

# Composição Química e Atividade do Óleo Essencial de *Origanum vulgare* Sobre Fungos Fitopatogênicos

## Chemical Composition and Activity of *Origanum vulgare* Essential Oil against Phytopathogenic Fungi

Adriano Lopes Romero<sup>ab\*</sup>; Rafaelle Bonzanini Romero<sup>a</sup>; Expedito Leite Silva<sup>c</sup>; Sergio Paulo Severo de Souza Diniz<sup>d</sup>; Ricardo Ribeiro de Oliveira<sup>e</sup>; João Batista Vida<sup>e</sup>

<sup>a</sup>Universidade Tecnológica Federal do Paraná, PR, Brasil

<sup>b</sup>Universidade Estadual de Campinas, Programa de Pós-Graduação em Química, SP, Brasil

<sup>c</sup>Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Exatas, Departamento de Química, PR, Brasil

<sup>d</sup>Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Bioquímica, PR, Brasil

<sup>e</sup>Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Agronomia, PR, Brasil

\*E-mail: adrianoromero@utfpr.edu

Recebido: 4 de novembro de 2011; Aceito: 29 de maio de 2012

### Resumo

O orégano (*Origanum vulgare*) é uma planta aromática amplamente utilizada como condimento na culinária. Das folhas desse condimento obteve-se, a partir de hidrodestilação utilizando um aparelho de Clevenger modificado, um óleo essencial constituído majoritariamente por 4-terpineol (8,3%), acetato de linalila (2,0%), timol (32,0%), carvacrol (50,0%) e espatulenol (4,1%). Testou-se o efeito desse óleo essencial sobre a germinação de esporos e crescimento micelial de alguns fungos causadores de doenças em culturas de importância econômica (*Corynespora cassiicola*, *Fusarium* sp., *Colletotrichum gloeosporioides* e *Rhizoctonia solani*). Observou-se que todos os fungos testados tiveram inibição completa do crescimento micelial e da germinação de esporos pela ação do óleo essencial de *Origanum vulgare* para concentrações a partir de 500 ppm. A atividade antifúngica desse óleo essencial deve estar associada à presença dos fenóis monoterpênicos timol e carvacrol, que são reportados na literatura por suas atividades antimicrobianas. Esses resultados sugerem a potencialidade de aplicação do óleo essencial de orégano para o controle alternativo de doenças ocasionadas pelos fungos avaliados nesse trabalho.

**Palavras-chave:** Origanum. Fenóis. Fungos.

### Abstract

Oregano (*Origanum vulgare*) is an aromatic plant widely used as a culinary condiment. From the leaves of this condiment, it was obtained, through hydrodistillation with a modified Clevenger device, an essential oil comprising 4-terpineol (8.3%), linalyl acetate (2.0%), thymol (32.0%), carvacrol (50.0%) and spathulenol (4.1%). The effect of this essential oil was tested on spore germination and mycelial growth of some fungi (*Corynespora cassiicola*, *Fusarium* sp., *Colletotrichum gloeosporioides* and *Rhizoctonia solani*), which cause diseases in crops of great economic importance. It was observed that all the tested fungi had complete inhibition of mycelial growth and spore germination, as a result of the action of the *Origanum vulgare* essential oil in concentrations starting in 500 ppm. The antifungal activity of this essential oil must be associated with the presence of thymol and carvacrol monoterpene phenols, which are reported in literature for their antimicrobial activity. These results suggest the potential of oregano essential oil application for the alternative control of diseases caused by the fungi evaluated in this work.

**Keywords:** Origanum. Phenols. Fungi.

### 1 Introdução

Os óleos essenciais são misturas complexas que podem conter, em alguns casos, 100 ou mais substâncias voláteis. Seus constituintes podem pertencer às mais diversas classes de compostos, porém os terpenos e os fenilpropanos são as classes de compostos mais comumente encontrados. Vários estudos têm reportado que os óleos essenciais apresentam atividade inibitória frente a vários fungos fitopatogênicos. Dessa forma, vários grupos de pesquisa vêm pesquisando a utilização de produtos naturais como alternativa no controle fitossanitário em sistemas de cultivos, em substituição aos pesticidas sintéticos<sup>1</sup>. Esses produtos naturais têm sido amplamente estudados por possuírem alta atividade antimicrobiana, baixa toxicidade ao homem, serem de fácil degradação e por apresentarem pouco impacto ao meio ambiente<sup>2</sup>.

Pesquisas envolvendo óleos essenciais, especialmente os obtidos de membros da família Lamiaceae, tal como o orégano (*Origanum vulgare*), têm apresentado resultados promissores no controle de fungos patogênicos do arroz (*Alternaria* sp., *Bipolaris oryzae*, *Curvularia* sp., *Gerlachia oryzae*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinia sclerotiorum*)<sup>3</sup>. O óleo essencial de orégano, em estudos *in vitro*, foi capaz de inibir o crescimento micelial e a produção de aflatoxina de *Aspergillus parasiticus*, *A. niger*, *A. flavus* e *A. ochraceus*<sup>4,5</sup>. Essas atividades são associadas, principalmente, aos compostos majoritários (timol e carvacrol) presentes nesse óleo essencial, que possuem atividade antimicrobiana frente a várias bactérias e fungos. Como constituintes minoritários observam-se a presença de alcoóis monoterpênicos (linalool, 4-terpineol), hidrocarbonetos monoterpênicos (*p*-cimeno, terpinoleno, terpineno e pineno) e sesquiterpenos ( $\beta$ -cariofileno, germacreno e espatulenol),

que também possuem atividade antimicrobiana<sup>6,7</sup>. Cleff *et al.*<sup>8</sup> demonstraram que o óleo essencial de orégano, constituído majoritariamente por 4-terpineol (47,95%), carvacrol (9,42%), timol (8,42%) e  $\alpha$ -terpineol (7,57%), apresentou promissora atividade antimicrobiana contra *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. lusitaniae* e *C. dubliniensis*. O orégano, além das atividades mencionadas, possui propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes, anticancerígenas, emolientes e digestivas<sup>9</sup>. No entanto, a eficácia da atividade antimicrobiana do óleo essencial de orégano pode variar, principalmente, em função dos teores de timol e carvacrol presentes, que dependem de fatores abióticos como o tipo de solo, o clima, as práticas agrícolas, a variedade do orégano e o processo de extração do óleo essencial<sup>10</sup>.

Entre os fungos fitopatogênicos causadores de doenças em culturas de grande importância econômica há: (a) *Corynespora cassiicola* - agente causal de doença em mais de 70 espécies de hospedeiros distribuídos em diversos países de clima tropical e subtropical<sup>11</sup>. O principal sintoma de doença causada por *C. cassiicola* são manchas foliares, cujas formas e coloração variam de acordo com o hospedeiro encontrado<sup>12</sup>; (b) *Fusarium* sp. - provoca danos nas sementes de milho, arroz, trigo, sorgo e cevada<sup>13,14</sup>; (c) *Colletotrichum gloeosporioides* - agente causal da antracnose que pode provocar danos nos órgãos aéreos como folhas, botões florais, ramos e frutos em diversas culturas (abacateiro, berinjela, caféiro, cajuzeiro, caqui, cítricos, macieira, mangueira e videira)<sup>15</sup>; (d) *Rhizoctonia solani* - afeta as culturas da batata, do feijão, do fumo, do milho e da soja, causando podridões radiculares no início do desenvolvimento da plântula e provocando redução no vigor e na germinação da semente<sup>16</sup>.

Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo estudar a composição química e avaliar o efeito do óleo essencial de *Origanum vulgare* na germinação de esporos e crescimento micelial de alguns fungos fitopatogênicos (*Corynespora cassiicola*, *Fusarium* sp., *Colletotrichum gloeosporioides* e *Rhizoctonia solani*).

## 2 Material e Métodos

### 2.1 Obtenção do óleo essencial

Para obtenção do óleo essencial, foram submetidas à hidrodestilação 100 g de folhas de orégano, adquiridas no comércio de Maringá-PR, e utilizado o aparelho de Clevenger por 2 horas. Após o tempo indicado, o óleo essencial foi separado da água e seco com sulfato de sódio.

Uma alíquota do óleo essencial de orégano foi submetido à coluna cromatográfica de sílica gel eluída com *n*-hexano: acetato de etila em gradiente de polaridade para fornecer três compostos puros {4-terpineol, acetato de linalila e espatulenol} e uma mistura constituída de timol e carvacrol.

*4-terpineol*: RMN de <sup>1</sup>H:  $\delta$  5,31 (sl, 1H, H-2); 1,70 (sl, 3H, H-7); 0,96 (d,  $J = 6,9$  Hz, 3H, H-10 ou H-9); 0,93 (d,  $J = 6,9$

Hz, 3H, H-9 ou H-10). RMN de <sup>13</sup>C:  $\delta$  133,9 (C-1); 118,4 (C-2); 71,8 (C-4); 36,8 (C-8); 34,6 (C-3); 30,8 (C-5); 27,1 (C-6); 23,3 (C-7); 16,84 e 16,86 (C-9 e C-10).

*Acetato de linalila*: RMN de <sup>1</sup>H:  $\delta$  1,55 (s, 3H, H-10); 1,60 (sl, 3H, H-9); 5,13 (dl,  $J = 11,3$  Hz, 1H, H-3); 5,16 (dl,  $J = 17,5$  Hz, 1H, H-3); 5,98 (dd,  $J = 17,5$  e 11,3 Hz, H-2). RMN de <sup>13</sup>C:  $\delta$  169,8 (COOCH<sub>3</sub>); 141,7 (C-2); 131,7 (C-8); 123,7 (C-4); 113,0 (C-3); 82,9 (C-1); 39,8 (C-6); 25,7 (C-10); 23,7 (C-5); 22,5 (C-7); 22,3 (COOCH<sub>3</sub>); 17,7 (C-9).

*Espatulenol*: RMN de <sup>1</sup>H:  $\delta$  4,70 (sl, 1H, H-15); 4,67 (sl, 1H, H-15); 1,29 (s, 3H, H-14); 1,06 (s, 3H, H-13); 1,05 (s, 3H, H-12); 0,46 (dd,  $J = 11,2$  e 9,5 Hz, H-6). RMN de <sup>13</sup>C:  $\delta$  153,3 (C-10); 106,2 (C-15); 80,9 (C-4); 54,4 (C-1); 53,4 (C-5); 41,8 (C-3); 38,9 (C-9); 30,0 (C-6); 28,7 (C-12); 27,6 (C-7); 26,8 (C-2); 26,2 (C-14); 24,9 (C-8); 20,4 (C-11); 16,4 (C-13).

*Timol*: RMN de <sup>1</sup>H:  $\delta$  7,51 (d,  $J = 7,6$  Hz, 1H, H-5); 7,15 (dl,  $J = 7,6$  Hz, 1H, H-6); 6,94 (sl, 1H, H-2); 3,64 (hepteto,  $J = 7,0$  Hz, H-8); 2,65 (s, 3H, H-7); 1,66 (d,  $J = 7,0$  Hz, 6H, H-9 e H-10). RMN de <sup>13</sup>C:  $\delta$  152,1 (C-3); 136,3 (C-1); 131,6 (C-4); 126,0 (C-5); 121,6 (C-6); 116,1 (C-2); 26,6 (C-8); 22,7 (C-9 e C-10); 20,8 (C-7).

*Carvacrol*: RMN de <sup>1</sup>H:  $\delta$  7,51 (dl,  $J = 7,6$  Hz, H-6); 7,45 (dl,  $J = 7,6$  Hz, H-5); 7,04 (sl, 1H, H-3); 3,20 (hepteto,  $J = 7,0$  Hz, H-8); 2,64 (s, 3H, H-7); 1,61 (d,  $J = 7,0$  Hz, H-9 e H-10). RMN de <sup>13</sup>C:  $\delta$  153,2 (C-2); 148,1 (C-4); 130,7 (C-6); 121,2 (C-1); 118,7 (C-5); 113,1 (C-3); 33,7 (C-8); 23,9 (C-9 e C-10); 15,4 (C-7).

### 2.2 Análise cromatográfica

As análises de cromatografia gasosa (CG) foram realizadas em um cromatógrafo Thermo Electron Corporation, modelo Focus GC, utilizando as seguintes condições: coluna capilar DB-5 (30 m x 0,32 mm, 0,50 mm); temperatura da coluna, 60 °C (1 min) até 180 °C a 3 °C/min; temperatura do injetor 220 °C; temperatura do detector 220 °C; razão split 1:10; gás de arraste He; fluxo do gás de 1,0 mL/min. O volume injetado 1  $\mu$ L foi diluído em acetona (1:10). As análises de CG-EM foram realizadas em espectrômetro de massas Quadrupolo (Thermo Electron Corporation, modelo DSQ II), operando a 70 V. A identificação dos componentes individuais foram baseadas na comparação com o índice de retenção em colunas apolares e comparação com espectro de massas de padrões adquiridos da Sigma-Aldrich e com dados da literatura<sup>17</sup>.

### 2.3 Ressonância magnética nuclear

Os espectros de RMN de <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C e DEPT foram obtidos em um espectrômetro VARIAN modelo Gemini 2000BB 300 MHz (300,06 MHz para <sup>1</sup>H e 75,45 MHz para <sup>13</sup>C). Os deslocamentos químicos foram dados em ppm, tendo como referência interna o tetrametilsilano (TMS) ou o próprio solvente (CDCl<sub>3</sub>, 7,27 ppm para <sup>1</sup>H e 77,00 ppm para <sup>13</sup>C).

## 2.4 Fungos fitopatogênicos estudados

Os fungos *Corynespora cassiicola*, *Fusarium* sp., *Colletotrichum gloeosporioides* e *Rhizoctonia solani* foram cedidos pela EMBRAPA Arroz e Feijão - (CNPAF) e foram mantidos meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA) à temperatura ambiente (28 a 30 °C), sendo repicados mensalmente.

## 2.5 Atividade antifúngica

### 2.5.1 Efeito do óleo essencial de orégano no crescimento micelial

O meio de cultivo BDA foi preparado conforme a rotina, em erlenmeyers com a capacidade de um litro. Contudo, momentos antes de serem vertidos em placas de Petri, quando a temperatura encontrava-se em torno de 40 °C foi adicionado aos recipientes diferentes volumes de óleo essencial de orégano. Estes foram agitados suavemente para que fossem homogeneizados, de modo que no final fossem obtidas placas de Petri contendo o meio com as diferentes concentrações de óleo essencial a ser avaliado (250; 500; 1000 e 2000 ppm). Foram utilizadas cinco placas de Petri (9,0cm Ø) por tratamento. Após a solidificação, discos de micélio de *Corynespora cassiicola*, *Fusarium* sp., *Colletotrichum gloeosporioides* e *Rhizoctonia solani* de 5,0 mm de diâmetro e sete dias de idade foram transferidos para o centro das placas, e estas foram incubadas em câmara climatizada do tipo 'BOD', a 25 ± 2 °C, sob luz fluorescente contínua. 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 micelial foi realizada pela média de 5 repetições para cada tratamento, através de valores de PIC (Percentual de Inibição do Crescimento Micelial), método descrito por Edginton *et al.*<sup>18</sup>, cuja fórmula é a seguinte:

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

Os resultados foram submetidos à análise de variância utilizando o programa SISVAR, versão 4.6 e as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

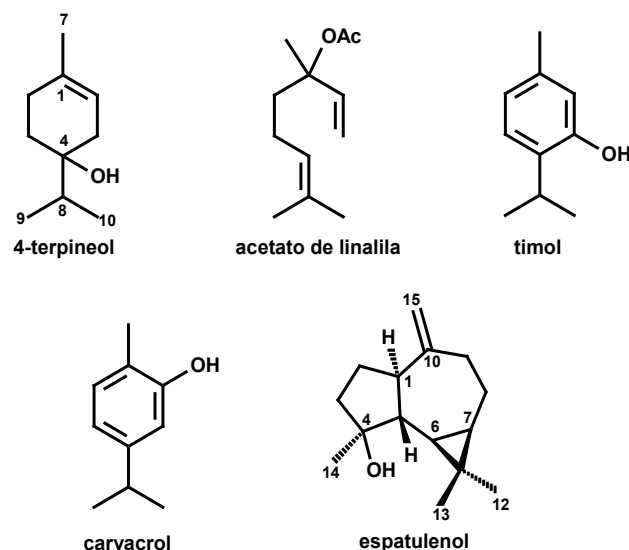
### 2.5.2 Efeito do óleo essencial de orégano na germinação de esporos

Placas de Petri contendo culturas monospóricas de *Corynespora cassiicola*, *Fusarium* sp., *Colletotrichum gloeosporioides* e *Rhizoctonia solani* com 14 dias de idade foram utilizadas para a obtenção da suspensão de esporos. Em cada placa adicionou-se 8,0 ml de água destilada e esterilizada e com o auxílio de uma alça de Drigalski raspou-se a superfície do meio de cultivo para a liberação dos esporos das hifas. O extrato obtido foi filtrado em dupla

camada de gaze para a obtenção da suspensão de esporos, a qual foi ajustada para a concentração de 5x10<sup>4</sup> esporos/mL. Para a avaliação da germinação de esporos, mediante a aplicação de diferentes concentrações do óleo essencial de orégano, foram utilizadas placas-de-ELISA com 96 "poços" (wells). Cada tratamento foi composto de três repetições, sendo um "poço" considerado uma unidade experimental. Em cada "poço" (well) da placa foi depositado 100 µL da suspensão de esporos e, em seguida, diferentes volumes do óleo essencial de orégano de forma que obtivesse concentrações finais de 250; 500; 1000 e 2000 ppm. Após a preparação, as placas foram mantidas a 25 °C sob iluminação constante durante 48 horas. Para a determinação do número de esporos germinados de cada tratamento e repetição utilizou-se microscópio óptico. Para tal, as placas de Elisa foram drenadas e, para a visualização ao microscópio, foram invertidas. Os resultados foram submetidos à análise de variância utilizando o programa SISVAR, versão 4.6 e as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

## 3 Resultados e Discussão

O óleo essencial de *Origanum vulgare* foi obtido, a partir da hidrodestilação das folhas de orégano comerciais, utilizando aparelho tipo Clevenger com 1,5% de rendimento. A composição química desse óleo essencial foi determinada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) e por ressonância magnética nuclear de <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C. Os cinco componentes majoritários desse óleo (4-terpineol (8,3%), acetato de linalila (2,0%), timol (32,0%), carvacrol (50,0%) e espatulenol (4,1%) (Figura 1), foram isolados utilizando cromatografia em coluna de sílica gel e tiveram suas estruturas moleculares confirmadas por RMN de <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C e por comparação com dados da literatura<sup>1,19,20</sup>.



**Figura 1:** Estruturas moleculares dos principais constituintes do óleo essencial de *Origanum vulgare*

Estudos têm relatado que a composição química, a qualidade e o teor de óleos essenciais nas plantas estão sujeitos à grande variação e são influenciados por diversos fatores, tais como: condições geográficas e climáticas, assim como condições de cultivo, secagem e armazenamento<sup>21</sup>. Venskutonis<sup>22</sup>, por exemplo, verificou reduções de 43% na quantidade total de compostos isolados de tomilho (*Thymus vulgaris* L.) quando este era submetido à secagem em estufa a 60 °C, em relação à planta fresca. Segundo o autor, a redução dos compostos voláteis durante a secagem depende da volatilidade e estrutura química dos constituintes presentes na planta<sup>22</sup>. A ausência de hidrocarbonetos monoterpênicos, tais como *p*-cimeno, pinenos e terpinenos, no óleo essencial de orégano obtido nesse estudo indicam que durante a secagem

e/ou armazenamento desse condimento houve perdas consideráveis destes compostos mais voláteis.

Com relação à atividade antifúngica, observou-se que todos os fungos fitopatogênicos testados tiveram inibição completa do crescimento micelial e da germinação de esporos pela ação do óleo essencial de *Origanum vulgare* para concentrações a partir de 500 ppm (Tabelas 1 e 2). Na concentração de 250 ppm, observou-se que o óleo essencial de orégano inibiu o crescimento micelial dos fungos *Corynespora cassiicola*, *Fusarium* sp. e *Colletotrichum gloeosporioides* em 64,81, 73,95 e 33,58%, respectivamente. O óleo essencial de orégano não afetou o crescimento micelial e a germinação de esporos do fungo *Rhizoctonia solani* na concentração de 250 ppm.

**Tabela 1:** Efeito do óleo essencial de orégano no crescimento micelial de alguns fungos fitopatogênicos.

Concentração	Inibição de crescimento micelial (%)			
	<i>Corynespora cassiicola</i>	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>
250 ppm	64,81 b <sup>1</sup>	73,95 b	33,58 b	0,00 b
500 ppm	100,00 a	100,00 a	100,00 a	100,00 a
1000 ppm	100,00 a	100,00 a	100,00 a	100,00 a
2000 ppm	100,00 a	100,00 a	100,00 a	100,00 a
Controle	0,00 c	0,00 c	0,00 c	0,00 b

<sup>1</sup> Médias seguidas pela mesma letra na vertical não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

**Tabela 2:** Efeito do óleo essencial de orégano na germinação de esporos de alguns fungos fitopatogênicos.

Concentração	Inibição da germinação (%)		
	<i>Corynespora cassiicola</i>	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>
250 ppm	25,12 b <sup>1</sup>	20,34 b	55,60 b
500 ppm	100,00 a	100,00 a	100,00 a
1000 ppm	100,00 a	100,00 a	100,00 a
2000 ppm	100,00 a	100,00 a	100,00 a
Controle	0,00 c	0,00 c	0,00 c
CV (%)	12,34	15,83	11,15

<sup>1</sup> Médias seguidas pela mesma letra na vertical não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

A inibição de micro-organismos por óleos essenciais pode ocorrer por diferentes mecanismos de ação<sup>23</sup>. Os efeitos tóxicos na estrutura e função da membrana celular têm sido utilizados para explicar a ação antimicrobiana dos óleos essenciais e de seus componentes isolados. Esses efeitos estão associados ao caráter lipofílico dos constituintes dos óleos essenciais, que sofrem partição da fase aquosa para dentro da membrana celular<sup>24,25</sup>. Isto conduz à expansão da membrana, aumento da fluidez e da permeabilidade da célula, permitindo a liberação dos componentes intracelulares vitais à sobrevivência do micro-organismo. Alguns estudos sugerem que a ação antimicrobiana dos óleos essenciais pode ser consequência da inativação de enzimas, incluindo aquelas envolvidas na produção de energia e na síntese de componentes estruturais

do micro-organismo, além da destruição ou inativação de material genético<sup>26</sup>.

Entre os compostos presentes no óleo essencial de orégano, os fenóis monoterpênicos timol e carvacrol têm sido reportados na literatura por sua excelente atividade antimicrobiana. Esses compostos fenólicos podem perturbar as proteínas constituintes de membranas celulares e inibir a respiração celular. O álcool monoterpênico 4-terpineol apresenta atividade contra as bactérias *Candida albicans*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*<sup>27</sup>. O acetato de linalila apresenta atividade bacteriostática<sup>28</sup>.

Poucos trabalhos têm sido relatados na literatura sobre o efeito de óleos essenciais frente ao fungo *Corynespora cassiicola*. Carlos *et al.*<sup>29</sup> reportaram que o óleo essencial de *Achillea millefolium* inibe o crescimento micelial, a esporulação e a germinação de conídios de *Corynespora cassiicola*. Romero *et al.*<sup>1</sup> reportaram que o óleo essencial de *Thymus vulgaris*, constituído majoritariamente por timol (50%), foi capaz de inibir o crescimento micelial de *Corynespora cassiicola* e de outros micro-organismos (*Erwinia psidii*, *Sclerotinia minor*, *Colletotrichum musae*, *Fusarium moniliforme* e *Myrothecium verrucaria*).

#### 4 Conclusão

Os resultados apresentados no trabalho sugerem a potencialidade de aplicação do óleo essencial de orégano para o controle alternativo de doenças fúngicas ocasionadas pelos fungos *Corynespora cassiicola*, *Fusarium* sp., *Colletotrichum*

*gloeosporioides* e *Rhizoctonia solani*. Os resultados indicam, portanto, boas perspectivas para uso experimental desse óleo essencial no controle dos fitopatógenos em condições de casa-de-vegetação e de campo.

### Agradecimentos

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico)/MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento).

### Referências

- Romero AL, Specian V, Oliveira RC, Diniz SPSS. Atividade do óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris* L.) contra fungos fitopatogênicos. UNOPAR Cien Ciênc Biol Saúde 2009;11(3):15-8.
- Marques RP, Monteiro AC, Pereira GT. Crescimento, esporulação e viabilidade de fungos entomopatogênicos em meios contendo diferentes concentrações do óleo de nim (*Azadirachta indica*). Ciênc Rural 2004;34:1675-80.
- Zanandrea I, Juliano DS, Andréa BM, Juliane L, Veridiana KB. Atividade do óleo essencial de orégano contra fungos patogênicos do arroz: crescimentos micelial em placas. Rev Bras Farmacogn 2004;14(1):14-6.
- Basilico MZ, Basilico JC. Inhibitory effects of some spice essential oils on *Aspergillus ochraceus* NRRL 3174 growth and ochratoxin A production. Lett Appl Microbiol 1999;29:238-41.
- Farag RS, Daw ZY, Hewedi FM, El-Baroty GSA. Antibacterial activity of some Egyptian spices essential oils. J Food Prot 1989;52:665-7.
- Adam K, Sivropoulou A, Kokkini S, Lanaras T, Arsenakis M. Antifungal activities of *Origanum vulgare* subsp. *Hirsutum*, *Mentha spicata*, *Lavanula angustifolia* and *salvia fruticosa* essential oils against human pathogenic fungi. J Agricul Food Chem 1998;46:1739-45.
- Arango ACM, Sánchez JGB, Galvis LAB. Productos naturales con actividad antimicótica. Rev Esp Quimiot 2004;17:325-31.
- Cleff MB, Meinerz AR, Xavier M, Schuch LF, Meireles MCA, Rodrigues MRA, et al. *In vitro* activity of *Origanum vulgare* essential oil against *Candida* species. Braz J Microbiol 2010;41(1):116-23.
- Lorenzi H, Matos FJA. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas. São Paulo: Instituto Plantarum; 2002.
- Silva JPL, Duarte-Almeida JM, Perez DV, Franco BDGM. Óleo essencial de orégano: interferência da composição química na atividade frente a *Salmonella Enteritidis*. Ciênc Tecnol Aliment 2010;30(Supl.1):136-41.
- Silva WPK, Multani DS, Deverall BJ, Lyon BR. RFLP and RAPD analyses in the identification and differentiation of isolates of the leaf spot fungus *Corynespora cassiicola*. Aust J Bot 1995;43:609-18.
- Duarte MLR, Albuquerque FC, Prabhu AS. Uma nova enfermidade foliar do cacauzeiro (*Theobroma cacao* L.) causada pelo fungo *Corynespora cassiicola* (Bert. & Curt) Wei. Fitopatol Bras 1978;3:259-65.
- Yasue Y. Studies on the antibacterial action of fusaric acid, a metabolic product on the causative mould of the Bakanae disease of rice plants. J Antibiotic 1949;2:261-2.
- Pinto NFJA. Tratamento fungicida de semente de milho. In: Anais do Simpósio Brasileiro de Patologia de Sementes. Gramado; 1996. p.52-7.
- Souza Junior IT, Sales NLP, Martins ER. Efeito fungitóxico de óleos essenciais sobre *Colletotrichum gloeosporioides*, isolado do maracujazeiro amarelo. Biotemas 2009;22:77-83.
- Menzies JD. The first century of *Rhizoctonia solani*. In: Parmeter JR. *Rhizoctonia solani*, Biology and Pathology. Berkeley: University of California; 1970.
- Adams RP. Identification of essential oil components. Illinois: Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy Allured; 2001.
- Edginton LV, Knew KL, Barron GL. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. Phytopathol 1971;62:42-4.
- Brochini CB, Roque NF. Two new cneorubin related diterpenes from the leaves of *Guarea guidonia* (Meliaceae). J Braz Chem Soc 2000;11:361-4.
- Baptistella LHB, Imamura PM, Melo LV, Castello C. Preparação do (+)- $\alpha$ -terpineol a partir do (+)-limoneno: monoterpenos de odor agradável em um projeto para química orgânica experimental. Quím Nova 2009;32:1069-71.
- Melo EC, Radünz LL, Alvarenga e Melo RC. Influência do processo de secagem na qualidade de plantas medicinais: revisão. Eng Agric 2004;12:307-15.
- Venskutonis PR. Effect of drying on the volatile constituents of thyme (*Thymus vulgaris* L.) and sage (*Salvia officinalis* L.). Food Chem 1997;59:219-27.
- Lambert RJW, Skandamis PN, Coote PJ, Nychas GJE. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. J Appl Microbiol 2001;91:453-62.
- Sikkema J, Bont JA, Poolman B. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. J Biol Chem 1994;269:8022-8.
- Sikkema J, Bont JA, Poolman B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. Microbiol Rev 1995;59:201-22.
- Trombetta D, Castelli F, Sarpietro MG, Venuti V, Cristani M, Daniele C, et al. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. Antimicrob Agents Chemother 2005;49:2474-8.
- Carson CF, Riley TV. Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. J Appl Microbiol 1995;78:264-9.
- Sokovic M, van Griensven LJLD. Antimicrobial activity of essential oils and their components against the three major pathogens of the cultivated button mushroom, *Agaricus bisporus*. Eur J Plant Pathol 2006;116:211-24.
- Carlos MM, Schwan-Estrada KRF, Itako AT, Bonaldo SM, Mesquini RM, Carvalho JB et al. Efeito de extrato bruto e óleo essencial de *Achillea millefolium* em desenvolvimento *in vitro* de *Corynespora cassiicola* e proteção de pepino à mancha de corinespora. Arq Inst Biol 2010;77:309-16.

