

Controle do fungo *Myrothecium verrucaria* por óleos essenciais¹

Diniz, S. P. S. S.¹; Utumi H¹; Bonzanini F.¹; Queiroz M. C.²

¹Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais, Departamento de Bioquímica da Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo nº 5790 – CEP: 87020-900 – Maringá – PR. E-mail: dnz1210@hotmail.com. ²Departamento de Biologia da Fundação Universidade Federal do Amapá – UNIFAP, Avenida Juscelino Kubitschek, Rodovia Marco Zero - CEP: 68902-280 – Macapá - AP.

RESUMO: O uso de óleos essenciais com atividade biológica no controle de *Myrothecium verrucaria* foi estudado objetivando avaliar o potencial destes óleos no controle deste fitopatogênico. Os óleos utilizados foram os de estragão (*Artemisia draconculus*), tomilho (*Thymus vulgaris*), manjerona (*Origanum majorana*), menta citrata (*Menta piperita* var. *Citrata*), e manjerição roxo (*Ocimum basilicum* L.), que foram extraídos por arraste a vapor. O fungo foi plaqueado em meio de cultura BDA sólido na presença dos óleos em diferentes concentrações, e permaneceu incubado a 28°C por 7 dias. Os óleos de estragão, menta-citrata e tomilho na concentração 20 µL foram capazes de inibir o crescimento do microorganismo. Enquanto, esta inibição só foi obtida com os óleos de manjerona e manjerição roxo na concentração de 200 µL.

Palavras-chave: Óleos essenciais, fungos, plantas medicinais.

ABSTRACT: Control of fungus *Myrothecium verrucaria* by essential oils. The use of vegetable oils with biological activity in the control of *Myrothecium verrucaria* was studied. The tarragon oils (*Artemisia draconculus*), thyme (*Thymus vulgaris*), manjerona (*Origanum majorana*), mint citrata (*Menta piperita* var. *citrata*), purple basil (*Ocimum basilicum* L.), they were effective agents in the control of *Myrothecium verrucaria*. Tarragon, mint citrata and thyme in the concentration 20 µL were capable to inhibit the growth of the microorganism. While, this inhibition was only obtained with the oils of manjerona and purple basil in the concentration of 200 µL.

Key words: Ant microbial activity, essential oils, and fungus.

INTRODUÇÃO

O *Myrothecium verrucaria*, pertence aos Deuteromycetes, portanto é um fungo imperfeito (Reddy-Prhdhvi & Ahmed, 1998a), conhecido pela atividade degradadora de celulose, e com larga distribuição no solo e nos vegetais (Mouchacca, 1996; Hannusch & Boland, 1996).

Portanto o microorganismo afeta diversas espécies de plantas economicamente importantes, dentre as quais, cereais, plantas ornamentais e madeiras (Walker & Tilley, 1997).

Toxinas produzidas por *Myrothecium verrucaria* tem sido alvo dos estudos de Reddy *et al.*, 1996; Reddy & Ahmed, 1998 a,b. Os mesmos autores citam a biossíntese destas toxinas também em *Myrothecium roridum*. A ação fisiológica destas toxinas foi pesquisada em tecidos e órgãos de ovelhas e gado, uma vez que, tem sido constatadas a contaminação de rações com *Myrothecium* (Reddy e Ahmed, 1998a). As alterações observadas foram resecamento do intestino grosso, modificações no tecido hepático e sanguíneo, sinalizando um

acentuado decréscimo do fibrinogênio (Reddy & Ahmed, 1998b).

Paralelamente, o *Myrothecium verrucaria* produz altas atividades de quitinase extracelular quando crescido em meio contendo quitina como única fonte de carbono (Vyas e Deshpande, 1989). Também foram relatadas a produção de celulase, endoglucanase, proteinase e lipase (Kurakov *et al.*, 1996; Mendosa *et al.*, 1996; Abraham & Kurup, 1997). Em decorrência da atividade de quitinase o *Myrothecium verrucaria* tem sido recomendado como um inseticida biológico, atuando no controle de *Aedes aegypti*, agente causador da dengue e febre amarela (Mendosa *et al.*, 1996). Alguns isolados de *Myrothecium verrucaria* têm sido investigado quanto a possível ação herbicida (Yang & Jong, 1995 a, b).

O controle de fungos pela utilização de óleos e bálsamos naturais tem sido largamente relatado (Basile *et al.*, 1988; Fernandes *et al.*, 1992). Sendo que a atividade antiinflamatória do bálsamo de copaíba, por exemplo, além das propriedades de anti-séptico, expectorante e bactericida tem sido exaustivamente pesquisada (Fernandes *et al.* 1992; Casamada, 1968; Leung, 1980). O controle de *Fusarium sp.* pelo uso do bálsamo de copaíba em diferentes concentrações tem sido registrada por Diniz

Recebido para publicação em 22/10/01
e aceito para publicação em 20/05/03.

(1999). Resultados similares no controle de microorganismos distintos, por exemplo, *Alternaria zinniae*, *Macrophomina phaseolina* e *Gibberella zeae*, foram obtidos por Bolkan & Ribeiro (1981), Chalfoun & Carvalho (1987) e Bastos (1997). Estes autores utilizaram variados óleos e extratos vegetais, dentre os quais óleo de pimenta e alho.

Portanto, a utilização de extratos, óleos e bálsamos vegetais, têm se constituído numa alternativa biológica em substituição ao emprego de fungicidas e bactericidas químicos.

Este trabalho teve por objetivo pesquisar o potencial que óleos essenciais extraídos de estragão (*Artemisia dracunculoides*), tomilho (*Thymus vulgaris*), manjerona (*Origanum majorana*), menta citrata (*Mentha piperita* var. Citrata), manjerição roxo (*Ocimum basilicum* L.), possam ter no controle do desenvolvimento do fungo *Myrothecium verrucaria*.

MATERIAL E MÉTODO

1. Organismo

O microorganismo usado, o fungo *Myrothecium verrucaria*, que foi obtido junto a Coleção de Microorganismos da Fundação André Tossello, Campinas/SP-Brasil.

2. Meio de cultivo

Nos diferentes ensaios foi utilizado o meio de cultivo BDA (aveia sólida). Este meio é preparado com 10 gramas de sacarose, 18 gramas de ágar, e 30 gramas de farinha de aveia em 1 litro de água destilada. Em seguida o meio de cultura e todas as vidrarias a serem utilizadas foram autoclavadas.

3. Obtenção dos Óleos.

Após separação das folhas dos vegetais, as mesmas foram secas em estufa com circulação a ar, a 45°C (marca: Fanen) e moídas em moinho tipo faca (marca: Tecnal Te-340). Sendo que os óleos essenciais foram extraídos por arraste a vapor, em extrator (marca: Fisatom).

4. Ensaio Microbiológico

Foi realizado em placas de Petri (60x15 mm), contendo 10 ml do meio de cultura BDA, sobre o qual foram distribuídos 100 µL de uma suspensão do microrganismo. A suspensão fúngica foi preparada pela diluição de 1 mL de uma cultura líquida previamente crescida por 7 dias, em 10 ml de água esterilizada. A cada placa foi adicionado um disco de papel filtro contendo respectivamente 20 µL e 200 µL dos referidos óleos. A incubação foi feita a 28°C ±

1°C em estufa microbiológica (marca: Fanen) por 7 dias horas, sendo que a análise se dava a cada 24 horas, anotando-se as observações. O controle foi realizado pelo uso do fungicida captafol (produto comercial a 48% de p.a.). Foi realizada a determinação da inibição de crescimento do fungo pela média de 5 repetições para cada tratamento, através dos valores de PIC (Percentual de Inibição do Crescimento Micelial), método descrito por Edginton *et al.* (1971), cuja fórmula é a seguinte:

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

RESULTADO E DISCUSSÃO

Os óleos vegetais testados foram capazes de controlar o crescimento dos fungos, a uma taxa de 100% para algumas concentrações dos óleos. A tabela 1 sumariza os resultados alcançados quanto às doses mínimas dos óleos para o controle efetivo dos fungos.

TABELA 1 – Percentual de inibição do crescimento* de *Myrothecium verrucaria* através da utilização de óleos vegetais.

Óleos Vegetais	Concentração dos Óleos	
	20µL	200µL
Tomilho	100 %	100 %
Estragão	100 %	100 %
Manjerição Roxo	50 %	100 %
Manjerona	60 %	100 %
Menta Citrata	100 %	100 %
Padrão – Controle 1	00 %	00 %
Meio sem adição		
Padrão – Controle 2	20 %	55 %
Meio + Fungicida**		

*PIC = Percentagem de inibição do crescimento micelial, método descrito por Edginton *et al.* (1971). ** Fungicida = captafol

A presença de diferentes óleos essenciais na composição dos extratos de tomilho, estragão, manjerição roxo, manjerona e menta citrata justificam a ação antifúngica apresentada por estes extratos.

Observamos que no controle do *Myrothecium verrucaria*, os óleos de Tomilho, Estragão e Menta Citrata foram capazes de inibir totalmente o crescimento do fungo tanto na concentração de 200 µL quanto em 20 µL. Os óleos de Manjerona e Manjerição roxo só inibiram na concentração de 200 µL. Timol, carvacrol, mentol, ametol, estragol, chavicol são óleos essenciais presentes em proporções significativas nos extratos de tomilho, estragão, manjerição roxo, manjerona e menta citrata (Lin *et al.* 1999; Passino *et al.*, 1999). Estes óleos essenciais possuem comprovada atividade antimicrobiana como relatado

por Purba *et al.* (1985), Charai *et al.* (1996), Sarer *et al.* (1996).

CONCLUSÃO

Estes resultados apontam para uma efetiva ação de controle que estes óleos podem exercer sobre o microorganismo pesquisado "*in vitro*", indicando, que testes devam ser realizados *in vivo*" objetivando mensurar o potencial que estes óleos possam ter como fungicidas alternativos ao uso dos fungicidas químicos.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- ABRAHM, M., KURUP, G.M. Kinetics of enzymatic Saccharification of prated tapioca waste (*Manihot esculenta*) and water hyacinth (*Eichhornia crassipes*). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.66, n.2, p. 133-45, 1997.
- BASILE, A.C., SERTIÉ, J.A.A., FREITAS, P.C.D. et al. Anti-inflammatory activity of oleoresin from Brazilian *copaifera*. **Journal of Ethno pharmacology**, v.22, p.101-9, 1988.
- BASTOS, C.N. Efeito do óleo de *Piper aduncum* sobre *Crinipellis pernicioso* e outros fungos fitopatogênicos. **Fitopatologia Brasileira**, v. 22, n.3, p.441-3, 1997.
- BOLKAN, H.A., RIBEIRO, W.R.C. Efeito do extrato de alho em *Cylindrocladium clavatum*, *Fusarium moniliforme* var. *Subglutinans* e *Rhizoctonia solani*. **Fitopatologia Brasileira**, v.6, p.565-6, 1981. Resumo.
- CASAMADA, R. S. **Farmacognosia com Farmacodinamia**. Barcelona: Ed. Científico-Médica, 1968. p. 551-6.
- CHALFOUN, S.M., CARVALHO, V.D. Efeito do extrato de óleo industrial de alho sobre o desenvolvimento de fungos. **Fitopatologia Brasileira**, v.12, p.234-5, 1987.
- CHARAI, M., MOSADDAK, M., FAID, M. Chemical composition and ant microbial activities of two aromatic plants: *Origanum majorana* L. and *O. compactum* Benth. **Journal Essential Oil Research**, v.8, n.6, p.657-64, 1996.
- DINIZ, SPSS. **Aspectos fisiológicos e bioquímicos do ácido fusário, seus efeitos na anatomia vegetal e controle de *Fusarium sp.* pelo bálsamo de copaíba**. 1999, 97p. Tese (doutorado) Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- EDGINTON, L.V., KNEW, K.L., BARRON, G.L. Fungi toxic spectrum of benzimidazole compounds. **Phytopathology**, v.62, p.42-4, 1971.
- FERNANDES, R.M., PEREIRA, N. A, PAULO, L.G. Anti-inflammatory activity of copaiba balsam (*Copaifera cearensis*, Huber). **Revista Brasileira de Farmacologia**, v.73, n.3, p.53-6, 1992.
- HANNUSCH, D.J., BOLAND, G.J. Interactions of air temperature, relative humidity and biological control agents on grey mold of bean. **European Journal of Plant Pathology** v. 102, n.2, p.133-42, 1996.
- KURAKOV, A.V., BOLOBOVA, A.V., ANKELO, M.J. Screening of microscopic fungi, producing thermastable celluloses. **Prikladnaya Brokhimiya i Mikrobiologiya**, v.32, n.4, p. 397-405, 1996.
- LEUNG, A. Y. **Encyclopedia of common natural ingredients used in foods, drugs and cosmetics**. New York: John Wiley & Sons, 1980, p. 47-48.
- LIN, et al, 1999
- MENDONSA, E.S., VARTK, P.H., RAO, J.U., et al. An enzyme from *Myrothecium verrucaria* that degrades insect cuticles for biocontrol of *Aedes aegypti* mosquito. **Biotechnology Letters**, v.18, n. 4, p. 373-6, 1996.
- MOUCHACCA, J. Check list of novel fungi from the Middle East described mainly from soil since 1930. **Sydowia**, v.42, n. 2, p.240-57, 1996.
- PASSINO, G.S., BAZZONI, E., MORETTI, M.D.L., et al. Effects of essential oil formulations on *Ceratitis capitata* Wied. Adult flies. **Journal Applied Entomology**, v. 123, n.3, p. 145-9, 1999.
- PURBA, A.V., HUTAPEA, J.R., SUTJIPTO, D., et al. Analysis of thimol and carvacrol in the essential oil of *Thymus vulgaris* L. with high performance liquid chromatography. **Acta Pharmology Indonesian**, v.10, n.4, p.111-20, 1985.
- REDDY, P., AHMED, M.N. Hematological studies in bullocks in natural out-breaks of myrothecio toxicosis. **Indian Veterinary Journal** v.75, p.416-8, 1998a.
- REDDY, P., AHMED, M.N. Studies on liver function tests in bullocks affected with myrothecio toxicosis. **Indian Veterinary Journal**, v. 75, p. 650-1, 1998b.
- REDDY, P., RADHAKRISHNAIAH, K., HAFEZ, M.D., et al. Myrothecio toxicosis in cattle. **Indian Veterinary Journal**, v.73, p. 1231-4, 1996.
- SARER, et al., 1996
- VYAS, P.R., DESHPANDE, M.V. **Journal General Applied Microbiology**, v.35, p.343-50, 1989.
- WALKER, H.L., TILLEY, A.M. Evolution of an isolate of *Myrothecium verrucaria* from Sicklepood (*Senna obtusifolia*) as a potencial mycoherbicide agent. **Biological Control**, v.10, n.2, p.104-12, 1997.
- YANG, S.M., JONG, S.C. Host range determination of *Myrothecium verrucaria* isolated from leafy spurge. **Plant Disease**, v.79, p. 994-7. 1995a.
- YANG, S.M., JONG, S.C. Factors influencing pathogen city of *Myrothecium verrucaria* isolated from *Euphorbia esei* on species of *Euphorbia*. **Plant Disease**, v.79, p. 998-1002, 1995b.