

Atividade do Óleo Essencial de Tomilho (*Thymus vulgaris* L.) Contra Fungos Fitopatogênicos

Activity of Thyme (*Thymus vulgaris* L.) Essential Oil Against Phytopathogenic Fungi

Adriano Lopes Romero^{a*}; Vânia Specian^b; Rodrigo Cardoso de Oliveira^c; Sergio Paulo Severo de Souza Diniz^d

Resumo

O tomilho (*Thymus vulgaris*) é uma planta aromática largamente utilizada na culinária e na indústria farmacêutica e de cosméticos. Das folhas desta planta se obteve, a partir de hidrodestilação utilizando aparelho de Clevenger modificado, um óleo essencial constituído por timol (50%), *p*-cimeno (20%), γ -terpineno (18%), carvacrol (4,5%) e borneol (1,5%). Este óleo essencial foi testado quanto sua atividade antifúngica sobre microrganismos causadores de doenças em diferentes culturas de importância econômica: *Myrothecium verrucaria*, *Corynespora cassiicola*, *Erwinia psidii*, *Sclerotinia minor* e *Colletotrichum musae*. A concentração do óleo essencial de tomilho que promoveu completa inibição dos microrganismos testados variou na faixa de 5 a 200 $\mu\text{L/mL}$, sendo mais eficaz para o controle de *C. musae* (5 $\mu\text{L/mL}$), *S. minor* (10 $\mu\text{L/mL}$), *F. moniliforme* (10 $\mu\text{L/mL}$) e *C. cassiicola* (15 $\mu\text{L/mL}$).

Palavras-Chave: Tomilho. Óleos essenciais. Atividade antifúngica.

Abstract

The thyme (*Thymus vulgaris*) is an aromatical plant used in the culinary and in the pharmaceutical industry and of cosmetics. Of leaves of this plant was gotten, from hydrodistillation using a Clevenger-type apparatus, an essential oil consisting by thymol (50%), *p*-cymene (20%), γ -terpinene (18%), carvacrol (4.5%) and borneol (1.5%). This essential oil was tested against microorganisms causing of illnesses in different cultures of economic importance: *Myrothecium verrucaria*, *Corynespora cassiicola*, *Erwinia psidii*, *Sclerotinia minor* and *Colletotrichum musae*. The concentration of the essential oil of thyme that promoted complete inhibition of the tested microorganisms varied between 5 - 200 $\mu\text{L/mL}$, being more efficient for the control of *C. musae* (5 $\mu\text{L/mL}$), *S. minor* (10 $\mu\text{L/mL}$), *F. moniliforme* (10 $\mu\text{L/mL}$), and *C. Cassiicola* (15 $\mu\text{L/mL}$).

Key Words: Thyme. Essential oil. Antifungal activity.

^a Doutorando em Química - Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Docente da Universidade Estadual de Maringá (UEM). E-mail: alromero2@uem.br.

^b Mestranda em Biologia Comparada - Universidade Estadual de Maringá (UEM). E-mail: specian82@hotmail.com.

^c Graduando em Ciências Biológicas - Universidade Estadual de Maringá (UEM). E-mail: rodliveira@yahoo.com.br.

^d Doutor em Ciências Biológicas - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP). Docente da Universidade Estadual de Maringá. E-mail: dnz1210@hotmail.com.

* Endereço para correspondência: Universidade Estadual de Maringá, Departamaneto de Química, Bl. 21 - sala 07. Cep: 87020-900. Maringá-PR

1 Introdução

Desde a origem da agricultura, a criação de métodos de controle de pragas tem sido um desafio para o homem, e dentro desta perspectiva, o principal método utilizado são os compostos químicos sintéticos. Apesar de sua significativa contribuição para a produção agrícola, o uso intensivo e indiscriminado destes produtos favoreceu o surgimento de pragas secundárias, o comprometimento do meio ambiente e da saúde humana, por serem altamente tóxicos¹.

A pesquisa fitopatológica visando o controle da população de fungos e outros microrganismos, principalmente aqueles que provocam danos à agricultura, através do emprego de óleos, bálsamos e extratos vegetais, tem tido considerável implemento nos últimos anos^{2,3}. A utilização de fungicidas de

origem vegetal pode constituir método alternativo e promissor no controle de pragas, pois além de ser de fácil obtenção e baixo custo, minimizam os problemas de toxicidade apresentados pelos produtos químicos sintéticos¹.

O fitopatógeno *Myrothecium verrucaria* pertence aos Deuteromycetes, portanto é um fungo imperfeito⁴. Sendo conhecido por sua atividade degradadora de celulose, e com larga distribuição no solo e nos vegetais^{5,6}. Portanto, esse fungo afeta diversas espécies de plantas economicamente importantes, dentre as quais, cereais, plantas ornamentais e madeiras⁷.

O fungo *Corynespora cassiicola* é um patógeno que apresenta atividade necrotófica, sendo microrganismo cosmopolita abundante nas regiões tropicais⁸. Tem sido reportada a presença desse organismo em mais de 70 espécies de plantas, incluindo, tomate, pepino, feijão, pimentão, cacau, tabaco e seringueira. Produz micotoxina denominada de cassicolina, sendo a mesma hospedeiro-seletiva⁹.

Entre os fatores que limitam a produção de goiaba no país, está ocorrência da bacteriose, também conhecida como seca dos ponteiros, causada por *Erwinia psidii*. O gênero *Erwinia* pertence ao grupo das eubactérias gram-negativas e ao subgrupo dos bacilos anaeróbios facultativos, família Enterobacteriaceae¹⁰. O controle normalmente é feito com bactericidas cúpricos, que causam danos aos frutos. Portanto,

a utilização de óleos essenciais apresenta-se como alternativa eficaz e não tóxica para seu controle.

O fungo *Sclerotinia minor* é largamente distribuído em todo o mundo, com pelo menos 408 espécies de plantas hospedeiras¹¹. Estes organismos são responsáveis por murchamento das folhas e podridão dos tecidos vegetais infectados¹². O controle deste fungo tem sido dificultado devido à capacidade dos mesmos em formar estruturas de resistência, escleródios, que asseguram a sobrevivência destes por vários anos, mesmo em condições adversas¹³.

A Podridão da coroa, importante enfermidade de pós-colheita em banana, decorrente da prática do despencamento dos frutos para a comercialização sendo ocasionada pelos seguintes patógenos: *Cephalosporium* sp., *Deighthoniella torulosa*, *Ceratocystis paradoxa*, *Fusarium* spp e *Colletotrichum musae*¹⁴. O fermento deixado pelo despencamento, cria um ponto de fácil acesso para fungos e bactérias oportunistas. O estabelecimento destes patógenos provoca escurecimento e necrose do tecido, seguido do aparecimento de sinais do patógeno na superfície afetada. Os sintomas iniciais aparecem após 7 dias da inoculação, espalhando-se rapidamente durante a maturação, podendo posteriormente alcançar o pedicelo dos frutos e, muitas vezes, passar aos próprios frutos, tornando-os inviáveis para o consumo.

Muitas culturas economicamente importantes como milho, arroz, trigo, sorgo e cevada são afetadas por fungos do gênero *Fusarium*^{15,16,17}. A incidência destes fungos na semente ocorre, normalmente, pela infecção natural da espiga no campo, favorecida pelo clima úmido e quente na fase de polinização, mau empalhamento e danos causados por insetos nas espigas^{18,19}.

Dentro da perspectiva de uso de produtos naturais para o controle alternativo de doenças fúngicas, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*) frente aos fungos fitopatogênicos *Myrothecium verrucaria*, *Corynespora cassiicola*, *Erwinia psidii*, *Sclerotinia minor* e *Colletotrichum musae*.

2 Material e Método

2.1 Obtenção do óleo essencial

Folhas de tomilho foram coletadas no Horto de Plantas Medicinais da Universidade Estadual de Maringá – UEM, em maio de 2009. 100 gramas destas folhas, previamente secadas à temperatura ambiente durante 7 dias, foram submetidas à hidrodestilação, utilizando aparelho de Clevenger modificado durante 3 horas. Após o tempo indicado, o óleo essencial obtido foi separado da água e seco com sulfato de sódio.

2.2 Análise cromatográfica

A identificação dos constituintes químicos presentes no óleo essencial de tomilho foi baseada nos espectros obtidos na espectrometria de massas com ionização por elétrons a 70eV, realizada em equipamento modelo QP 2000A, com sonda para sólidos. Os espectros de massas foram comparados com

dados da biblioteca de espectros NIST do equipamento e na dedução dos fragmentos obtidos. As condições experimentais empregadas foram as seguintes: coluna capilar HP-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm); injeção em *splitless*; hidrogênio como gás de arraste; temperatura inicial de 60°C; taxa de aquecimento de 2°C/min; temperatura final da coluna 250°C; temperatura do injetor de 250°C e do detector de 280°C.

2.3 Ressonância magnética nuclear

Os espectros de RMN de ¹H, RMN de ¹³C e DEPT foram obtidos em um espectrômetro VARIAN modelo Gemini 2000BB 300 MHz (300,06 MHz para ¹H e 75,45 MHz para ¹³C). Os deslocamentos químicos foram dados em ppm, tendo como referência interna o tetrametilsilano (TMS) ou o próprio solvente (CDCl₃, 7,27 ppm para ¹H e 77,00 ppm para ¹³C).

2.4 Extração de fenóis presentes no óleo essencial

200 mg do óleo essencial de tomilho dissolvidos em 5 mL de clorofórmio foi submetido à extração com solução aquosa de NaOH 10%. A fase fenólica obtida foi acidificada até pH 2, extraída com hexano e seca com sulfato de sódio para fornecer 108 mg (54%) de uma mistura de timol e carvacrol.

Timol (2-isopropil-5-metilfenol) – RMN de ¹H: δ 1,66 (d, *J* = 7,0 Hz, 6H, H-8); 2,65 (s, 3H, H-9); 3,64 (hepteto, *J* = 7,0 Hz, H-7); 6,94 (sl, 1H, H-6); 7,15 (dl, *J* = 7,6 Hz, 1H, H-4); 7,51 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H, H-3). RMN de ¹³C: δ 152,1 (C-1); 131,6 (C-2); 126,0 (C-3); 121,6 (C-4); 136,3 (C-5); 116,1 (C-6); 26,6 (C-7); 22,7 (C-8); 20,8 (C-9).

Carvacrol (5-isopropil-2-metilfenol) – RMN de ¹H: δ 1,61 (d, *J* = 7,0 Hz, H-8); 2,64 (s, 3H, H-9); 3,20 (hepteto, *J* = 7,0 Hz, H-7); 7,04 (sl, 1H, H-6); 7,45 (dl, *J* = 7,6 Hz, H-4); 7,51 (dl, *J* = 7,6 Hz, H-3). RMN de ¹³C: δ 153,2 (C-1); 121,2 (C-2); 130,7 (C-3); 118,7 (C-4); 148,1 (C-5); 113,1 (C-6); 33,7 (C-7); 23,9 (C-8); 15,4 (C-9).

2.4 Meio de cultivo

O meio de cultivo utilizado foi o BDA (Batata Dextrose Agar). As batatas (200 gramas) foram fervidas no forno de microondas com 400 mL de água. A mistura resultante foi filtrada e após 3 minutos e acrescentado 600 mL de água destilada, 18 gramas de sacarose e 20 gramas de Agar. O meio de cultivo e todas as vidrarias empregadas foram devidamente autoclavadas.

2.5 Ensaios microbiológicos

Os ensaios microbiológicos foram realizados em placas de Petri (60 x 15 mm), contendo meio BDA. Os fungos foram isolados e plaqueados, sendo assim incubados por 9 dias a 28°C em estufa microbiológica (marca: Fanen). O experimento teve início com a adição de um disco de papel filtro (1cm de diâmetro) ao centro da placa com a quantidade de óleo correspondente (10 ou 100µL). O controle do experimento foi realizado pela cultura dos fitopatógenos em meio BDA sem a adição de qualquer tipo de fungicida. A determinação da

inibição do crescimento do fungo foi realizada pela média de 5 repetições para cada tratamento, através de valores de PIC (Percentual de Inibição do Crescimento Micelial), método descrito por autores²⁰, cuja fórmula é a seguinte:

$$\text{PIC} = \frac{\text{crescimento controle} - \text{crescimento tratamento}}{\text{crescimento controle}} \times 100$$

3 Resultados e Discussão

O óleo essencial de tomilho foi obtido, a partir da hidrodestilação das folhas de *Thymus vulgaris*, usando um aparelho tipo Clevenger com 1,4% de rendimento. A composição química deste óleo foi determinada utilizando cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), interpretação dos espectros de massas, co-injeção de padrões e ressonância magnética nuclear de ¹H e ¹³C. A partir da análise de CG-EM observou-se 3 picos principais, que foram identificados como sendo timol (50 %), *p*-cimeno (20%) e γ -terpineno (18%) (figura 1).

A identificação destas substâncias foi realizada pela comparação com os espectros de massas registrados no banco de dados NIST-Mass Spectra Library e por RMN de ¹H e ¹³C/DEPT e por comparação com dados da literatura²¹. Os demais compostos {carvacrol (4,5%), β -cariofileno (4%), borneol (1,5%), limoneno (1%) e 1-8-cineol (1%)} foram identificados pela comparação com os espectros de massas registrados no banco de dados NIST-Mass Spectra Library.

Os fenóis presente no óleo essencial de tomilho foram extraídos com NaOH 10 %, a fase fenólica obtida foi acidificada até pH 2, extraída com hexano e seca com sulfato de sódio. A fase fenólica apresentou, em vários sistemas de eluentes, apenas uma mancha em CCD analítica e a massa dessa fase é concordante com a somatória dos teores de timol e carvacrol no óleo essencial. Os espectros de RMN de ¹H e ¹³C apresentaram sinais concordantes com os monoterpenos timol e carvacrol.

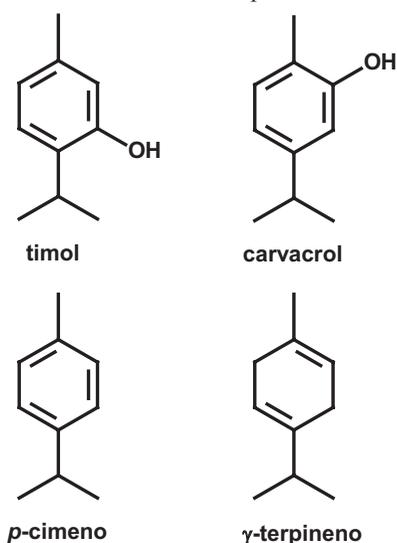


Figura 1 - Constituintes químicos do óleo essencial de *Thymus vulgaris*

Quanto à atividade antifúngica, pode-se observar que o óleo essencial de tomilho apresentou expressivo efeito frente aos microorganismos testados. A dose inibitória variou em função do microorganismo estudado, oscilando na faixa de 5 a 200 $\mu\text{L/mL}$ (tabela 1). Essa atividade torna-se ainda mais relevante se comparada à concentração de 750 $\mu\text{L/mL}$ de fungicida comercial (Kobutol) usada para obtenção da inibição do crescimento dos diversos fungos testados. Estes resultados são concordantes com os estudos realizados por autores²², que comprovaram o efeito antifúngico, antibiótico e anti-helmíntico do óleo essencial de tomilho.

Tabela 1 - Concentração mínima inibitória do óleo essencial de tomilho para diferentes fungos fitopatogênicos

Microorganismo	Concentração de óleo de tomilho
<i>Corynespora cassiicola</i>	15 $\mu\text{L/mL}$
<i>Erwinia psidii</i>	100 $\mu\text{L/mL}$
<i>Sclerotinia minor</i>	10 $\mu\text{L/mL}$
<i>Colletotrichum musae</i>	5 $\mu\text{L/mL}$
<i>Fusarium moniliforme</i>	10 $\mu\text{L/mL}$
<i>Myrothecium verrucaria</i>	200 $\mu\text{L/mL}$
Controle (meio + fungicida)*	750 $\mu\text{L/mL}$

* Fungicida utilizado - Kobutol (3000 ppm).

A atividade antifúngica do óleo essencial de tomilho é resultante da presença de timol e carvacrol que possuem atividade antimicrobica contra amplo espectro de microorganismos. Estes terpenos ligam-se aos grupos amina e hidroxilamina de proteínas presentes nas membranas das bactérias alterando sua permeabilidade e resultando na morte dessa bactéria²³. Já a atividade antifúngica é explicada pela degeneração das hifas que causa a liberação do conteúdo celular²⁴.

Diante do exposto, conclui-se que o óleo essencial de tomilho pode ser utilizado para o controle alternativo de doenças de origem fúngicas que incidem sobre plantas, uma vez que apresenta baixa toxicidade ao meio ambiente e ao homem (LC_{50} em ratos de 9.543,5 $\mu\text{L.kg}^{-1}$) e potente atividade antifúngica²⁵. No entanto, estudos futuros desenvolvidos a campo e utilizando diferentes concentrações deste óleo, são requeridos para a avaliação da fungitoxicidade *in vivo*.

4 Conclusão

Os resultados apresentados neste estudo sugerem a potencialidade de aplicação do óleo essencial de tomilho para o controle de doenças fúngicas ocasionados pelos fungos *Corynespora cassiicola*, *Erwinia psidii*, *Sclerotinia minor*, *Colletotrichum musae*, *Fusarium moniliforme* e *Myrothecium verrucaria*.

Referências

- Marques RP, Monteiro AC, Pereira GT. Crescimento, esporulação e viabilidade de fungos entomopatogênicos em meios contendo diferentes concentrações do óleo de nim (*Azadirachta indica*). *Ciência Rural* 2004;34:1675-1680.

2. Bastos CN. Efeito do óleo de *Piper aduncum* sobre *Crinipelis pernicioso* e outros fungos fitopatogênicos. *Fitopatologia Brasileira* 1997;22:441-3.
3. David EFS, BoaroCSF, Marques MOM. Rendimento e composição do óleo essencial de *Mentha piperita* L., cultivada em solução nutritiva com diferentes níveis de fósforo. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* 2006;8(4):183-188.
4. Reddy P, Ahmed MN. Hematological studies in bullocks in natural out-breaks of *Myrothecium toxicois*. *Indian Veterinary Journal* 1998;75:416-418.
5. Mouchacca J. Check list of novel fungi from the Middle East described mainly from soil since 1930. *Sydowia* 1996;42(2):240-257.
6. Hannusch DJ, Boland GJ. Interactions of air temperature, relative humidity and biological control agents on grey mold of bean. *European Journal of Plant Pathology* 1996;102(2):133-142.
7. Walker HL, Tilley AM. Evolution of an isolate of *Myrothecium verrucaria* from Sikepood (*Senna obtusifolia*) as a potencial mycoherbicide agent. *Biological Control* 1997;10(2):104-112.
8. Lamotte F, Duviau MP, Sanier C, Thai R, Poncet J, Bieysse D, et al. Purification and characterization of cassiicolin, the toxin produced by *Corynespora cassicola*, causal agent of leaf fall disease of rubber tree. *Journal of Chromatography B* 2006;10:96-101.
9. Shukla RS, Singh KP. Isolation, partial purification and phytotoxic activity of a toxin produced by *Corynespora cassicola*, a strain from *Mentha arvensis*. *Journal of Medicine and Aromatic Plant Sciences* 1997;19:682-687.
10. Coelho MVS, Mendes AP, Marques ASA. Seca dos ponteiros da goiabeira causada por *Erwinia psidii*: levantamento e caracterização. 2002. Disponível em: www.cenargenembrapa.br/publica/trabalhos/cot059/pdf. Acesso em 7 jun. 2005.
11. Boland GJ, Hall R. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 1994;16:93-108.
12. Pereira JCR, Chaves GM, Zambolim L, Matsuoka K, Silva-Acuna R, Vale FXR. Controle integrado de *Sclerotinia sclerotiorum*. *Fitopatologia Brasileira* 1996;21:254-260.
13. Ferraz LCL, Bergamin-Filho A, Amorim L., Nasser LCB Viabilidade de *Sclerotinia sclerotiorum* após a solarização do solo na presença de cobertura morta. *Fitopatologia brasileira* 2003;62:42-44.
14. Frossard P. Action du thiabendazole et du benlate sur l'antracnose des bananes et son champignon pathogene: *Colletotrichum musae* Fruits. 1969;24:365-373.
15. Yasue Y. Studies on the antibacterial action of fusaric acid, a metabolic product on the causative mould of the Bakanae disease of rice plants. *Journal of Antibiotic*. 1949;2:261-262.
16. Pinto NFJA. Tratamento fungicida de semente de milho. In: *SIMPOSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES*, Gramado. 1996:52-57.
17. Goulart ACP, Fialho WFB. Ocorrência de fungos em sementes de milho Br-201 produzidas na região de Dourados, MS. *Fitopatologia Brasileira* 1998;23:79.
18. Shurtleff MC. *Compendium of corn diseases*. Saint Paul: American Phytopathology Society; 1992.
19. Reid LM, Hamilton RI, Mather DE. Screening maize for resistance to *Gibberella* ear rot. *Research Branch, Agriculture and Agri-Food Canada Technical Bulletin* 1996.
20. Edginton LV, Knew KL, Barron GL. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. *Phytopathology* 1971;62:42-44.
21. Schauenberg P, Paris F. *Guide to medicinal plants*. Londres: Lutterworth Press; 1997.
22. Neeman I. et al. Effect of essential oil in the phytopathogen *erwinia carotovora*, subsp. *Carotovora* in sterile and non sterile soli, sand and their admixture. *J Appl Bacteriol* 1995;79:513-518.
23. Juven BJ, Kanner J, Schued F, Weisslowicz H. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *J Appl Bacteriol* 1994;76:626-631.
24. Zambonelli A, Daulerio AZ, Bianchi A, Albasini A. Effects of essential oils on phytopathogenic fungi in vitro. *J Phytopathol* 1996;144:491-494.
25. Soković MD, Vukojević J, Marin PD, Brkić DD, Vajs V, Van Griensven L.JLD. Chemical composition of essential oils of *thymus* and *mentha* species and their Antifungal Activities. *Molecules* 2009;14:238-249.