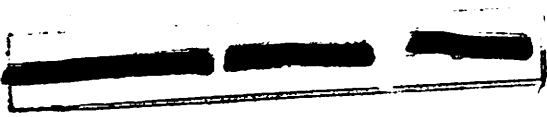




**CONSTITUIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE
FUNGITÓXICA DE EXTRATOS DE *Thymus
vulgaris* L.**

ANDREA YU KWAN VILLAR SHAN

2002



1

2

3

4

5

ANDREA YU KWAN VILLAR SHAN

CONSTITUIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE
FUNGITÓXICA DE EXTRATOS DE *Thymus vulgaris* L.

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Agroquímica e Agrobioquímica, para obtenção do título de "Mestre".

Orientadora

Dra. Maria das Graças Cardoso

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2002

**Ficha Catalográfica preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Shan, Andrea Yu Kwan Villar Shan

Constituição química e atividade fungitóxica de extratos de *Thymus vulgaris*
L./ Andrea Yu Kwan Villar Shan. --Lavras: UFLA, 2002.
58 p.: il.

Orientadora: Maria das Graças Cardoso

Dissertação (Mestrado) – UFLA

Bibliografia

1. Planta medicinal. 2. Fitoquímica. 3. Atividade fungitóxica. 4. Óleo
essencial. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD - 583.87

- 615.322387

ANDREA YU KWAN VILLAR SHAN

**CONSTITUIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE
FUNGITÓXICA DE EXTRATOS DE *Thymus vulgaris* L.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Agroquímica e Agrobioquímica, para obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 25 de fevereiro de 2002

PhD. Luiz Cláudio de Almeida Barbosa

UFV

Dr. Messias José Bastos de Andrade

UFLA

Maria das Graças Cardoso
Dra. Maria das Graças Cardoso

UFLA

(Orientadora)

LAVRAS

MINAS GERAIS - BRASIL

Ao meu pai, Shan (*in memoriam*),

que sempre sonhou...

ao meu filho, Lucas,

minha motivação principal

DEDICO

Ao meu marido, Antônio, por estar sempre presente

à minha mãe, Neide, pelo amor, carinho, apoio e constante torcida

aos eternos amigos, pelo companheirismo e força

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Ao meu filho, Lucas, pela alegria e amor infinito, que me deram a força necessária para lutar nas horas mais difíceis.

Ao meu marido, Antônio Américo, que tentou compreender minhas ausências, e sempre esteve ao meu lado.

À minha mãe, Neide Villar Shan, pelo exemplo de bondade, esperança e fé em um futuro sempre melhor.

Aos meus irmãos, Alexandre e Leandro, pela constante torcida.

À minha querida orientadora, Dra. Maria das Graças Cardoso, por acreditar na minha capacidade, incentivando-me sempre, estando presente em todos os momentos difíceis, profissionais e pessoais, com uma palavra amiga e braços abertos, prontos a ajudar.

Ao professor Dr. Paulo Estevão de Souza, pela co-orientação e direcionamento.

Aos meus co-orientadores, Dr. Luciano Vilela Paiva e Dr. Wilson Roberto Maluf, meu obrigada.

Ao professor Dr. David Lee Nelson e Dr. Mário César Guerreiro, pelas análises cromatográficas e pela ajuda na interpretação dos espectros.

Ao meu sogro, professor Dr. Antônio Américo Cardoso (Universidade Federal de Viçosa), pela ajuda e orientação nas análises estatísticas e, especialmente, pela atenção, preocupação e disposição sempre.

À querida Dra. Josefina (Josy), pelo inestimável auxílio e 'profundas' dicas no experimento biológico.

Aos professores e funcionários do Departamento de Química, pela boa convivência nesses tempos difíceis.

Às secretárias do Departamento de Química, Verinha e Míriam, pela simpatia em qualquer hora do dia.

Ao Departamento de Fitopatologia, em especial ao Laboratório de Epidemiologia e Manejo, pelo espaço concedido para os testes biológicos.

À Elô e Marcos, 'cartões postais' do Departamento de Fitopatologia, que sempre estiveram dispostos a ajudar e ensinar.

Ao Laboratório de Tecnologia da Madeira do Departamento de Ciências Florestais; em especial, ao professor Dr. Paulo Fernando Trugilho, pelo empréstimo de materiais essenciais às análises biológicas.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

À minha grande família do laboratório, aqueles que sempre trabalham nos bastidores, alunos de iniciação e para sempre guardados no meu coração: Vanisse (Vavá), Priscila (Pri), Fábio (Fabão), Thaísa, Flávio, Wellington, pela ajuda experimental e, principalmente, pela amizade, carinho e boas risadas.

Ao filho pródigo, Luciano (Borinho!) e à Cleusa (Creide!), nossa funcionária nota 1000, por toda ajuda durante nossa convivência.

Às amigas eternas Grécia Oiama, Ana Carolina, Ana Paula, Norma, pela força, companheirismo, carinho, apoio e constante presença. Amo vocês!

Aos amigos de curso, pela união e amizade, em especial à Andréia Xisto, inesquecível companheira de estudos.

Àqueles que passaram por 'nossa casa' e deixaram saudades: Flávia, Rozane, Alan, Suzan, Juliano, Zigoto, Breno, Fabiano, Anailda e Marwin.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para minha formação.

Finalmente, agradeço a DEUS, meu principal Apoio, que oferece-me, a cada dia, vida, amor, conforto nas horas de refúgio e a possibilidade de ser feliz, até nos piores momentos da vida. Abençoe-me sempre!

BIOGRAFIA

Andrea Yu Kwan Villar Shan, nascida aos doze dias do mês de janeiro de 1971, na cidade de São Paulo-SP; filha de Shan Shing Fat e Neide Villar Shan.

Conclui o 2º grau na Escola Estadual de Barbacena-MG, em 1988. Graduou-se em Química (Bacharelado), no ano de 1995, pela Universidade Federal de Viçosa. Aperfeiçoou-se em Síntese Orgânica pelo Departamento de Química na Universidade Federal de Lavras. Atualmente, está concluindo o curso de mestrado em Agronomia/Agroquímica e Agrobioquímica.

SUMÁRIO

LISTA DE SÍMBOLOS	i
RESUMO.....	ii
ABSTRACT	iv
1 INTRODUÇÃO	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO	3
2.1 Plantas medicinais aromáticas.....	3
2.1.1 Princípios ativos	4
2.1.2 Bioatividade.....	6
2.2 A espécie <i>Thymus vulgaris</i> L.	8
2.3 Fitoquímica	16
2.4 Patógenos fúngicos	18 ✕
2.4.1 As espécies estudadas	20 ¹
3 MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1 Material vegetal	22
3.2 Estudo fitoquímico	22
3.2.1 Prospecção fitoquímica	22
3.2.2 Obtenção dos extratos vegetais brutos.....	24 ✕
3.2.3 Fracionamento e isolamento dos constituintes químicos	25
3.2.4 Caracterização e identificação dos compostos isolados	29
3.3 Óleo essencial.....	30
3.3.1 Extração e rendimento	30
3.3.2 Caracterização e identificação dos constituintes químicos	30
3.4 Atividade fungitóxica	30
3.4.1 Crescimento e/ou inibição micelial.....	31
3.4.2 Análise estatística	32
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	33

4.1.3	Caracterização e identificação dos compostos isolados	35
4.2	Óleo essencial.....	37
4.2.1	Rendimento	37
4.2.2	Identificação química.....	38
4.3	Atividade fungitóxica	40
4.3.1	Crescimento e/ou inibição micelial das espécies fúngicas estudadas	40
5	CONCLUSÕES.....	47
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
	ANEXOS A	55

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Reagentes utilizados na identificação das classes de metabólitos presentes em folhas de <i>T.</i>	23
TABELA 2: Seqüência de fracionamento do extrato etanólico por CLC.....	27
TABELA 3: Seqüência de fracionamento do extrato metanólico por CLC.....	29
TABELA 4: Rendimentos dos extratos brutos obtidos por percolação a frio de folhas secas de <i>T. vulgaris</i>	34
TABELA 5: Rendimentos do óleo essencial de folhas de <i>T. vulgaris</i> sob diferentes condições.....	37
TABELA 6: Resultados médios de quatro repetições do Índice de Crescimento Micelial (ICM) de três espécies fúngicas submetidas a quatro concentrações e dois extratos vegetais.....	41

FIGURA 10: Estruturas químicas da (a) morfina, (b) quinina e (c) cânfora.....	16
FIGURA 11: Fluxograma da extração utilizada na obtenção dos extratos brutos de <i>T. vulgaris</i>	25
FIGURA 12: Subfrações obtidas pela reunião das frações por CCD do extrato etanólico.....	28
FIGURA 13: Espectro no infravermelho do composto X1 obtido pelo fracionamento do extrato etanólico de <i>T. vulgaris</i> em coluna cromatográfica.....	36
FIGURA 14: Espectro no infravermelho do composto Y1 obtido pelo fracionamento do extrato metanólico de <i>T. vulgaris</i> em coluna cromatográfica.....	36
FIGURA 15: Espectro no infravermelho do óleo essencial obtido de folhas de <i>T. vulgaris</i>	40
FIGURA 16: Efeito das concentrações do extrato etanólico obtido de folhas de <i>T. vulgaris</i> no Índice de Crescimento Micelial (ICM), em cm, dos fungos <i>B. sorokiniana</i> , <i>A. alternata</i> e <i>C. gloeosporioides</i>	43
FIGURA 17: Efeito das concentrações do extrato metanólico obtido de folhas de <i>T. vulgaris</i> no Índice de Crescimento Micelial (ICM), em cm, dos fungos <i>B. sorokiniana</i> , <i>A. alternata</i> e <i>C. gloeosporioides</i>	44

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Estruturas químicas da (a) elemicina e do (b) eugenol.....	5
FIGURA 2: Planta aromática <i>T. vulgaris</i> localizada no Horto de Plantas Medicinais da UFLA.....	9
FIGURA 3: Estruturas químicas de flavonas identificadas em <i>T.vulgaris</i> . (a) Thymonina-5,6,4'-triidroxi-7,8,3'-trimetoxiflavona, (b) Cirsilineol-5,4'-diidroxi-6,7,3'-trimetoxiflavona,(c)5,4'-diidroxi-6,7,8,3'-tetrametoxiflavona	11
FIGURA 4: Estruturas químicas de depsídeos isolados de <i>T. vulgaris</i> . (a) ácido rosmarínico e (b) ácido clorogênico.....	11
FIGURA 5: Estruturas químicas dos ácidos fenólicos identificados em <i>T. vulgaris</i> . (a) ácido protocatéquico, (b) ácido gentísico, (c) ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico, (d) ácido vanílico, (e) ácido siríngico, (f) ácido cafeico, (g) ácido <i>p</i> -cumárico, e (h) ácido ferúlico.....	12
FIGURA 6: Estruturas químicas de alguns constituintes terpênicos presentes no óleo essencial de <i>T. vulgaris</i> . (a) geraniol, (b) linalol, (c) α -terpineol, (d) tujanol-4, e (e) terpinen-4-ol.....	13
FIGURA 7: Estrutura química do 1,8-cineol.....	13
FIGURA 8: Estrutura química de outros constituintes presentes no óleo essencial de <i>T vulgaris</i> . (a) timol, (b) carvacrol e (c) <i>p</i> -cimeno.....	13
FIGURA 9: Estrutura química do terpineno.....	14

FIGURA 10: Estruturas químicas da (a) morfina, (b) quinina e (c) cânfora.....	16
FIGURA 11: Fluxograma da extração utilizada na obtenção dos extratos brutos de <i>T. vulgaris</i>	25
FIGURA 12: Subfrações obtidas pela reunião das frações por CCD do extrato etanólico.....	28
FIGURA 13: Espectro no infravermelho do composto X1 obtido pelo fracionamento do extrato etanólico de <i>T. vulgaris</i> em coluna cromatográfica.....	36
FIGURA 14: Espectro no infravermelho do composto Y1 obtido pelo fracionamento do extrato metanólico de <i>T. vulgaris</i> em coluna cromatográfica.....	36
FIGURA 15: Espectro no infravermelho do óleo essencial obtido de folhas de <i>T. vulgaris</i>	40
FIGURA 16: Efeito das concentrações do extrato etanólico obtido de folhas de <i>T. vulgaris</i> no Índice de Crescimento Micelial (ICM), em cm, dos fungos <i>B. sorokiniana</i> , <i>A. alternata</i> e <i>C. gloeosporioides</i>	43
FIGURA 17: Efeito das concentrações do extrato metanólico obtido de folhas de <i>T. vulgaris</i> no Índice de Crescimento Micelial (ICM), em cm, dos fungos <i>B. sorokiniana</i> , <i>A. alternata</i> e <i>C. gloeosporioides</i>	44

FIGURA 18: Bioensaios realizados com extrato etanólico obtido de folhas de *T. vulgaris*, sobre o crescimento e/ou inibição micelial dos fungos *B. sorokiniana*, *A. alternata* e *C. gloeosporioides*..... 45

FIGURA 19: Bioensaios realizados com extrato metanólico obtido de folhas de *T. vulgaris* L., sobre o crescimento e/ou inibição micelial dos fungos *B. sorokiniana*, *A. alternata* e *C. gloeosporioides*..... 46

LISTA DE SÍMBOLOS

BDA	batata, dextrose, ágar
CCD	cromatografia de camada delgada;
CG/EM	cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa;
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência;
CLC	cromatografia líquida de coluna;
EM	espectrometria de massa;
ICM	índice de crescimento e/ou inibição micelial;
IV	infra-vermelho;
PCA	potato, carrot, agar
R _f	índice ou fator de retenção;
RMN ¹ H	ressonância magnética de hidrogênio ou próton;
RMN ¹³ C	ressonância magnética de carbono-13;
UV	ultravioleta

RESUMO

SHAN, Andrea Yu Kwan Villar. **Constituição química e atividade fungitóxica de extratos de *Thymus vulgaris* L.** LAVRAS: UFLA, 2002. 58 p. (Dissertação - Mestrado em Agronomia)*

As pesquisas sobre a natureza química dos constituintes vegetais e suas aplicações como métodos alternativos de controle biológico são, hoje, alvo de diversas áreas científicas. Extratos vegetais estão sendo largamente explorados pelo setor agrônomo, no sentido de constituírem-se novas fontes de controle para a agricultura alternativa. A espécie *Thymus vulgaris* L. merece destaque pelos estudos científicos, que a caracterizaram por possuir intensa atividade inseticida, bactericida e fungicida. Com o presente trabalho teve-se por objetivos a caracterização e pré-identificação de constituintes químicos dos extratos brutos etanólico e metanólico dessa espécie, também a avaliação da atividade fungitóxica dos mesmos e a determinação do teor médio e da composição química do óleo essencial de folhas frescas e secas na estufa (40 °C). Os extratos foram obtidos por percolação a frio com solventes de polaridade crescente e fracionados por CLC e CCD, obtendo-se compostos caracterizados por ponto de fusão, solubilidade e semi-identificados por técnicas espectrométricas (IV). Os teores médios do óleo essencial foram obtidos por gravimetria e sua pré-identificação química foi feita por IV. A atividade fungitóxica foi realizada utilizando-se o método bioanalítico *in vitro*, no qual os extratos foram aplicados em concentrações de 5, 50 e 500 ppm, sobre as espécies fúngicas *Bipolaris sorokiniana*, *Alternaria alternata* e *Colletotrichum gloeosporioides*. Durante o período de incubação a 21 ± 2 °C sob fotoperíodo de 12 horas de luz e 12 horas de escuro, o crescimento das colônias foi obtido por medição ortogonal do diâmetro das colônias. Os resultados foram expressos por meio do ICM (índice de crescimento e/ou inibição micelial) e analisados estatisticamente. Os compostos isolados apresentaram pontos de decomposição $287,5 \pm 10$ °C e 263 ± 10 °C e as análises dos espectros no IV, permitem inferir a possibilidade de tratar-se de compostos similares, amínicos. O rendimento médio do óleo essencial das folhas frescas apresentou-se superior ao de folhas submetidas à secagem, com valores de 0,38% e 0,28% respectivamente, e os dados do espectro no IV inferem a presença de grupamentos funcionais, referentes aos compostos majoritários timol e carvacrol identificados em estudos anteriores.

* Comitê Orientador: Maria das Graças Cardoso - UFLA (Orientadora), Paulo Estevão de Souza - UFLA, Luciano Vilela Paiva - UFLA, Wilson Roberto Maluf - UFLA.

Quanto à atividade fungitóxica, o extrato etanólico foi mais efetivo, apresentando maior atividade inibitória na concentração de 500 ppm sobre a espécie *B. sorokiniana*.

ABSTRACT

SHAN, Andrea Yu Kwan Villar. **Chemical constitution and fungitoxical activity of the extracts of the *Thymus vulgaris* L.** LAVRAS: UFLA, 2002. 58 p. (Dissertation – Master in Agronomy)*

Researches concerning the chemical nature of the vegetal constituents and their applications as alternative methods of biological control are today subject of diverse scientific areas. Vegetal extracts are being widely explored by the agronomic field with the purpose of stablishing new sources of control in alternative agriculture. The species *Thymus vulgaris* L. deserves prominence for the scientific studies which characterized it for possessing intense insecticidal, bactericidal and fungicidal activities. The present work had as objectives the characterization and the pre-identification of the chemical constituents of the ethanolic and methanolic raw extracts of this species, as well as the evaluation of their fungitoxical activity and also the determination of the yield and chemical composition of the essential oil of green and dry leaves submitted to different conditions of drying under 40 °C in a stove. The extracts were obtained by percolating in cold temperature with increasing polarity solvents and fractionated by CLC and TLC obtaining composites characterized through melting point, solubility, and partly-identified by spectrometric technique (IR). The medium yield of the essential oil were obtained by gravimetry and its chemical pre-identification was done by IR. The fungitoxical activity was achieved using the bioanalytic method *in vitro*, in which extracts were applied in concentrations of 5, 50 and 500 ppm, on the fungical species *Bipolaris sorokiniana*, *Alternaria alternata* and *Colletotrichum gloeosporioides*. During the incubating period at 21 ± 2 °C under a photoperiod of 12 hours light and 12 hours dark, the growth of the colonies was obtained from orthogonal dimensioning of the diameter of the colonies. The results were expressed through the index of growth and/or inhibition micelial and analyzed statistically. The isolated composites presented $287,5 \pm 10$ °C and 263 ± 10 °C decomposition points and the IR spectral analysis, allows us to infer the possibility of these composites to be similar, aminic. The yield of the essential oil of the green leaves was superior in comparison to the leaves submitted to stove drying with values of 0,38% and 0,28% respectively and the IR spectra probably show the existence of the major compounds thymol and carvacrol identified in previous

* Guidance Committee: Maria das Graças Cardoso (Adviser), Paulo Estevão de Souza-UFLA (Co-Adviser), Luciano Vilela Paiva- UFLA (Co-Adviser), Wilson Roberto Maluf-UFLA.

studies. Concerning the fungitoxical activity, the ethanolic extract was more effective presenting a higher inhibitory activity ($p < 0,05$) at a concentration of 500 ppm. on the fungus *B. sorokiniana*.

1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais aromáticas são conhecidas desde os períodos remotos por possuírem forte relação com a cura. Atravessando vários milênios, os conhecimentos empíricos medicinais de tais plantas, advindos das antigas civilizações orientais e difundidos até o ocidente, ainda sobrevivem e servem de ponto de partida para inúmeras investigações científicas em diversas áreas.

Além dos metabólitos primários, essenciais a todo vegetal, as plantas medicinais aromáticas possuem metabólitos secundários, dos quais destacam-se os óleos essenciais, definidos como substâncias voláteis, de composição química complexa, responsáveis pelo seu aroma e sabor. Recentemente, atribuíram-se a esses compostos funções biológicas de defesa e perpetuação, tornando-os alvos de centros de pesquisa agrícola por serem potencialmente úteis no controle fitossanitário, propiciando o desenvolvimento de uma agricultura alternativa e/ou sustentável que visa a minimizar os efeitos negativos do uso de defensivos sintéticos para o homem e o meio ambiente.

Na pesquisa agronômica, as plantas aromáticas geram grandes perspectivas acerca de defensivos naturalmente produzidos, pois exibem resistência a diferentes patógenos, por meio de um tratamento específico eficaz e sem danos ambientais. Plantas aromáticas, como alho (*Allium sativum*), pimenta-do-reino (*Piper nigrum*) e arruda (*Ruta graveolens*) já estão sendo utilizadas como defensivos na agricultura orgânica (Delgado & Castillo, 1996).

Dentre as espécies aromáticas, a *Thymus vulgaris* L., conhecida popularmente por tomilho e pertencente à família Lamiaceae, apresenta inúmeras atividades biológicas, reflexos da diversidade química que possui. Indústrias farmacêuticas e alimentares são as mais antigas exploradoras dos extratos e óleos essenciais de *T. vulgaris* graças à comprovada atividade

antioxidante. Seus constituintes ativos descritos como timol e carvacrol são potentes bactericidas e fungicidas, sendo reconhecidos cientificamente. Outros compostos fenólicos, como taninos e flavonóides também já foram descritos em sua composição e relacionam-se com as atividades antioxidantes, expectorantes, digestivas e antiinflamatórias associadas à planta.

Na busca de metabólitos ativos potencialmente aproveitáveis pelo homem, um dos caminhos iniciais envolve estudos quimiosistemáticos (raças químicas x famílias botânicas), visto que a distribuição desses compostos restringe-se a determinadas famílias. Porém, os resultados podem apresentar-se bastante variáveis entre as espécies, pois esses compostos são altamente influenciados por fatores ontogênicos e ambientais. Neste contexto, a pesquisa fitoquímica apresenta-se como uma ferramenta útil, utilizando-se de técnicas analíticas e instrumentais que permitem o isolamento e elucidação de inúmeros compostos.

Levando-se em consideração a riqueza de compostos existentes em *T. vulgaris*, as potencialidades que apresenta e a necessidade de estabelecer métodos de controle seletivos e inofensivos ao meio ambiente, propôs-se neste trabalho:

- estudar quimicamente os extratos brutos alcoólicos, obtidos de folhas de *T. vulgaris*, na tentativa de isolamento e elucidação estrutural de constituintes ativos;
- avaliar o rendimento do seu óleo essencial obtido de folhas frescas e folhas submetidas à secagem, bem como sua caracterização e identificação química;
- avaliar a atividade fungitóxica dos extratos alcoólicos diante dos fitopatógenos *Colletotrichum gloeosporioides*, *Alternaria alternata* e *Bipolaris sorokiniana*, como formas de controle alternativo.

2 REFERENCIAL TEÓRICO



2.1 Plantas medicinais aromáticas

A utilização das plantas medicinais aromáticas pelo homem, seja na alimentação ou na cura de doenças, tem sido relatada historicamente desde 5000 anos atrás. As antigas civilizações chinesa e indiana foram as primeiras a citarem as ervas aromáticas como princípios de cura e se destacaram pelo grande comércio de especiarias. Naquela época, as ervas aromáticas eram consideradas moedas correntes e a fortuna das famílias era avaliada pelo seu estoque em pimenta e especiarias (canela, noz-moscada, cravo, gengibre). Mais tarde, com os egípcios, as plantas aromáticas alcançaram seu auge por meio da aromaterapia, medicina holística baseada na cura pelos óleos essenciais, compostos responsáveis por suas ações terapêuticas. Outras civilizações ancestrais, como os povos da Grécia e Roma, foram também grandes colaboradoras da ascensão medicinal de tais plantas (Lavabre, 1990; Bremness, 1993).

→ Tradicionalmente, a procura por plantas aromáticas sempre girou, dentre outros metabólitos, em torno de seus altos conteúdos de óleo essencial, metabólitos que lhes conferem aroma e sabor, e portanto, tornam-nas muito utilizadas pela indústria alimentar e cosmética. Segundo Furlan (1998), os países da Península Ibérica destacam-se pela elevada exportação de plantas aromáticas e condimentares. A atual tendência de crescimento do comércio mundial anual, por segmentos é: perfumaria - em torno de 6%; aromatizantes alimentícios - em torno de 8,5%, e óleos essenciais brutos - em torno de 7,5% (Gruenwald citado por Pinto *et al.*, 2001).

O Brasil da década de 70 ocupou 80% do mercado consumidor de mentol, produzindo 4000 toneladas de óleo essencial, com renda de 25 milhões

de dólares (D'andréa Pinto, 1988). Atualmente, o País possui aproximadamente 300 empresas que atuam na comercialização de plantas aromáticas, sendo o Paraná um Estado que se destaca em pesquisa, por possuir situações climáticas distintas, as quais permitem grande variedade de espécies nativas e exóticas (Pinto *et al.*, 2001).

2.1.1 Princípios ativos

Os organismos vegetais são um universo rico e complexo de compostos orgânicos, com inúmeros centros estereogênicos que participam ativamente no seu crescimento e desenvolvimento. Tais compostos, definidos como metabólitos secundários, são originados por vias biossintéticas alternativas e podem ser caracterizados como elementos de diferenciação e especialização celular, atuando com função de defesa e perpetuação do vegetal no ecossistema (Wink, 1990).

Os metabólitos secundários de maior atividade biológica são os ácidos orgânicos, alcalóides, flavonóides, cumarinas, taninos, óleos essenciais, saponinas, mucilagens e glicosídeos, e recebem a denominação de princípios ativos quando induzem respostas fisiológicas em outros organismos. A existência e distribuição desses compostos é bastante variável nas espécies vegetais e dependem de fatores hereditários, ontogênicos (etapas de desenvolvimento) e ambientais (solo, clima, microorganismos, etc) (Costa, 1972; Robbers *et al.*, 1997).

Em plantas aromáticas, os principais metabólitos secundários são os óleos essenciais, que são responsáveis pelo aroma que elas exalam e por sua atividade biológica. Quimicamente, são definidos como mistura de componentes químicos, voláteis, de baixo peso molecular. Cada constituinte químico e suas diferentes combinações, um atuando majoritariamente, outros competindo entre si ou em sinergismo, conferem aroma e sabor característico para o óleo

essencial. A composição química dos óleos essenciais apresenta compostos monoterpênicos, sesquiterpênicos e fenilpropanóides, que podem possuir ou não funções oxigenadas, como álcoois, éteres, aldeídos, cetonas e lactonas (Simões *et al.*, 2000; Cardoso *et al.*, 2000).

Sabe-se que algumas plantas aromáticas exibem variações qualitativas na composição do óleo essencial, decorrentes do estágio de desenvolvimento em que a planta se encontra. Entretanto, variações quantitativas existem principalmente em função da hora e época da coleta. Silva *et al.* (2000) testaram a variação dos constituintes químicos do óleo essencial de *Ocimum micranthum* Willd. em função da hora da coleta (2 em 2 horas a partir de 6 até as 18 horas) e de seu estágio de vida (folhas sem inflorescência, com inflorescência fresca e com inflorescência seca) e, observaram o aparecimento de um novo constituinte em estágios de vida distintos. A formação desse composto, reconhecido como elemicina e presente em teores de 21,6%, provocou diminuição de 17,5% no teor do composto majoritário, o eugenol (Figura 1). Com relação à hora da coleta, observaram que não houve variação na composição química.

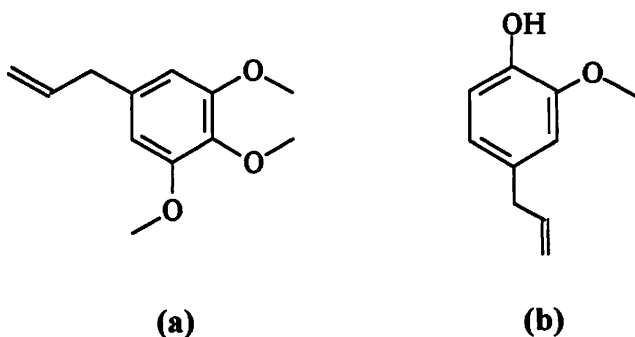


FIGURA 1: Estruturas químicas da (a) elemicina e do (b) eugenol

Em outros trabalhos realizados com plantas aromáticas, relacionam modificações qualitativas e quantitativas decorrentes do processo de secagem. Blanco *et al.* (2000a), estudando a influência da temperatura de secagem (40, 60 e 80 °C) no teor e composição química de óleo essencial de menta, verificaram que os teores encontrados a temperaturas de 60 e 80 °C foram 80% mais baixos do que aqueles observados a 40 °C. Quanto à composição química, essa apresentou-se modificada com temperaturas maiores de 40 °C. Em um experimento análogo, Blanco *et al.* (2000b) verificaram que a 60 e 80 °C os teores de óleo essencial de alecrim foram, respectivamente, 24% e 49% mais baixos do que aqueles observados a 40 °C. A composição química modificou-se com temperaturas maiores de 80 °C. Esses e outros estudos induzem à conclusão de que cada espécie vegetal reage distintivamente no que diz respeito ao conteúdo qualitativo e quantitativo do óleo essencial, quando submetido às mais diferentes condições de secagem.

Biologicamente, os óleos essenciais, por serem voláteis, são como sinais de comunicação química com o reino vegetal e armas de defesa contra o reino animal. Esse princípio torna as plantas aromáticas poderosas fontes de agentes biocidas largamente estudadas na agricultura, por apresentarem atividades bactericida, inseticida e fungicida (Saito & Scramin, 2000).

2.1.2 Bioatividade

As plantas aromáticas têm sido vistas como fontes de substâncias químicas de atividades biológicas intensas. O aroma que elas exibem podem exercer atração em alguns organismos, ou ao contrário, toxidez, repelindo-os. Dentro do contexto da agricultura alternativa, tais compostos poderiam funcionar seletivamente no controle de diversas pragas agrícolas e inofensivamente ao ambiente.

Uma avaliação da eficiência da erva aromática *Cymbopogon citratus*, conhecida popularmente como capim-limão, no controle de fitopatógenos e plantas daninhas do feijoeiro levou à conclusão de que o seu óleo essencial a 10% inibiu completamente o crescimento micelial de *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Rhizoctonia solani* (Valarini et al., 1995).

Bernardo et al. (1998) avaliaram a atividade fungitóxica dos extratos e óleos essenciais das espécies *Ocimum basilicum*, *Baccharis trimera* e *Ruta graveolens*, em diferentes concentrações, sobre os fungos *Alternaria alternata* e *Sclerotium rolfsii*, por meio do crescimento micelial. Observaram que os extratos brutos de *R. graveolens* e *O. basilicum* inibiram totalmente o crescimento micelial de *S. rolfsii* em concentrações acima de 10%, e que o óleo de *O. basilicum* apresentou melhor atividade, com inibição de 100% para as três espécies de fungos testadas em todas as concentrações.

Cruz et al. (2000) estudaram o efeito dos extratos aquosos de *Rosmarinus officinalis*, *Ocimum basilicum*, *Mentha piperita* e *Origanum vulgare* contra *Sclerotium rolfsii* em feijoeiros utilizando o método *in vivo*, e verificaram melhor desenvolvimento das plantas tratadas com o extrato em concentração de 40%.

Ito et al. (2000) pesquisaram o efeito do extrato bruto de *Baccharis trimera* (carqueja) nas concentrações de 1, 5, 10, 15, 20, 25 e 50% no crescimento e/ou inibição micelial dos fungos *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Colletotrichum graminicola*. O resultado obtido foi uma inibição de 36% e 57% sobre os fungos *R. solani* e *C. graminicola*, respectivamente, e pouca eficiência sobre *S. sclerotiorum*.

Mota et al. (2001), visando ao controle de *Lasiodiplodia theobromae*, avaliaram o efeito de extratos e óleos essenciais de várias plantas medicinais em diferentes concentrações. Dentre eles, os extratos e os óleos essenciais de *Lippia*.

sidoides e *Piper aduncum* mostraram-se bastante efetivos quanto à inibição do fungo.

Bernardo *et al.* (2001) avaliaram a inibição dos fungos *Rhizoctonia solani*, *Fusarium semitectum*, *Sclerotium rolfsii* e *Bipolaris sorokiniana* utilizando-se de um composto de extrato cítrico a 40%, incorporado às culturas fúngicas em concentrações de 100, 1000, 10000, 20000 e 40000 ppm. Esses pesquisadores observaram inibição micelial total a partir de concentrações acima de 10000 ppm em todos os fungos testados.

Bastos (2001) verificou que a atividade do óleo essencial de *Piper enckea* sobre crescimento micelial e germinação de conídios de *Crinipellis pernicioso* e *Phytophthora palmirosa*, nas concentrações 0, 100, 250, 500, 1000 e 2000 ppm, foi máxima em concentrações acima de 1000 ppm. Em trabalhos análogos, Bastos & Albuquerque (2001) avaliaram o efeito fungitóxico do óleo essencial de *Piper aduncum* sobre o patógeno *Colletotrichum musae*, responsável pela podridão dos frutos em bananas. A inibição do crescimento micelial e germinação de conídios *in vitro* foi total em concentrações maiores de 0,01% (v/v). Em testes realizados *in vivo*, os autores verificaram a mesma eficácia do óleo somente à concentração de 1% (v/v).

2.2 A espécie *Thymus vulgaris* L.

A espécie *Thymus vulgaris* L. é uma planta aromática pertencente à família Lamiaceae, cultivada na Europa, especialmente na Hungria, Alemanha, Espanha e sul da França. É encontrada, em estado silvestre, em terrenos secos e quentes da flora mediterrânea e, em especial, nas colinas áridas. Prefere regiões de climas temperados quentes, nas quais as temperaturas girem constantemente em torno de 20 °C ou pouco mais. No entanto, segundo Hertwig (1991), a espécie pode ser cultivada do Ártico aos trópicos, do nível do mar até em montanhas de 3.000 metros de altitude.

No Brasil, é conhecida popularmente por tomilho ou timo e já se encontra completamente aclimatada, ocupando a lista das 46 plantas aromáticas mais cultivadas do Estado do Paraná (Pinto et al., 2001).

Trata-se de um subarbusto perene de 15 a 40 cm de altura, que possui caule lenhoso e tortuoso, do qual partem numerosos ramos eretos, formando touceiras. Suas folhas são pequenas (6 a 9 mm de comprimento por 0,5 a 2 mm de largura), opostas, sésseis ou curtamente pecioladas, lanceoladas, oblongas ou ovais, de colorações verde na superfície adaxial e verde-acinzentada na superfície abaxial (Figura 2). As flores são pequenas, zigomorfas, bilabiadas de coloração rosada ou branca, às vezes, com tons lilases ou avermelhados, em espigas localizadas nas axilas das folhas superiores maiores, e com cálice tubuloso. Prefere solos soltos, profundos, arenosos, bem drenados, com boa exposição à luz solar, em que suas propriedades aromáticas são mais intensas (Castro & Chemale, 1995).

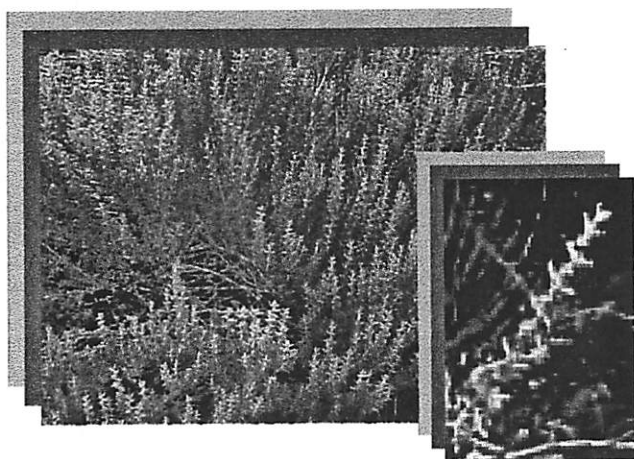


FIGURA 2: Planta aromática *T. vulgaris* localizada no Horto de Plantas Medicinais da UFLA

Quanto à constituição química, Hertwig (1991) cita a presença de álcoois, hidrocarbonetos, resinas, saponosídeos, vitaminas B-1 e C, óleo essencial e taninos. Em experimentos realizados por Guillén & Manzano (1998) constatou-se que a composição dos extratos das folhas e flores de *T. vulgaris* obtidos em diclorometano apresentaram altos teores de monoterpenos, sesquiterpenos, hidrocarbonetos saturados, flavonóides e vitamina E. Anteriormente, Broucke *et al.* (1982), estudando extratos hidroalcolícos (MeOH 85% e MeOH 50%) de folhas de *T. vulgaris*, por meio da cromatografia líquida de coluna e cromatografia de camada delgada, isolaram três compostos identificados estruturalmente como flavonas, uma subclasse dos flavonóides (Figura 3). Recentemente, Zgórk & Glowniak (2001), em estudos quimiotaxômicos, determinaram, em várias espécies estudadas, incluindo *T. vulgaris*, dois depsídeos, os ácidos rosmarínico e clorogênico (Figura 4), e alto conteúdo de fenólicos livres, precursores biossintéticos de taninos e flavonóides, caracterizados e identificados como ácidos protocatéquico, gentísico, *p*-hidroxibenzóico, vanílico, siríngico, cafeico, *p*-cumárico e ferúlico (Figura 5).

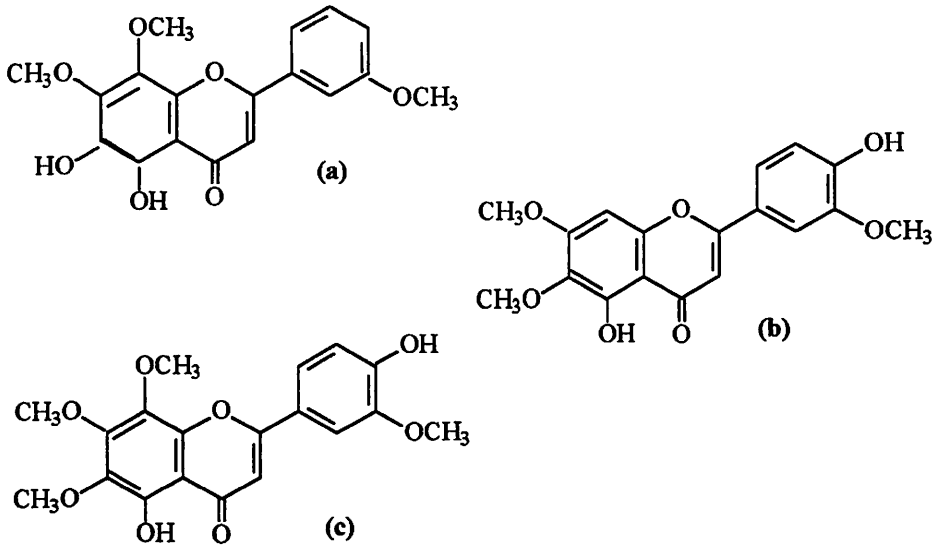


FIGURA 3: Estruturas químicas de flavonas identificadas em *T. vulgaris*. (a) Thymonina – 5,6,4'-trihidroxi-7,8,3'-trimetoxiflavona, (b) Cirsilineol – 5,4'-diidroxi-6,7,3'-trimetoxiflavona, (c) 5,4'-diidroxi-6,7,8,3'-tetrametoxiflavona

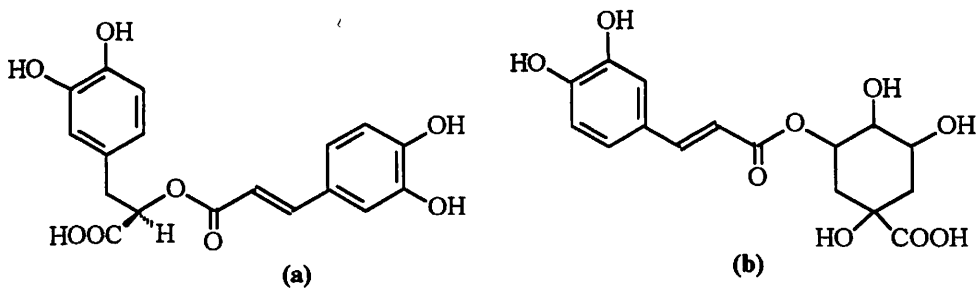


FIGURA 4: Estruturas químicas de depsídeos isolados de *T. vulgaris*. (a) ácido rosmarínico e (b) ácido clorogênico

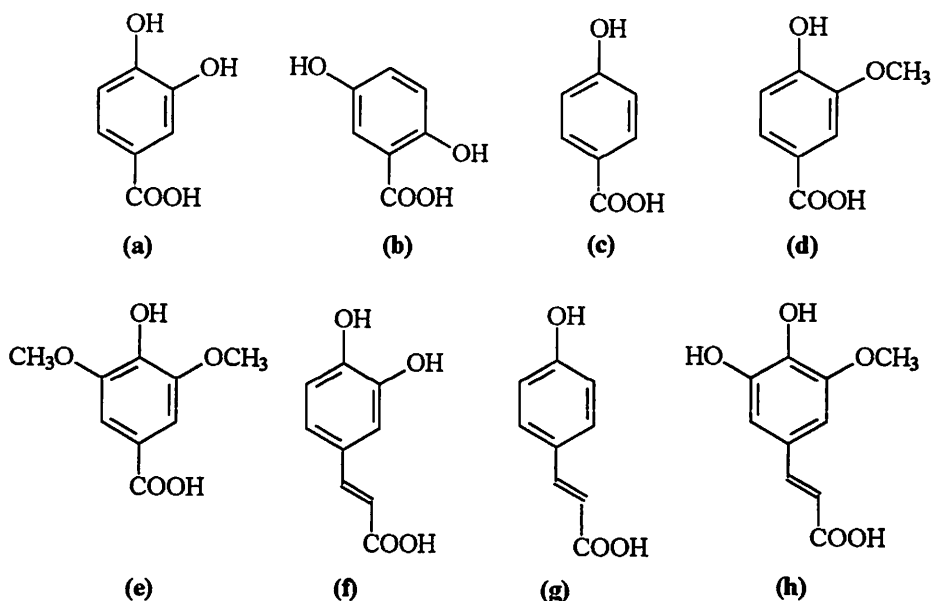


FIGURA 5: Estruturas químicas dos ácidos fenólicos identificados em *T. vulgaris*. (a) ácido protocatéuico, (b) ácido gentísico, (c) ácido *p*-hidroxibenzoico, (d) ácido vanílico, (e) ácido siríngico, (f) ácido cafeico, (g) ácido *p*-cumárico, e (h) ácido ferúlico

Quanto à constituição química do óleo essencial, Granger & Passet (1973) encontraram os monoterpenos: geraniol, linalol, α -terpineol, tujanol-4 e terpinen-4-ol em todas as cultivares estudadas (Figura 6). Posteriormente, Adzet *et al.* (1977) identificaram o composto 1,8-cineol como outro constituinte do óleo essencial de *T. vulgaris* (Figura 7).

Blum *et al.* (1997), pesquisando a constituição dos extratos e óleo essencial de *T. vulgaris* por meio da cromatografia de fluido supercrítico, descreveram a presença de timol, carvacrol e *p*-cimeno como constituintes majoritários (Figura 8).

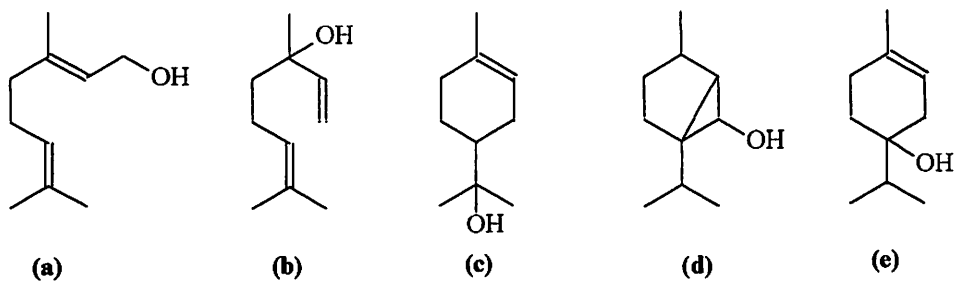


FIGURA 6: Estruturas químicas de alguns constituintes terpênicos presentes no óleo essencial de *T. vulgaris*. (a) geraniol, (b) linalol, (c) α -terpineol, (d) tujanol-4 e (e) terpinen-4-ol

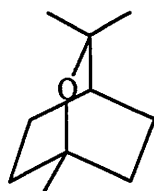


FIGURA 7: Estrutura química do 1,8-cineol

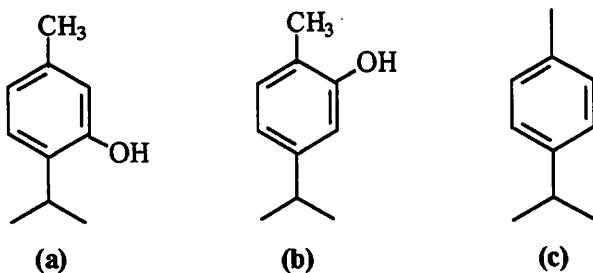


FIGURA 8: Estruturas químicas de outros constituintes presentes no óleo essencial de *T. vulgaris*. (a) timol, (b) carvacrol e (c) *p*-cimeno

Rösch *et al.* (1999), em estudos quantitativos e qualitativos de óleos essenciais por espectroscopia micro-Raman, caracterizaram como compostos majoritários timol em *T. vulgaris* e carvacrol em *Origanum vulgare*, e observaram que entre as espécies vegetais, os componentes diferiram apenas quantitativamente.

Recentemente, Echeverrigaray *et al.* (2001), estudando correlações químicas e genéticas de diversas cultivares comerciais de *T. vulgaris*, caracterizaram o timol como composto majoritário dos extratos dessa planta, com teores em torno de 41,96% a 50,47% em relação ao rendimento bruto do óleo essencial, e os compostos geraniol, linalol, terpineol, tujanol-4, terpinen-4-ol, carvacrol, 1,8-cineol, terpineno e *p*-cimeno. Dentre os compostos identificados, foram observadas alterações quantitativas significativas apenas para o terpineno (Figura 9), cujos teores em relação ao rendimento bruto do óleo variaram entre 11,4% a 22,28% nas diferentes cultivares.

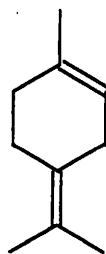


FIGURA 9: Estrutura química do terpineno

Trabalhos científicos com óleos essenciais de *Thymus* sp preconizam variações quantitativas dos constituintes, conforme a espécie e variedade e relacionam-nas com época da coleta, fotoperíodo e fatores geográficos (Saez,

1995a,b). Ao avaliar o rendimento de dezenove constituintes do óleo essencial de *T. vulgaris* em diferentes condições de luz, Li & Crecker (1996) concluíram que, em plantas cultivadas a 100% de luz solar plena, a concentração total (0,49% em relação à peso fresco) de óleo essencial foi mais alta e a maioria dos constituintes analisados diminuíram em concentração com o decréscimo de luz solar. O timol, composto majoritário do óleo essencial, aumentou seu teor em 10% sob luz solar plena.

Venkutonis (1997) comparou os rendimentos dos óleos essenciais de *Thymus vulgaris* e *Salvia officinalis* obtidos em diferentes condições: folhas frescas, congeladas e aquecidas a 30 °C e 60 °C. As perdas apresentaram-se significativas em temperatura de 60 °C, girando em torno de 43% e 31%, respectivamente, para *T. vulgaris* e *S. Offcinalis*.

Diversas atividades biológicas são atribuídas à *T. vulgaris* por causa do ao alto conteúdo de fenólicos vegetais. Economou *et al.* (1991), pesquisando a atividade biológica dos extratos metanólicos das ervas da família Lamiaceae, entre elas *T. vulgaris*, observaram forte atividade antioxidante; posteriormente, trabalhos realizados por Chipault *et al.*, citados por Matiucci (1998), com extratos etanólicos e etéreos, atribuíram-lhes as mesmas atividades.

Aktug & Karapinal, citados por Reddy *et al.*, (1998), avaliaram a atividade do extrato etanólico de *T. vulgaris* sobre duas espécies fúngicas, e concluíram que em concentrações de 500 µgmL⁻¹ e 1000 µgmL⁻¹ o extrato demonstrou forte atividade fungicida. Reddy *et al.* (1998) avaliaram a atividade fungicida dos óleos voláteis de dois clones de *T. vulgaris* ante a *Botrytis cinerea* e *Rhizopus solanifer*, encontrando inibições nas concentrações de 50, 100 e 200 ppm. Atribuíram a atividade observada ao alto teor de timol e carvacrol e ao efeito sinérgico do linalol.

Essawi & Srour (2000) estudaram a atividade antibacteriana das 15 plantas medicinais mais importantes na Palestina diante de oito bactérias. Todas

apresentaram atividade, sendo a maior delas registrada para extratos aquosos e orgânicos de *T. vulgaris* e *T. origanium* sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

2.3 Fitoquímica X

Dentro da química de produtos naturais, a fitoquímica se destaca pelas inúmeras pesquisas realizadas, nas quais vários metabólitos foram isolados e elucidados quanto às suas estruturas moleculares. A partir do século XIX, foram registrados os primeiros compostos isolados de plantas como morfina, quinina e cânfora (Figura 10), que se consagraram como princípios ativos úteis no tratamento de certas doenças. Atualmente, grande número de compostos derivados de plantas é utilizado nas formulações de remédios e em sínteses orgânicas, funcionando como protótipos de importantes agentes terapêuticos sintéticos.

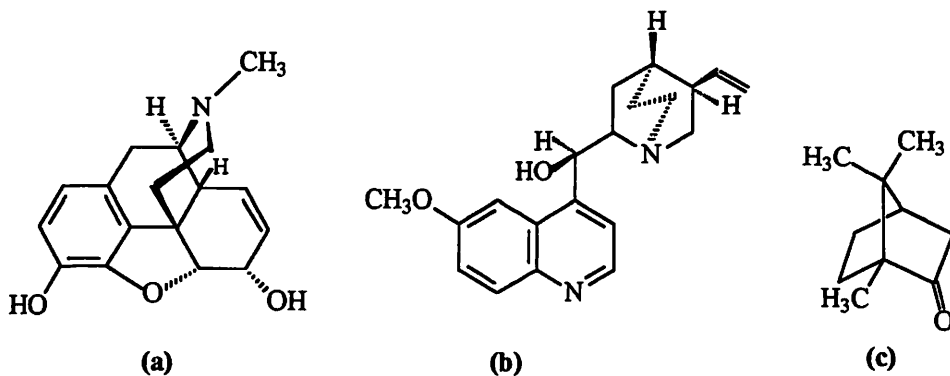


FIGURA 10: Estruturas químicas da (a) morfina, (b) quinina e (c) cânfora

Na pesquisa fitoquímica, as etapas principais são: seleção, identificação botânica e coleta do material vegetal, prospecção preliminar, fracionamento, isolamento e purificação dos compostos e, finalmente, a elucidação estrutural (Matos, 1998; Simões et al., 2000).

A seleção do material vegetal, bem como sua identificação botânica, são etapas de vital importância, pois estão condicionadas aos objetivos específicos do estudo e às variações existentes nos gêneros botânicos. A coleta depende de fatores intrínsecos à espécie vegetal, já que possuem reações diferentes diante das interferências ambientais (hora do dia e época do ano). A prospecção preliminar permite o conhecimento das classes metabólicas presentes e possibilita a adaptação da técnica de fracionamento e isolamento a ser utilizada.

Considerada uma das etapas mais trabalhosas em um estudo fitoquímico, o fracionamento, isolamento e purificação inicia-se com a preparação dos extratos vegetais, cujos métodos de extração dependem tanto da textura e teor de água no material, como do tipo de substância a ser isolada (Di Stasi, 1996).

A escolha dos solventes apropriados, bem como o método de extração a ser utilizado dependem tanto dos objetivos como dos resultados obtidos na prospecção preliminar. Segundo Matos (1998), dentre os métodos de extração, aquele obtido por percolação a frio é o mais adequado, pois evita reações químicas decorrentes da atuação simultânea de solventes e temperaturas altas.

No fracionamento do extrato vegetal, a técnica mais utilizada é a cromatografia, por ser um método eficiente e rápido de se obter separações e purificações dos componentes de uma mistura. Consiste basicamente na migração de uma fase móvel sobre uma fase fixa. Aquelas incluídas fundamentalmente em um fenômeno de adsorção e, consideradas mais simples dentre as técnicas cromatográficas, são: a cromatografia líquida de coluna (CLC) e a cromatografia de camada delgada (CCD). A primeira baseia-se no movimento descendente de uma fase móvel líquida sobre uma fase fixa sólida

sendo muito utilizada para semipurificação de extratos vegetais. A segunda consiste na migração diferencial dos componentes de uma mistura sobre uma camada de adsorvente retido em uma superfície plana. É uma técnica de fácil execução, baixo custo e alta reprodutibilidade, funcionando em análises qualitativas, pela determinação do índice de retenção (R_f) e, principalmente, em purificações das substâncias. Outras técnicas cromatográficas bastante utilizadas são: a cromatografia gasosa (CG) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), esta última recentemente em ascensão. Tais técnicas destacam-se por proporcionar análises qualitativas e quantitativas dos componentes de uma mistura com rapidez e eficiência (Shriner *et al.*, 1983; Soares *et al.*, 1988; Collins *et al.*, 1990).

A elucidação estrutural envolve várias etapas: análise elementar do composto isolado, ou seja, obtenção do conteúdo qualitativo (CHN-carbono, hidrogênio e nitrogênio) e quantitativo (composição centesimal) do composto, subsídios importantes para as etapas sucessivas; estudos dos espectros obtidos por espectrofotometria de ultravioleta (UV), espectrometria de infra-vermelho (IV), espectrometria de massa (EM), ressonância magnética de hidrogênio (RMN^1H) e de carbono 13 ($RMN^{13}C$) (Pavia *et al.*, 1996; Silvertein & Webster, 2000).

2.4 Patógenos fúngicos

Os fungos são organismos eucarióticos, aclorofilados (heterotróficos), portadores de esporos, que podendo reproduzir-se sexualmente (forma teleomórfica) ou assexuadamente (forma anamórfica). São bastante diversificados filogeneticamente e suas características sofrem grandes variações por causa das condições culturais e, portanto, não podem funcionar sozinhas na identificação da espécie, interrelacionando-se às condições ambientais e ao hospedeiro. São conhecidas aproximadamente 60.000 espécies de fungos, que se

diferenciam em muitos aspectos (físicos, químicos, fisiológicos, etc) (Resende & Castro, 1999).

Do ponto de vista econômico, os fungos apresentam aspectos positivos e negativos e são considerados de grande importância. Por um lado, são benéficos, utilizados pela indústria (fermentação), medicina (antibióticos) e, principalmente, responsáveis pela fertilidade do solo por meio das trocas que originam. Por outro lado, são maléficos, acarretando sérios prejuízos à agricultura. Estima-se que mais de 30% da produção agrícola mundial são perdidos anualmente em consequência de problemas fitossanitários, em que os fungos destacam-se por serem os principais agentes causadores de doenças em plantas (Bergamin Filho et al., 1995).

* Levantamentos epidemiológicos de uma região são de extrema importância, pois permitem a adoção de medidas de manejo e controle biológico adequadas. Alves *et al.* (1995) mapearam diversas enfermidades de plantas ocorridas na região de Lavras no período de 1990 a 1994 e concluíram que, das 1147 análises, os maiores agentes epidemiológicos foram os fungos (78,47%), seguidos de insetos (10,11%), bactérias (4,88%), ácaros (2,27%), vírus (1,83%) e nematóides (1,04%). Outros fatores, como problemas fisiológicos, deficiências minerais, fitotoxidez e outras causas também foram determinados, apresentando índice de incidência de 3,40%, 1,74%, 1,57% e 8,11%, respectivamente. Em paralelo, Lobo Junior *et al.* (1995) avaliaram as classes fúngicas envolvidas, determinando como mais representativas as classes Hyphomycetes (57,07%) e Coelomycetes (32,51%). Posteriormente, Pozza *et al.* (1999) reafirmaram os trabalhos anteriores, destacando os Deuteromicetos, os quais representaram 82,5% em incidência. Determinaram como agentes etiológicos fúngicos: *Fusarium* sp (12,1%), *Colletotrichum* sp (11,5%), *Alternaria* sp (7,6%), *Cercospora* sp (6,4%) e *Oidium* sp (5,8%), e os sintomas de maiores ocorrências: manchas foliares (48,9%), podridões (16,3%) e murchas (9,5%).

2.4.1 As espécies estudadas

O fungo *Colletotrichum gloeosporioides* é um patógeno deuteromiceto cujas colônias apresentam-se com coloração branca ou preta-acizentada, com produção de esporos de coloração alaranjada e formação de acérvulos com número reduzido de setas. Possui conídios hialinos unicelulares aglutinados por uma substância mucilaginosa. Na fase perfeita, ou seja, sexuada, corresponde ao fungo Ascomiceto *Glomerella cingulata* (Ston.) Spaul. Et Schr., da ordem *Sphaeriales*, família *Sphaeriaceae*.

Dentre as doenças causadas por *C. gloeosporioides*, a antracnose pós-colheita é a de maior incidência, atacando várias culturas como mamão, citrus, manga, abacate, morango, tomate, maçã, banana, etc. Essa doença é considerada a podridão mais comum em frutos maduros, sendo encontrada com bastante freqüência e com alto grau de severidade, inutilizando o produto para fins comerciais. O fruto atacado apresenta-se com pequenos pontos escuros sobre a superfície, que aumentam em tamanho com o decorrer do tempo. Nas bordas da lesão, forma-se um halo de tecido aquoso com coloração diferente da parte central da mancha, onde são formadas as estruturas do fungo, que exibem coloração alaranjada com consistência gelatinosa.

Bipolaris sorokiniana é um fungo patogênico do trigo e outras gramíneas, infectando sementes, folhas e raízes. Possui conídios curvos, elipsoidais ou fusiformes, de coloração escura, conidióforos não-ramificados e alta habilidade saprofítica. Na fase perfeita, corresponde ao fungo *Cochliobolus sativus* Ito E Kurib, um ascomiceto da ordem *Sphaeriales*, família *Sphaeriaceae*.

As doenças do trigo causadas por esse fungo, tais como a podridão das raízes e as manchas foliares (helminthosporioses), têm sido causas de perdas consideráveis no rendimento de produção e redução de proteínas nos grãos utilizados para farinhas, tornando-o o principal patógeno dessa cultura (Reis et

al., 1988). As sementes infectadas por esse fungo apresentam taxa de transmissão de 60 a 90%, sendo responsáveis por focos iniciais da doença em campo (Forcelini, 1991).

Utiamada & Nomura (1995) analisaram, na safra de 1992, 283 lotes de sementes de trigo quanto à incidência dos patógenos e concluíram que *B. sorokiniana* foi o principal agente etiológico, infectando 92,93% dos lotes. Na safra de 1993, dos 57 lotes analisados, todos foram infectados pelo mesmo fungo. A média de incidência foi de 3,40% em 1992 e 20,64% em 1993, demonstrando preocupação por parte dos agricultores.

Alternaria alternata é a espécie mais conhecida e freqüente do gênero *Alternaria* sp. O fungo apresenta conídios obclavados, ovóides ou elipsoidais, lisos ou verrugosos, com aproximadamente 8 septos transversais. Os conídios acham-se inseridos em conidióforos simples ou ramificados, subhialinos de coloração clara a oliva. O tamanho e a morfologia do conídio são influenciados pelas condições ambientais. É responsável por doenças como pinta-preta e alternarioses em várias solanáceas, plantas olerícolas que constituem importante fonte alimentar para a sociedade. Dentre elas, destacam-se comercialmente o tomate e a batata, o pimentão e beringela, entre outras (Rotem, 1994).

Esse fungo provoca lesões e crestamento foliar apenas em frutos injuriados, mostrando uma grande variabilidade quanto à patogenicidade, capacidade de esporulação e crescimento em diversas culturas. Bóveda (1986), pesquisando morfologia, patogenicidade e esporulação de *Alternaria solani* e *A. alternata*, concluiu que todos os isolados de *A. alternata* foram patogênicos, sendo os mais agressivos os isolados de tomateiro, batata, beringela e pimentão, apresentando grande incidência em todas as culturas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal

O material vegetal (400g de folhas frescas) foi coletado no Horto de Plantas Medicinais da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em maio de 2001, às 8 horas, sob temperatura de 21 °C e umidade relativa (UR) de 60%. A espécie encontrava-se em estágio vegetativo jovem e em solo submetido a freqüentes irrigações.

Uma exsicata da espécie, identificada como *Thymus vulgaris* L., foi incorporada ao acervo do Herbário ESAL (Herbário do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras - UFLA - MG), sob o registro de nº 17057.

3.2 Estudo fitoquímico

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Química Orgânica do Departamento de Química da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras-MG.

3.2.1 Prospecção fitoquímica

Uma amostra de 15 g de folhas de *T. vulgaris*, seca em estufa ventilada a 40 °C, foi refluxada em etanol durante 3 horas. Em seguida, filtrou-se em funil de Büchner e o filtrado foi concentrado em evaporador rotatório do tipo R-114 sob pressão reduzida. O extrato obtido foi levado à estufa para completa evaporação do solvente (Adaptado de Matos, 1998).

Posteriormente, realizaram-se 20 testes analíticos, específicos a cada classe de metabólitos, nos quais frações de 1mg do extrato obtido anteriormente

foram submetidas às reações de precipitação e/ou colorimétricas, segundo metodologia descrita por Matos (1998), utilizando-se os reagentes descritos na Tabela 1.

TABELA 1: Reagentes utilizados na identificação das classes de metabólitos presentes em folhas de *T. vulgaris*

Reagentes utilizados	Especificidade
Reativo de Pascová	Ácidos orgânicos
Reativo de Fehling	Açúcares redutores
Reativo Lugol	Polissacarídeos
Reativo de Molish	Proteínas e aminoácidos
Solução ácida de FeCl ₃ 1%	Taninos
Solução acidificada/magnésio	Flavonóides
HONH ₃ ⁺ Cl ⁻ 10% /KOH 10%/FeCl ₃ 1%	Lactonas e Sesquiterpenlactonas
Reativo de Kaiser	Azulenos
Ácido trifluoroacético	Carotenóides
Reação de Liebermann-Burchard	Esteróides e Triterpenóides
Éter/Metanol/FeCl ₃ 1%	Depsídeos e depsidonas
Éter/NaOH 1N/luz U.V.	Cumarinas
Solução de etanol 80%	Saponinas
Reativo de Bouchardat	Alcalóides
Reativo de Mayer	Alcalóides
Reativo de Dragendorff	Alcalóides
Reativo de Bertrand	Alcalóides
Reação de Bornträger	Antraquinonas
HCl 6N/H ₂ O ₂ 30%	Purinas
Vanilina 1% / HCl	Catequinas

Fonte: Matos, 1998.

3.2.2 Obtenção dos extratos vegetais brutos

Uma amostra de 291 g de folhas de *T. vulgaris*, seca em estufa de circulação mecânica sob temperatura de 40 °C durante 48 horas, foi submetida a sucessivas extrações a frio, com solventes de polaridade crescente (hexano, clorofórmio, acetato de etila, etanol e metanol). Foram utilizados 2 L de solvente e um período de 8 dias de imersão, por extração.

Após a primeira extração com hexano, procedeu-se à filtração a vácuo, obtendo-se, o filtrado, que foi concentrado em evaporador rotatório tipo Büchi R-114 sob pressão reduzida. A torta (resíduo vegetal) foi levada à estufa de circulação mecânica por 48 horas para completa evaporação do solvente e reutilizada para as próximas extrações com os solventes subseqüentes (Figura 11). Ao final das extrações, a torta foi descartada.

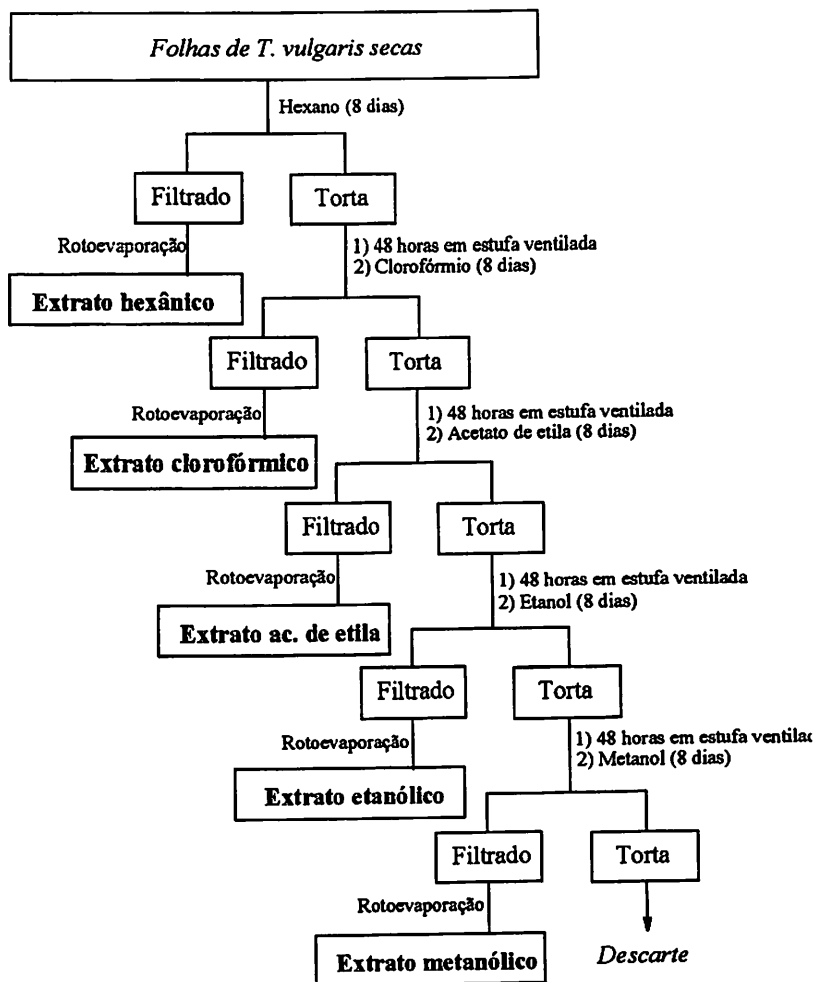


FIGURA 11: Fluxograma da extração utilizada na obtenção dos extratos brutos de *T. vulgaris*

3.2.3 Fracionamento e isolamento dos constituintes químicos

Os extratos etanólico e metanólico foram escolhidos por sua solubilidade em compostos polares, por seus possíveis conteúdos químicos de interesse

fungitóxico e por apresentarem melhor atividade biológica, segundo Di Stasi (1996).

As separações cromatográficas dos dois extratos ocorreram por meio de cromatografia líquida de coluna (CLC), utilizando-se colunas preparativas (50 cm de comprimento e 3 cm de diâmetro interno, recheadas com sílica gel 60, 70-230 mesh ASTM Merck®) com o sistema de eluentes clorofórmio, acetato de etila, propanol, etanol, metanol, ácido acético e água, previamente escolhidos por ensaios eluotrópicos. Os perfis cromatográficos foram obtidos por cromatografia de camada delgada (CCD), utilizando-se placas de 2,5 x 10 cm recobertas por sílica gel 60G Merck® e revelação em atmosfera de iodo.

Para obtenção dos melhores eluentes utilizados na coluna cromatográfica, miligramas dos extratos etanólico e metanólico foram solubilizados em 1 mL de etanol e metanol, respectivamente, e analisados por difusão concêntrica por CCD com os eluentes: hexano, éter de petróleo, ciclohexano, tetracloreto de carbono, benzeno, tolueno, diclorometano, clorofórmio, acetato de etila, etanol, metanol, ácido acético e água.

No fracionamento do extrato etanólico, 500 mg do extrato parcialmente solubilizados em 10 mL de clorofórmio foram adicionados à coluna cromatográfica e submetidos ao processo de eluição. Obtiveram-se 43 frações de 30 mL (Tabela 2). As frações obtidas pelo mesmo eluente foram reunidas e concentradas em evaporador rotatório tipo Büchi R-114 sob pressão reduzida. Essas, foram monitoradas por CCD e reunidas segundo mesmo perfil cromatográfico, resultando em 8 subfrações denominadas E₁, E₂, E₃, E₄, E₅, E₆, E₇ e E₈, correspondentes à reunião das frações clorofórmio, clorofórmio/acetato de etila, acetato de etila, acetato de etila/propanol + propanol + propanol/etanol, etanol + etanol/metanol + metanol, metanol/ác. acético, ác. acético + ác. acético/água e água, respectivamente (Figura 12). As frações eluídas em água foram reunidas e filtradas em decorrência de precipitação espontânea, obtendo-

se um resíduo branco e cristalino que foi, posteriormente, seco com pentóxido de fósforo em dessecador a vácuo por 8 dias. O composto isolado recebeu a denominação de X1.

TABELA 2: Seqüência de fracionamento do extrato etanólico por CLC

Nº de frações coletadas (30 mL)	Eluentes
09	Clorofórmio
01*	Clorofórmio/ac. de etila
03	Acetato de etila
01*	Ac. de etila/propanol
01	Propanol
01*	Propanol/etanol
03	Etanol
01*	Etanol/metanol
06	Metanol
01*	Metanol/ác. acético
09	Ácido acético
01*	Ác. acético/água
06	Água

* Frações intermediárias obtidas pelas proporções 3:1, 1:1 e 1:3.

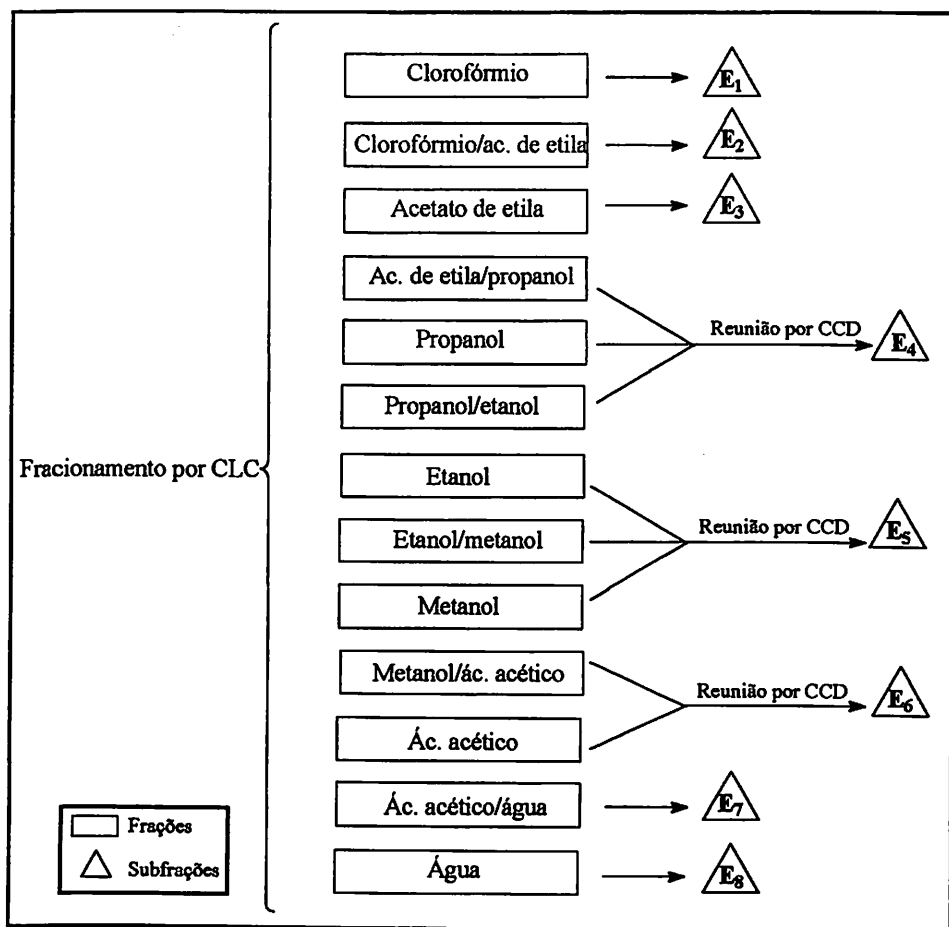


FIGURA 12: Subfrações obtidas pela reunião das frações por CCD do extrato etanólico

No fracionamento do extrato metanólico, foram utilizados 600 mg do extrato, resultando em 46 frações de 30 mL eluídas por CLC (Tabela 3). Assim como no extrato etanólico, as frações reunidas por eluição com água também sofreram precipitação e os mesmos processos de separação e secagem utilizados anteriormente foram aplicados para a obtenção do composto isolado Y1.

TABELA 3: Seqüência de fracionamento do extrato metanólico por CLC

Nº de frações coletadas (30 mL)	Eluentes
08	Clorofórmio
01*	Clorofórmio/ac. de etila
02	Acetato de etila
01*	Ac. de etila/propanol
01	Propanol
01*	Propanol/etanol
04	Etanol
01*	Etanol/metanol
09	Metanol
01*	Metanol/ ác. acético
09	Ácido acético
01*	Ác. acético/ água
07	Água

* Frações intermediárias obtidas pelas proporções 3:1, 1:1 e 1:3.

3.2.4 Caracterização e identificação dos compostos isolados

A caracterização dos isolados X1 e Y1 foi feita pelas propriedades físicas: solubilidade e ponto de fusão; esta última obtida pela média de 4 repetições, utilizando-se o método de Thiele.

Na identificação química, foi utilizada: a espectrometria de infravermelho (IV), cujos espectros foram obtidos em espectrômetro Shimadzu FTIR - 8201 A, utilizando-se como suporte pastilhas de KBr.

3.3 Óleo essencial

3.3.1 Extração e rendimento

O método de extração foi o arraste a vapor, utilizando-se o aparelho de Clevenger modificado (Craveiro, 1981). Folhas frescas de *T. vulgaris* (15 g), foram submetidas à extração durante 50 minutos, obtendo-se 150 mL de hidrolato, posteriormente particionado com diclorometano (3 x 50 mL) em funil de separação. A fase orgânica (óleo + diclorometano) foi mantida em repouso por 24 horas com MgSO₄ anidro. Após, foi filtrada e levada a um evaporador rotatório do tipo Büchi R-114 sob pressão reduzida. O óleo essencial obtido foi colocado em vidro previamente seco e tarado, mantido à temperatura ambiente e protegido da luz e umidade, até peso constante.

A metodologia acima descrita foi aplicada em paralelo, com folhas de *T. vulgaris* submetidas à secagem em estufa de circulação mecânica sob temperatura (40 °C) durante 48 horas. Em ambos os casos, foram realizadas três repetições.

3.3.2 Caracterização e identificação dos constituintes químicos

Para caracterização e identificação dos constituintes, foram realizadas análises em espectrômetro de IV Shimadzu FTIR - 8201A, utilizando-se como suporte janelas de NaCl.

3.4 Atividade fungitóxica

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Epidemiologia e Manejo do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

3.4.1 Crescimento e/ou inibição micelial

As culturas dos fungos foram obtidas da micoteca do Departamento de Fitopatologia e identificadas como *Colletotrichum gloeosporioides*, *Bipolaris sorokiniana* e *Alternaria alternata*. Foram utilizados, como meios de cultura, BDA (batata, dextrose e ágar) para os dois primeiros fitopatógenos e PCA (batata, cenoura e ágar) para o último.

O método utilizado foi o bioanalítico *in vitro*, por meio do qual avaliaram-se os efeitos do extratos etanólico e metanólico em diferentes concentrações sobre o crescimento e/ou inibição micelial das culturas fúngicas.

Em uma capela asséptica de fluxo laminar, foram adicionadas aos meios de cultura previamente esterilizados e fundidos alíquotas de soluções-mãe dos extratos etanólico e metanólico, de modo a obterem-se concentrações finais de 5, 50 e 500 ppm. Os meios foram vertidos em placas de Petri previamente esterilizadas e, em seguida, no centro de cada placa, foram colocados discos miceliais invertidos de 6 mm de diâmetro. As placas foram vedadas com filme plástico e incubadas em câmara de crescimento à temperatura de 22 ± 2 °C sob fotoperíodo de 12 horas luz e 12 horas escuro, durante 7 dias (Santos, 1996).

Os experimentos foram realizados utilizando-se os tratamentos: T₁ (Testemunha), T₂ (5 ppm), T₃ (50 ppm) e T₄ (500 ppm) para cada extrato. As avaliações foram realizadas após 48, 96 e 144 horas de sua montagem, por meio de medições diametralmente opostas do crescimento micelial, e de cada duas medidas opostas, foram calculadas as médias. O índice de crescimento micelial (ICM) ou taxa de crescimento micelial foi calculado pela fórmula modificada de Nakagava & Maguire, adaptada por Oliveira (1991).

$$ICM = \frac{C_1}{N_1} + \frac{C_2}{N_2} \Lambda + \frac{C_n}{N_n},$$

em que:

ICM = índice de crescimento micelial;

$C1, C2, Cn$ = crescimento micelial das colônias na primeira, segunda e última avaliação;

$N1, N2, Nn$ = número de dias.

3.4.2 Análise estatística

O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições, e esquema fatorial de $2 \times 4 \times 3$ envolvendo dois extratos vegetais, em quatro concentrações e três espécies de fungos. Os resultados obtidos foram submetidos às análises de variância e de regressão pelo sistema SAEG versão 5.0. Nesta última, foram testados os efeitos linear e quadrático do modelo polinomial $Y = a + b x + b_1 x^2$ e a raiz quadrada do modelo polinomial, ou seja, $Y = a + b x^{0.5} + b_1 x$. Foi selecionada, dentro de cada grupo de equações com o mesmo número de parâmetros estimados, aquela de efeito significativo pelo teste F a 5% de probabilidade, de significado biológico e de maior soma de quadrados, ou seja, maior R^2 . As médias do efeito qualitativo, ou seja, as espécies de fungos, foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade (Gomes, 1973; Banzatto & Kronka, 1989).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Estudo fitoquímico

4.1.1 Prospecção fitoquímica preliminar

Algumas reações colorimétricas apresentaram-se mascaradas, como a reação de ácidos orgânicos, em que o resultado esperado era a descoloração do reativo utilizado e, no entanto, esse tornou-se azul-intenso; ou, como a reação para catequinas, que resultou no aparecimento de uma coloração amarelo-intensa, e o esperado era vermelho. Em resumo, os testes analíticos mostraram-se imprecisos, possivelmente pelo fato de que o extrato utilizado, sendo bruto, conteria diferentes constituintes químicos, os quais possivelmente interfeririam no resultado final das reações.

Desse modo, supõe-se que existam 13 classes químicas de metabólitos secundários reconhecidas pelos testes analíticos realizados, sendo elas: ácidos orgânicos, açúcares redutores, proteínas e aminoácidos, taninos, flavonóides, catequinas, lactonas e sesquiterpenlactonas, azulenos, carotenóides, esteróides e triterpenóides, depsídeos e depsidonas, saponinas, antraquinonas e purinas. Todas as classes reconhecidas já haviam sido citadas na literatura como compostos presentes em *Thymus* sp (Guillén & Manzanos, 1998; Zgórka & Glowniak, 2001; Karaman *et al.*, 2001)

4.1.2 Obtenção dos extratos vegetais brutos

A amostra vegetal utilizada (291g) apresentou, após o período de secagem, decréscimo em peso de 42,16%, representando perdas de água. Segundo Hertwing (1991), a espécie *T. vulgaris* pode apresentar teores de água

que podem chegar a atingir de 66%, sugerindo, portanto, que o processo de secagem possa ter sido incompleto. No entanto, esse percentual apresenta-se variável em função das condições climáticas e edáficas às quais a espécie estaria submetida.

Os rendimentos dos extratos brutos foram calculados em função da massa relativa e são apresentados na Tabela 4.

TABELA 4: Rendimentos dos extratos brutos obtidos por percolação a frio de folhas secas de *T. vulgaris*

Extratos brutos	Massa (g)	Teor (%)
Hexânico	1,78	1,06
Clorofórmico	6,14	3,65
Acetato de etila	2,90	1,72
Etanólico	2,92	1,73
Metanólico	5,55	3,30
Extrativos totais	19,29	11,46

Analisando os dados da tabela anterior, observa-se que os teores dos extratos clorofórmico e metanólico foram os mais altos (em torno de 100% a mais em relação aos outros extratos). De acordo com Simões *et al.* (2000), as classes de metabólitos que podem estar presentes no extrato clorofórmico são os óleos essenciais, glicosídeos, flavonóides, cumarinas simples e antraquinonas e, no extrato metanólico, heterosídeos, saponinas e taninos, extraídos por afinidade polar ao solvente utilizado. De fato, não só a literatura, como também os resultados do levantamento químico preliminar, descreveram a presença desses

compostos como constituintes vegetais de *T. vulgaris*, podendo, portanto, ocorrer em maiores proporções, justificando percentuais mais altos.

4.1.3 Caracterização e identificação dos compostos isolados

Os compostos X1 e Y1, isolados dos extratos etanólico e metanólico, respectivamente, apresentaram solubilidade decrescente em relação ao aumento de polaridade dos solventes orgânicos usuais. Apresentaram pontos de decomposição de valores $287,5 \pm 10$ °C e 263 ± 10 °C, respectivamente. As massas dos compostos X1 e Y1 obtidas foram 0,0851g e 0,0631g, representando, em rendimento, 17,2% e 10,51%, respectivamente.

Os espectros no infravermelho dos compostos X1 e Y1 foram similares (Figuras 13 e 14), apresentando as seguintes absorções: duas bandas pequenas em 3550 cm^{-1} e 3404 cm^{-1} , equivalentes aos estiramentos assimétricos e simétricos de ligações N–H, de amins primárias, confirmadas pela presença de um pico agudo e intenso em 1622 cm^{-1} , proveniente de vibrações de deformação angular da ligação N–H e dois picos, em 669 cm^{-1} e 601 cm^{-1} , equivalentes a deformações fora do plano dessa ligação.

A presença de um pico em $1683,7\text{ cm}^{-1}$ situado na região de absorções de estiramentos de grupos carbonílicos (C=O) infere a possibilidade das absorções anteriormente citadas pertencerem a amidas, sendo os picos $1683,7$ e $1622,6\text{ cm}^{-1}$ referentes às absorções da banda amida I (estiramento de C=O) e banda amida II (deformação de N–H), respectivamente. Entretanto, a absorção do grupo carbonílico é pouco pronunciada. A ausência de bandas de absorção de grupos metílicos (CH₃), metilênicos (CH₂) e metínicos (CH) em $3000\text{-}2950\text{ cm}^{-1}$, a presença de banda larga entre 1350 e 1200 cm^{-1} e a afinidade polar com a água inferem a possibilidade de os compostos X1 e Y1 serem polifuncionais ou sais de amins (Ingham & Henson, 1984).

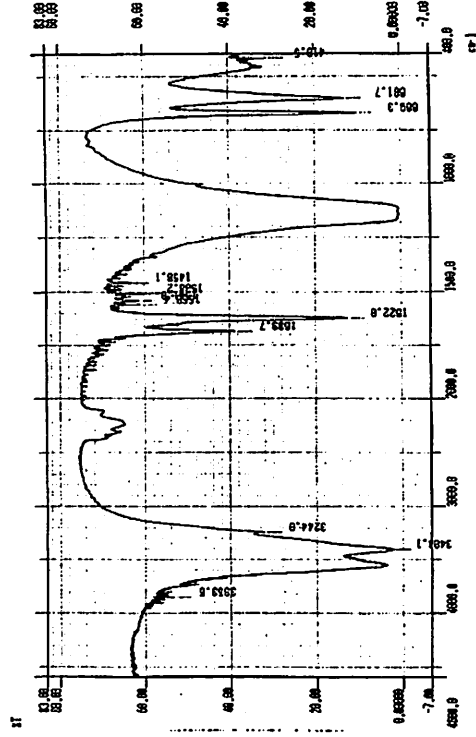


FIGURA 13: Espectro no infravermelho do composto X1 obtido pelo fracionamento do extrato etanólico de *T. vulgaris* em coluna cromatográfica

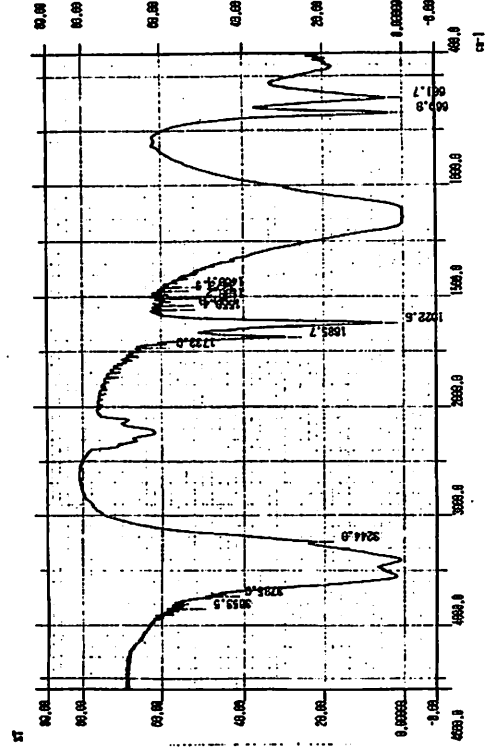


FIGURA 14: Espectro no infravermelho do composto Y1 obtido pelo fracionamento do extrato metanólico de *T. vulgaris* em coluna cromatográfica

4.2 Óleo essencial

4.2.1 Rendimento

As farmacopéias preconizam teor mínimo de óleo essencial de *T. vulgaris* em torno de 1,5% (Simões *et al.*, 2000). Foram observados rendimentos do óleo essencial muito menores do que aqueles citados na literatura, podendo atribuir essas variações a diferenças de épocas da colheita, clima da região ou tipo de solo. Um fato importante a ser considerado, e que pode auxiliar na justificativa dos resultados, é que a espécie encontrava-se em solo submetido a irrigações freqüentes e que, o aumento de água reduz drasticamente a produção de óleo essencial (Corrêa Júnior, 1994). Pela Tabela 5 verificaram-se os rendimentos médios obtidos e que mostraram-se variáveis em função das condições a que foram submetidas as amostras.

TABELA 5: Rendimentos do óleo essencial de folhas de *T. vulgaris* sob diferentes condições

Amostra	Fresca		Estufa, 40 °C	
	Massa (g)	Teor (%)	Massa (g)	Teor (%)
Ot1	0,0559	0,37	0,0445	0,30
Ot2	0,0611	0,41	0,0407	0,26
Ot3	0,0529	0,35	0,0413	0,27
Média	0,0566	0,38	0,0421	0,28

Analisando os dados apresentados na Tabela 5, observa-se que o rendimento do óleo essencial de folhas secas na estufa foi 26% inferior ao óleo obtido de folhas frescas. Sabin *et al.* (1999), em trabalhos desenvolvidos com

Melissa officinalis L. (erva-cidreira), pertencente à família Lamiaceae, obtiveram rendimento do óleo essencial de folhas secas menor do que de folhas verdes. No entanto, mostraram a necessidade de mais estudos, em períodos mais longos do que aquele utilizado para análises, e em épocas diferentes.

Em princípio, conclui-se que a secagem em estufa é desfavorável para o rendimento do óleo essencial dessa espécie. No entanto, estudos mais abrangentes, que relacionem fisiologia, tratos culturais, condições climáticas, etc, poderiam gerar melhores discussões e inferir afirmações em relação ao melhor rendimento do óleo.

4.2.2 Identificação química

Os óleos essenciais obtidos de todas as extrações apresentaram coloração amarelada e os espectros no infravermelho apresentaram bandas de absorção idênticas (Figura 15). Estas foram identificadas como:

- uma banda larga compreendida entre $3600 - 3250 \text{ cm}^{-1}$, característica de estiramentos assimétricos e simétricos da ligação O-H;
- pico pouco intenso em torno de 3030 cm^{-1} , característico de ligações sp^2 de hidrogênios de natureza aromática;
- bandas de absorção intensas compreendidas entre $2968-2869 \text{ cm}^{-1}$, características de estiramentos assimétricos e simétricos que evidenciam a presença de ligações de caráter sp^3 para grupos metílicos (CH_3), metilênicos (CH_2) e metínicos (CH), podendo ser confirmados pela presença de um dubleto pouco pronunciado em 1380 e 1360 cm^{-1} , equivalente a sinais de deformação angular desses grupos e que propõem a presença de ramificações alquílias;

- picos em 1618 cm^{-1} e 1585 cm^{-1} , equivalentes aos estiramentos assimétricos e simétricos de ligações $\text{C}=\text{C}$ do anel aromático e confirmados pela presença de picos intensos em 945 e 808 cm^{-1} relativos à deformação angular fora do plano das ligações C-H adjacentes, inferindo que possam existir substituições nas posições 1,2,4 do anel;
- pico intenso em 1290 cm^{-1} característico de absorção de ligações C-O , observadas em fenóis.

Guenther, citado por Craveiro *et al.* (1981), preconizam teor de fenólicos totais presentes no óleo essencial de *T. vulgaris* entre 42,5% e 59,0%, levando-se à conclusão de que as absorções descritas acima indicam que os dados do espectro podem referir-se à presença de timol e carvacrol (Figura 8), compostos fenólicos descritos pela literatura como constituintes majoritários.

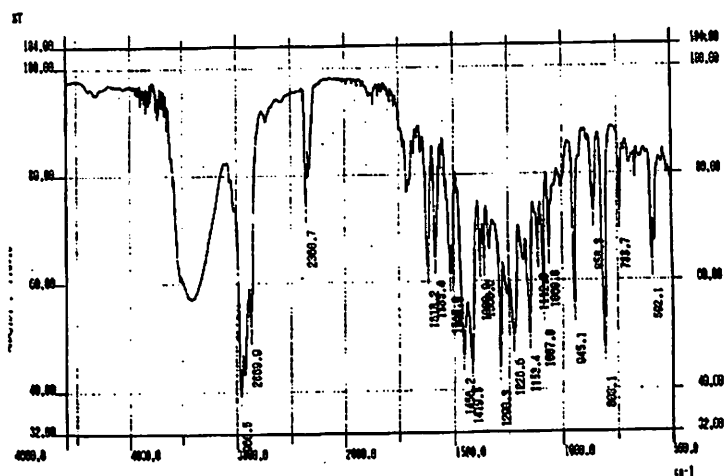


FIGURA 15: Espectro no infravermelho do óleo essencial obtido de folhas de *T. vulgaris*

4.3 Atividade fungitóxica

4.3.1 Crescimento e/ou inibição micelial das espécies fúngicas estudadas

Os índices de crescimento micelial de *B. sorokiniana*, *A. alternata*, *C. gloeosporioides*, referentes aos tratamentos, T₁ (Testemunha - 0 ppm), T₂ (extrato - 5 ppm), T₃ (extrato - 50 ppm) e T₄ (extrato - 500 ppm) de dois extratos vegetais (etanólico e metanólico), foram calculados e submetidos à análise estatística, a qual revelou diferenças altamente significativas entre os extratos, os tratamentos e as espécies fúngicas, assim como interações significativas.

Pelos dados da Tabela 6, observa-se que entre as espécies fúngicas estudadas, a *A. alternata* apresentou crescimento micelial significativamente menor quando submetida aos extratos etanólico e metanólico, à concentração de

5 ppm. As culturas fúngicas de *B. sorokiniana* apresentaram crescimento micelial significativamente maior naquela concentração.

TABELA 6: Resultados médios de quatro repetições do Índice de Crescimento Micelial (ICM) de três espécies fúngicas submetidas a quatro concentrações e dois extratos vegetais

Extratos	Concentração (ppm)	ICM (cm)		
		<i>B. sorokiniana</i>	<i>A. alternata</i>	<i>C. gloeosporioides</i>
Etanólico	0	4,48 a	3,55 c	3,91 b
	5	4,37 a	3,45 c	3,63 b
	50	4,14 a	3,40 b	3,29 c
	500	2,34 c	3,01 a	2,58 b
Metanólico	0	4,48 a	3,55 c	3,91 b
	5	4,48 a	3,34 c	3,69 b
	50	4,42 a	3,35 c	3,51 b
	500	2,38 c	3,21 a	2,99 b

** Médias seguidas com a mesma letra minúscula em cada linha não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Na concentração de 50 ppm, observa-se uma inversão da eficiência dos extratos quanto ao crescimento das colônias de *C. gloeosporioides* e *A. alternata*. No extrato etanólico, o crescimento micelial de *C. gloeosporioides* foi significativamente menor do que o de *A. alternata*, ao passo que no extrato metanólico ocorreu o contrário. Entre as espécies fúngicas estudadas, *B. sorokiniana* apresentou, nessa concentração, crescimento micelial significativamente maior.

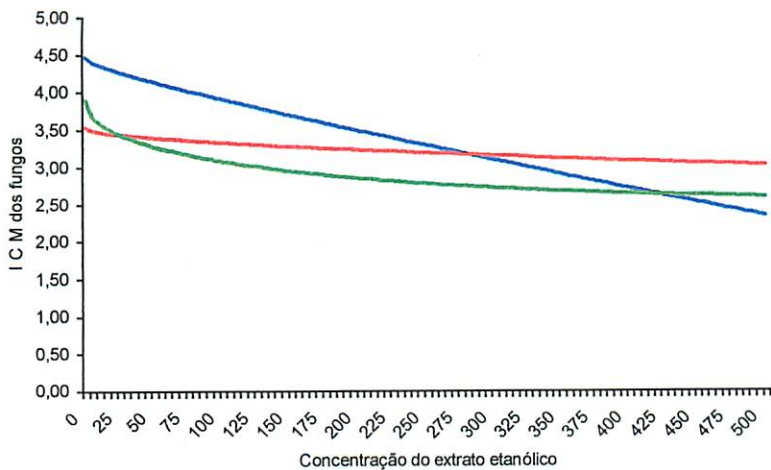
À concentração de 500 ppm, as colônias fúngicas apresentaram comportamentos similares quando submetidas aos dois extratos. Entretanto,

observa-se uma inversão nos valores de crescimento das colônias dos três fungos estudados. Nessa concentração, o crescimento micelial de *Bipolaris sorokiniana* foi significativamente menor do que o de *C. gloeosporioides*, havendo crescimento significativamente maior de *A. alternata*.

A maior atividade inibitória foi observada na concentração de 500 ppm (T₄) para ambos extratos. O extrato etanólico apresentou maior atividade nessa concentração, com taxas percentuais de redução de crescimento da ordem de 47,76%, 15,21% e 34,01%, em relação à testemunha, respectivamente, para *B. sorokiniana*, *A. alternata* e *C. gloeosporioides*. No caso do extrato metanólico, essas mesmas reduções foram de 46,87%, 9,57% e 23,53%.

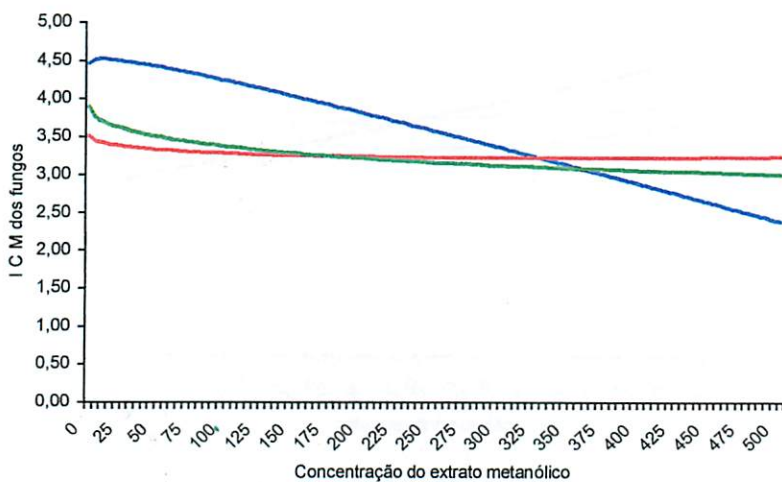
Por meio das Figuras 16 e 17, explica-se, por diferentes equações de regressão, a progressão da inibição micelial das culturas fúngicas submetidas aos diferentes tratamentos. Com exceção de *A. alternata*, submetida ao extrato metanólico, as espécies fúngicas apresentaram equações com coeficientes de determinação (R^2) acima de 99% para ambos os extratos, mostrando alta correlação entre a taxa de crescimento dos fungos e as concentrações dos extratos. Observa-se que o aumento das concentrações dos extratos etanólico e metanólico provocaram sensíveis reduções na taxa de crescimento micelial das colônias fúngicas, e a espécie *B. sorokiniana* apresentou maior sensibilidade ao aumento das concentrações do extrato etanólico. O mesmo não foi observado para *A. alternata*, que apesar de apresentar atividade inibitória significativa, demonstrou comportamento visivelmente semelhante diante do aumento da concentração dos extratos.

As Figuras 18 e 19 ilustram os bioensaios realizados com os extratos etanólicos e metanólicos sobre as espécies fúngicas estudadas.



—	<i>B. sorokiniana</i>	$\hat{Y} = 4,46 - 0,02418 C^{0,5} - 0,00317 C$	$R^2 = 0,999$
—	<i>A. alternata</i>	$\hat{Y} = 3,53 - 0,01049 C^{0,5} - 0,00023 C$	$R^2 = 1,000$
—	<i>C. gloeosporioides</i>	$\hat{Y} = 3,88 - 0,10049 C^{0,5} + 0,00189 C$	$R^2 = 0,998$

FIGURA 16: Efeito das concentrações do extrato etanólico obtido de folhas de *T. vulgaris* no Índice de Crescimento Micelial (ICM), em cm, dos fungos *B. sorokiniana*, *C. gloeosporioides* e *A. alternata*



<p>— <i>B. sorokiniana</i></p> <p>— <i>A. alternata</i></p> <p>— <i>C. gloeosporioides</i></p>	<p>$\hat{Y} = 4,46 + 0,03316 C^{0,5} - 0,00565 C \quad R^2 = 1,000$</p> <p>$\hat{Y} = 3,50 - 0,03183 C^{0,5} + 0,00087 C \quad R^2 = 0,771$</p> <p>$\hat{Y} = 3,88 - 0,06225 C^{0,5} + 0,00102 C \quad R^2 = 0,990$</p>
--	--

FIGURA 17: Efeito das concentrações do extrato metanólico obtido de folhas de *T. vulgaris* no Índice de Crescimento Micelial (ICM), em cm, dos fungos *B. sorokiniana*, *C. gloeosporioides* e *A. alternata*

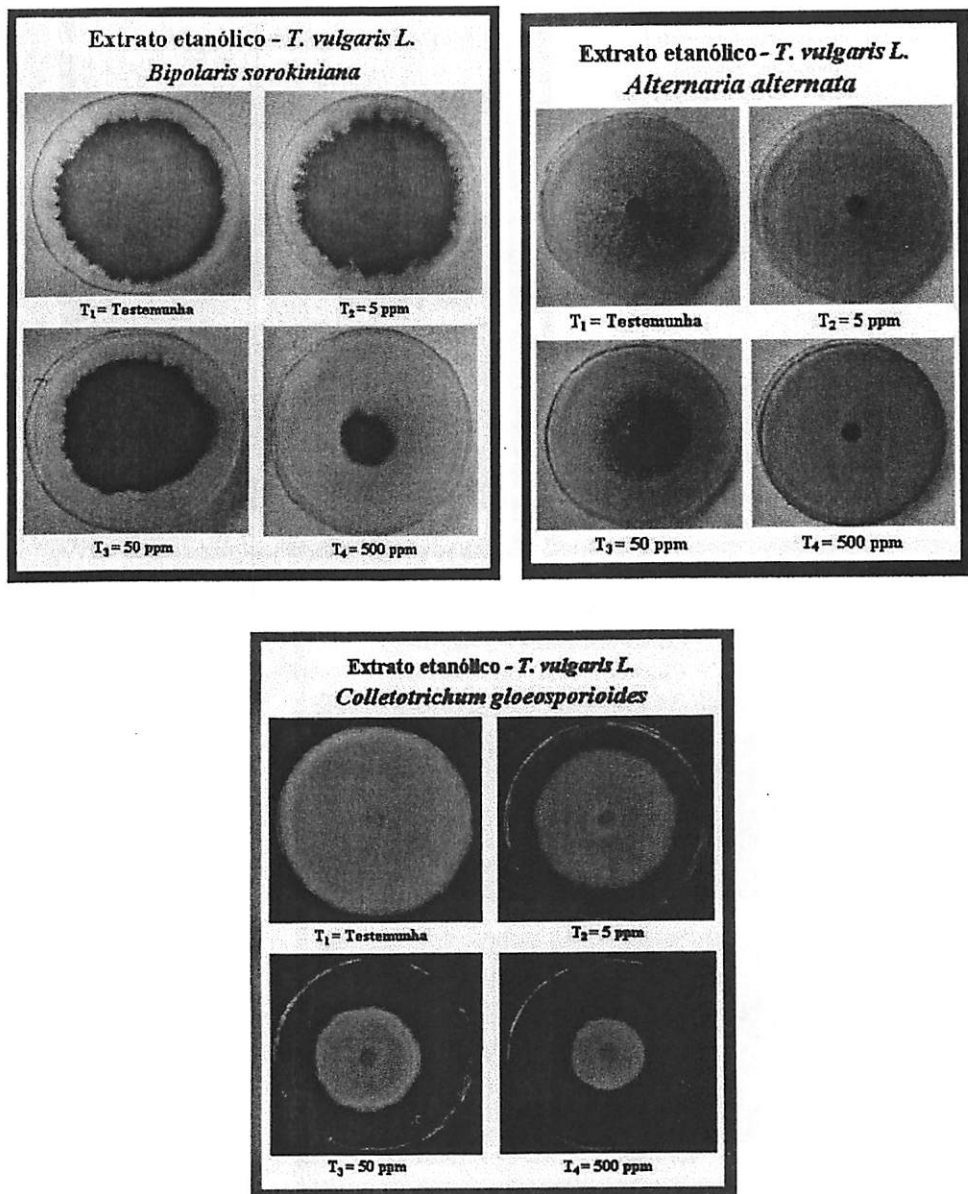


FIGURA 18: Bioensaios realizados com extrato etanólico obtido de folhas de *T. vulgaris* sobre o crescimento e/ou inibição micelial dos fungos *B. sorokiniana*, *A. alternata* e *C. gloeosporioides*

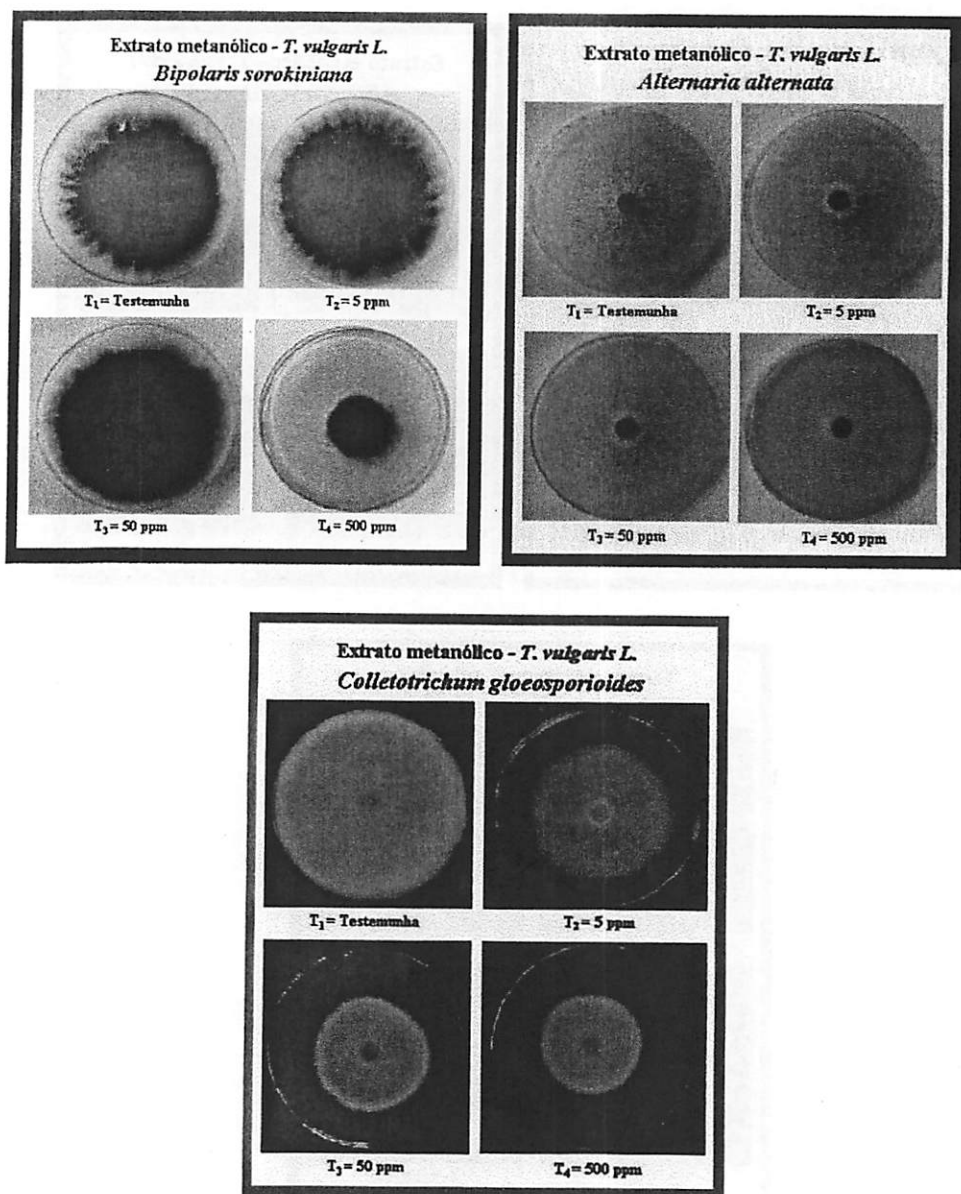


FIGURA 19: Bioensaios realizados com extrato metanólico obtido de folhas de *T. vulgaris* sobre o crescimento e/ou inibição micelial dos fungos *B. sorokiniana*, *A. alternata* e *C. gloeosporioides*

5 CONCLUSÕES

Pelas análises dos espectros no IV dos compostos isolados X1 e Y1, pode-se inferir a possibilidade de tratar-se de compostos similares amínicos.

O rendimento médio do óleo essencial das folhas frescas mostrou-se superior ao das folhas submetidas à secagem, cujos valores foram 0,38% e 0,28%, respectivamente. O dados do espectro no IV do óleo essencial podem referir-se à presença dos compostos majoritários, timol e carvacrol, descritos na literatura.

As concentrações de 5, 50 e 500 ppm, dos extratos etanólico e metanólico, não controlaram totalmente o crescimento das colônias fúngicas, mas apresentaram atividade fungitóxica significativa. Na concentração de 500 ppm dos extratos etanólico e metanólico, a maior inibição das colônias fúngicas ocorreu para *B. sorokiniana*, sendo o extrato etanólico mais efetivo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

*ADZET, T.; GRANGER, R.; PASSET, J.; SAN MARTIN, R. Le polymorphisme chimique dans le genre *Thymus*: as signification taxonomique. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 5, n. 2, p. 269-272, 1977.

ALVES, E.; GIANASI, L.; NAVES, R. de L.; LOBO JÚNIOR, M.; SAITO, G. M.; SOUZA, P. E. Incidência de doenças e pragas registradas pela clínica fitossanitária da UFLA, no período entre 1990 a 1994. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 20, p. 280-280, ago. 1995. Suplemento.

BANZATTO, D. A.; KRONKA, S. do N. **Experimentação agrícola**. Jaboticabal: FUNEP, 1989. 247p.

BASTOS, C. N. Efeito fungitoxico do óleo de *Piper enckea* sobre *Crinipellis perniciosa* e *Phytophthora palmirosa* *in vitro*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, p. 417-417, ago. 2001. Suplemento.

BASTOS, C. N.; ALBURQUERQUE, P. S. B. Fungitoxidade do óleo essencial de *Piper aduncun* contra *Colletotrichum musae* *in vitro* e *in vivo*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, p. 416-416, ago. 2001. Suplemento.

BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v. 1, 919p.

BERNARDO R.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; CRUZ, M. E. S.; PASCHOLATI, S. F. Fungitoxidade de alguns óleos essenciais contra fungos fitopatogênicos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 23, p. 227-227, ago. 1998. Suplemento.

BERNARDO R.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, FIORI, A. C. G. Efeito de extratos cítricos na indução de resistência e no crescimento micelial de fungos fitopatogênicos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, p. 313-313, ago. 2001. Suplemento.

BLANCO, M. C. S. G.; MING, L. C.; MARQUES, M. O. M.; BOVI, A. Influência da temperatura de secagem no teor e na composição química do óleo essencial de alecrim. In: 40º CONGRESSO IBERO-AMERICANO SOBRE UTILIZAÇÃO DE PLÁSTICO NA AGRICULTURA, 2.; SIMPÓSIO

LATINO-AMERICANO DE PRODUÇÃO DE PLANTAS MEDICINAIS, AROMÁTICAS E CONDIMENTARES, 1., 2000, São Pedro, SP. *Horticultura Brasileira*. Brasília: SOB/FCAV-UNESP, 2000. v. 18, p.903-905. Suplemento jul.

BLANCO, M. C. S. G.; MING, L. C.; MARQUES, M. O. M.; BOVI, O. A. Influência da temperatura de secagem no teor e na composição química do óleo essencial de menta. In: 40º CONGRESSO IBERO-AMERICANO SOBRE UTILIZAÇÃO DE PLÁSTICO NA AGRICULTURA, 2.; SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE PRODUÇÃO DE PLANTAS MEDICINAIS, AROMÁTICAS E CONDIMENTARES, 1., 2000, São Pedro, SP. *Horticultura Brasileira*. Brasília: SOB/FCAV-UNESP, 2000. v. 18, p.96-109. Suplemento jul.

*BLUM, C.; KUBECZKA, K-H.; BECKER, K. Supercritical fluid chromatography – mass spectrometry of thyme extracts (*Thymus vulgaris* L.) *Journal of Chromatography A*, Amsterdam, v. 773, n. 1/2, p. 377-380, June 1997.

BÓVEDA, R. R. V. *Morfologia, patogenicidade, esporulação e sensibilidade a fungicidas in vitro de alternaria solani (ELL E MART.) JONES E GROUT E alternaria alternata (FR.) KEISSLER de solanáceas.* 1986. 106p. Dissertação (Mestrado em agronomia: Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”/USP, Piracicaba, SP.

BREMNESS, L. *Plantas aromáticas: culinárias, medicinais e cosméticas.* Lisboa: Editora Civilização, 1993. 240p.

BROUCKE, C. O. van der; DOMMISSE, R. A.; ESMANS, E. L.; LEMLI, J. A. Three methylated flavones from *Thymus vulgaris*. *Phytochemistry*, Oxford, v. 21. n. 10. p. 2581-2583, Oct. 1982.

CARDOSO, M. G.; GAVILANES, M. L.; MARQUES, M. C. S.; SHAN, A. Y. K. V.; SANTOS, B. R.; OLIVEIRA, A. C. B. de; BERTOLUCCI, S. K. V.; PINTO, A. P. S. *Óleos essenciais.* Lavras: UFLA/PROEX, 2000. 42p. Boletim Técnico.

CASTRO, L. O.; CHEMALE, V. M. *Plantas medicinais condimentares e aromáticas: descrição e cultivo.* Guaíba: Agropecuária, 1995. 196p.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. *Introdução a métodos cromatográficos.* 4. ed. Campinas: UNICAMP, 1990. 279p.

CORRÊA JR, C.; LIN, C. M.; SHEFFER, M. C. A importância do cultivo de plantas medicinais, aromáticas e condimentares. **SOB informa**, Itajaí, v. 9, n. 2, p. 23-24, 1991.

CORREA JR, C.; LIN, C. M.; SCHEFFER, M. C. **Cultivo de plantas medicinais, condimentares e aromáticas**. Jaboticabal, São Paulo: Editora FUNEP, 1994

COSTA, A.F. **Farmacognosia**. 2. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1972.

CRAVEIRO, A. A.; FERNANDES, A. G.; ANDRADE, C. H. S.; MATOS, F. J. de A.; ALENCAR, J. W.; MACHADO, M. I. L. **Óleos essenciais de plantas do Nordeste**. Fortaleza: Edições UFC, 1981. 210p.

CRUZ, M. E. da S.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; NUNES, E. da S.; SUZUKI, F. F.; ORITA, M. N. Avaliação *in vivo* de extratos aquosos de *Rosmarinus officinalis*, *Ocimum basilicum*, *Mentha piperita* e *Origanum vulgare* sobre o fungo *Sclerotium rolfsii* em feijoeiro. In: III anuário do CCA. Portaria 020/99-CCA. **Anuário 1999/2000**. ISS 1518-7586.

D'ANDRÉA PINTO, A. J. Histórico da associação brasileira de pesquisas sobre plantas aromáticas e óleos essenciais. In: **SIMPÓSIO DE ÓLEOS ESSENCIAIS**, 1., 1988, Campinas. **Anais....** Campinas: IAC, 1988. p.5-9.

DELGADO, D.; CASTILLO, P. Pautas para la implantación de huertos orgánicos en áreas marginales. **Agroforestería en las Américas**, Turrialba, v. 3, n. 9/10, p. 17-23, jul./oct. 1996.

DI STASI, L.C. **Plantas medicinais: arte e ciência - um guia de estudo interdisciplinar**. São Paulo: FUNEP-botucatu, 1996. 231p.

ECHEVERRIGARAY, S.; AGOSTINI, G.; ATTI-SERFINI, L.; PAROUL, N.; PAULETTI, G. F.; SANTOS, A. C. A. dos. Correlation between the chemical and genetic relationships among commercial Thyme cultivars. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 49, n. 9, p. 4220-4223, Sept. 2001.

ECONOMOU, K. D.; OREOPOULOU, V.; THOMOPOULOS, C. D. Antioxidant activity of some plant extracts of the family Labiatae. **Journal of the American Oil Chemistry Society**, Champaign, v. 68, n. 2, p. 109-113, Feb. 1991.

ESSAWI, T.; SROUR, M. Screening of some Palestinian medicinal plantas for antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, Oxford, v. 70, n. 3, p. 343-349, June 2000.

FORCELINI, C. A. Trigo: a importância do tratamento de sementes. *Correio Agropecuário*, São Paulo, v. 1, n. 1, p. 2-5, 1991.

FURLAN, M. R. Ervas e temperos: cultivo e comercialização. Cuiabá: SEBRAE, 1998. 128p. Coleção Agroindústria, v. 15.

*GRANGER, R.; PASSET, J. *Thymus vulgaris* spontane de France: races chimiques e chemotaxonomie. *Phytochemistry*, Oxford, v. 12, n. 7, p. 1683-1691, July 1973.

GOMES, F. P. Estatística experimental. 5. ed. Piracicaba: Nobel, 1973. 467p.

GUILLÉN, M. D.; MANZANOS, M. J. Study of the composition of the differents parts of a Spanish *T. vulgaris* L. plant. *Food Chemistry*, Oxford, v. 63, n. 3, p. 373-383, Nov. 1998.

HERTWIG, I. F. Von. Plantas medicinais e aromáticas: plantio, colheita, secagem e comercialização. 2. ed. São Paulo: Ícone, 1991. 414p.

INGHAM, A. M.; HENSON, R. C. Interpreting infrared and nuclear magnetic resonance spectra of simple organic compounds for the beginner. *Journal of Chemical Education*, Washington, v. 61, n. 8, p. 704-707, 1984.


ITO, C. S.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; CRUZ, M. E. S.; BERNARDO, R.; COSTA, E. Atividade fungitóxica do extrato bruto de *Baccharis trimera*. In: III anuário do CCA. Portaria 020/99-CCA. Anuário 1999/2000. ISS 1578-7586.

KARAMAN, S.; DIGRAK, M.; RANID, U.; ILCIM, A. Antibacterial and antifungal activity of the essential oils of *T. revolutus* Celak from Turkey. *Journal of ethnopharmacology*, v. 76, p. 183-186, 2001.

LAVABRE, M. Aromaterapia. Rio de Janeiro: Record, 1990. 172p.

*LI, Y.; CRECKER, E. Effect of light level on essential oil production of sage (*Salvia officinalis*) and Thyme (*Thymus vulgaris*). *Acta Horticulturae*, Amsterdam, p. 419-426, 1996.

LOBO JUNIOR, M.; SAITO, G.M.; GIANASI, L.; ALVES, E.; NAVES, R. de L.; SOUZA, P. E.; CARDOSO, M. A. F. C. Fungos fitopatogênicos identificados na clínica fitossanitária da Universidade Federal de Lavras-MG, entre os anos de 1990 a 1994. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 20, p. 329-329, ago. 1995. Suplemento.

 MARTINS, E. R.; CASTRO, D. M.; CASTELLANI, D. C.; DIAS, J. E. *Plantas medicinais*. Viçosa, MG: UFV, 1995. 220p. ←

MATIUCCI, C. A. R. *Atividade antioxidante in vitro em plantas com propriedades medicinais*. 1998. 106p. Dissertação (Mestrado em Ciências dos alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

MATOS, F. J. A. *Introdução à fitoquímica experimental*. Fortaleza: UFC, 1988. 128p.

MOTA, J. C. O.; PESSOA, M. N. G.; VIANA, F. M. P. Efeito de extratos e óleo essenciais de plantas medicinais no controle de *Lasiodiplodia theobromae* "in vitro". *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 26, p. 400, ago. 2001. Suplemento.

OLIVEIRA, J. A. *Efeito de tratamento fungicida em sementes e no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativas* L.) e pimentão (*Capsicum anannum* L.)*. 1991. 111p. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) - Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras, MG.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. *Introduction to spectroscopy*. 2. ed. Washington: Saunders College, 1996. 511p.

✂ PINTO, J. E. B. P.; LAMEIRA, O. L.; SANTIAGO, E. J. A. de; SILVA, F. G. *Cultivo de plantas medicinais, aromáticas e condimentares*. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 222p.

POZZA, E. A.; SOUZA, P. E. de; CASTRO, H. A. de; POZZA, A. A. A. *Frequência da ocorrência de doenças da parte aérea de plantas na região de Lavras – MG. Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 23, n. 4, p. 1001-1005, out./dez. 1999.

REDDY, M. V. B.; ANGERS, P.; GOSSELIN, A.; ARUL, J. *Characterization and use of essential oil from *T. vulgaris* against *Botrytis cinerea* and *Rhizopus solonifer**. *Phytochemistry*, Oxford, v. 47, n. 8, p. 1515-1520, Aug. 1998.

REIS, E. M.; FERNANDES, J. M. C.; PICININI, E. C. **Estratégia para o controle de doenças do trigo**. Passo fundo: EMBRAPA-CNPT, 1988. 50p. EMBRAPA-CNPT. Documentos, 7.

RESENDE, M. L. V.; CASTRO, H. A. de. **Manejo de doenças fúngicas**. Lavras: Editora UFLA/FAEPE, 1999. 65p.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Farmacognosia e farmacotecnologia**. São Paulo: Premier, 1997. 372p.

RÖSCH, P.; POPP, J.; KIEFER, W. Raman and surface enhanced Raman spectroscopic investigation on Lamiaceae plants. **Journal of Molecular Structure**, Amsterdam, v. 481, p. 121-124, May 1999.

ROTEM, J. **The genus alternaria: biology, epidemiology and pathogenicity**. Minnesota. Minnesota: The american phytopathological society press, 1994. 326p.

SABIN, G. P.; KIST, L. T.; MORAES, J. L. A. de. Extração do óleo essencial da espécie *Melissa officinalis* L.: avaliação do rendimento e da qualidade. **Revista Tecno-lógica**, Santa Cruz do Sul, v. 3, n. 1, p. 9-27, jan./jun. 1999.

SÁEZ, F. Essential oil variability of *Thymus hyemalis* growing wild in Southeastern Spain. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 23, n. 4, p. 431-438, nov. 1995a.

★ SÁEZ, F. Essential oil variability of *T. zygis* growing wild in Southeastern Spain. **Phytochemistry**, Oxford, v. 40, n. 3, p. 819-825, Mar. 1995b.

▶ SAITO, M. L.; SCRAMIN, S. **Plantas aromáticas e seu uso na agricultura**. Jaguariúna: EMBRAPA, 2000. 48p. Embrapa meio ambiente. Documentos, 20.

▶ SANTOS, M.M.F.B. dos. **Efeito de extratos de duas formas de *Lippia alba* sobre o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (PENZ.), isolado de *Citrus* sp.** 1996. 105p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP.

SHRINER, R. L.; FUSON, R. C.; CURTIN, D. Y.; MORRIL, T. C. **Identificação sistemática dos compostos orgânicos: manual de laboratório**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara dois, 1983. 520p.

SILVA, F. O.; SILVA, M. G. V.; MACHADO, M. I. L.; MATOS, F. J de A. **Variação na composição química do óleo essencial das folhas de *Ocimum***


micrathum Willd. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 26., 2000, Recife. Resumos... Recife: UFPE, 2000. p.142-142.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2000. 460p.

SIMÕES, C. M. O.; SHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 2. ed. rev. Porto Alegre/ Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2000. 821p.

SOARES, B. G.; SOUZA, N. A. de; PIRES, D.X. Química orgânica: teoria e técnicas de preparação, purificação e identificação de compostos orgânicos. Rio de Janeiro: Guanabara, 1988. 322p.

UTIAMADA, C. M.; NOMURA, S. L. Incidência de *Helminthosporium sativum*, *Pyricularia grisea* e *Fusarium graminearum* em sementes de trigo (*Triticum aestivum*) no estado do Paraná, nas safras de 1992 e 1993. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 20, p. 349-349, ago. 1995. Suplemento.

 VALARINI, P. J.; FRIGHETTO, R. T. S.; SPADOTTO, C. A. Potencial da erva medicinal (*Cymbopogon citratus*) no controle de fitopatógenos do feijoeiro e plantas daninhas em áreas irrigadas. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 20, p. 303-303, ago. 1995. Suplemento.

VENSKUTONIS, P.R. Effect of drying on the volatile constituents of Thyme (*Thymus vulgaris* L.) and sage (*Salvia officinalis* L.). *Food Chemistry*, Oxford, v. 59, n. 2, p. 219-227, June 1997.

WINK, M. Physiology of secundar product formation in plants. In: CHARWOOD, B.; RHODES, M. J. C. Secondary products from plant tissue culture. Oxford: Clarendon Press, 1990. p.23-42.

ZGÓRKA, G.; GLOWNIAK, K. Variation of free phenolic acids in medicinal plants belonging to the Lamiaceae family. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Oxford, v. 26, n. 1, p. 79-87, Aug. 2001.

ANEXOS A

TABELA 1A - Resumo da análise de variância dos resultados do crescimento micelial de três gêneros de fungos submetidos a quatro concentrações de dois extratos egeais..... 56

TABELA 2A - Porcentagem de inibição micelial de *B. sorokiniana*, *A. alternata* e *C. gloeosporioides* submetidos a quatro concentrações (0, 5, 50 e 500 ppm) e dois extratos vegetais..... 56

TABELA 3A - Resumo das análises de variância e da regressão dos resultados do Índice de Crescimento Micelial (ICM), em cm, de três gêneros de fungos submetidos a quatro concentrações de dois extratos vegetais..... 57

TABELA 1A - Resumo da análise de variância dos resultados do crescimento micelial de três gêneros de fungos submetidos a quatro concentrações de dois extratos vegetais

F. V.	G. L.	ICM
Extratos (EXT)	1	0,222416**
Concentrações (CO)	3	7,342003**
Fungos (FU)	2	2,570595**
EXT X CO	3	0,068036**
EXT X FU	2	0,053718**
CO X FU	6	1,580069**
EXT X CO X FU	6	0,035169**
Resíduo	72	0,002489
C. V. %		1,40

** significativo a 1% de probabilidade pelo teste F.

TABELA 2A: Porcentagem de inibição micelial de *B. sorokiniana*, *A. alternata* e *C. gloeosporioides* submetidos a quatro concentrações (0, 5, 50 e 500 ppm) e dois extratos vegetais

Extratos	Concentração (ppm)	% ICM		
		<i>B. sorokiniana</i>	<i>A. alternata</i>	<i>C. gloeosporioides</i>
Etanólico	5	2,45	2,81	7,16
	50	7,59	4,22	15,85
	500	47,76	15,21	34,01
Metanólico	5	0	5,91	5,62
	50	1,34	5,63	10,23
	500	46,87	9,57	23,53

TABELA 3A - Resumo das análises de variância e da regressão dos resultados do Índice de Crescimento Micelial (ICM), em cm, de três gêneros de fungos submetidos a quatro concentrações de dois extratos vegetais

F. V.	G. L.	ICM	R ²
Ext. etanólico			
Concentrações/ <i>Bipolaris</i> sp	3	4,06**	
Raiz Modelo Polinomial			
Raiz quadrada	1	11,87**	0,975
Linear	1	0,30**	0,999
desvio	1	0,01 *	
Modelo Polinomial			
Linear	1	12,14**	0,997
Quadrático	1	0,02**	0,999
Desvio	1	0,02**	
Concentrações/ <i>Alternaria</i> sp	3	0,23**	
Raiz Modelo Polinomial			
Raiz quadrada	1	0,68**	0,987
Linear	1	0,01 *	1,000
desvio	1	0,00	
Modelo Polinomial			
Linear	1	0,66**	0,964
Quadrático	1	0,01 *	0,978
Desvio	1	0,02**	
Concentrações/ <i>Colletotrichum</i> sp	3	1,32**	
Raiz Modelo Polinomial			
Raiz quadrada	1	3,83**	0,971
Linear	1	0,11**	0,998
desvio	1	0,02**	
Modelo Polinomial			
Linear	1	3,42**	0,865
Quadrático	1	0,43**	0,975
Desvio	1	0,11**	
Ext. metanólico			
Concentrações/ <i>Bipolaris</i> sp	3	4,34**	
Raiz Modelo Polinomial			
Raiz quadrada	1	12,07**	0,926
Linear	1	0,95**	1,000
desvio	1	0,00	
Modelo Polinomial			

Continua...

TABELA 3A, Cont

Linear	1	12,97**	0,995
Quadrático	1	0,06**	1,000
Desvio	1	0,00	
Concentrações/ <i>Alternaria</i> sp	3	0,08**	
Raiz Modelo Polinomial			
Raiz quadrada	1	0,16**	0,674
Linear	1	0,02**	0,771
desvio	1	0,06**	
Modelo Polinomial			
Linear	1	0,13**	0,547
Quadrático	1	0,02**	0,639
Desvio	1	0,09**	
Concentrações/ <i>Colletotrichum</i> sp	3	0,61**	
Raiz Modelo Polinomial			
Raiz quadrada	1	1,79**	0,974
Linear	1	0,03**	0,990
desvio	1	0,01 *	
Modelo Polinomial			
Linear	1	1,62**	0,882
Quadrático	1	0,15**	0,962
Desvio	1	0,06**	
Ext. etanólico			
Fungos/Concentração 0	2	0,8737**	
Fungos/Concentração 5	2	0,9449**	
Fungos/Concentração 50	2	0,8634**	
Fungos/Concentração 500	2	0,4587**	
Ext. metanólico			
Fungos/Concentração 0	2	0,8737**	
Fungos/Concentração 5	2	1,3588**	
Fungos/Concentração 50	2	1,3397**	
Fungos/Concentração 500	2	0,7571**	
Resíduo	72	0,002489	