (Stable Micro Systems) usado na análise das propriedades físicas dos filmes..... | 18 |
| Figura 4- Microplaca da concentração mínima inibitória (MIC) da cultura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763 | 22 |

Lista de Tabelas

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Atividade antifúngica de subprodutos de <i>L. stoechas</i> subsp. <i>luisieri</i> | 4 |
| Tabela 2- Atividade antifúngica de subprodutos de <i>L. pedunculata</i> | 5 |
| Tabela 3- Identificação dos microrganismos isolados de medronho | 14 |
| Tabela 4- Rendimento de extração dos subprodutos de <i>L. stoechas</i> subsp. <i>luisieri</i> e <i>L. pedunculata</i> | 19 |
| Tabela 5- Compostos maioritários dos óleos essenciais de <i>L. stoechas</i> subsp. <i>luisieri</i> e de <i>L. pedunculata</i> | 20 |
| Tabela 6- Resultados da atividade antifúngica dos óleos essenciais (OE), extratos aquosos (EA) e extratos hidroetanólicos (EHET) de <i>L. stoechas</i> subsp. <i>luisieri</i> | 21 |
| Tabela 7- Resultados da determinação dos valores de MIC e MFC dos óleos essenciais de <i>L. stoechas</i> subsp. <i>luisieri</i> e <i>L. pedunculata</i> | 23 |
| Tabela 8- Aspecto visual e características de corte e manipulação dos filmes estudados | 24 |
| Tabela 9- Propriedades mecânicas das quatro amostras de filmes testados | 25 |
| Tabela 10 - Resultados da avaliação da atividade antimicrobiana dos filmes, através da medição dos diâmetros das zonas de inibição (mm) | 26 |

Lista de Abreviaturas, Siglas e Acrónimos

OE- Óleo Essencial

EA- Extrato Aquoso

EHET- Extrato Hidroetanólico

MIC- *Minimum Inhibitory Concentration*

MFC- *Minimum Fungicide Concentration*

PDA- *Potato Dextrose Agar*

YGP- *Yeast Glucose Peptone*

PDB- *Potato Dextrose Broth*

ATCC- *American Type Culture Collection*

v/v- volume/volume

mm- milímetro

µl/ml- microlitro/mililitro MO- Microrganismos