

Bioatividade de plantas medicinais no controle de *Sclerotinia* isolado de *Stevia rebaudiana* (Bert.) Berton

Diniz, S.P.S.S.^{1,2}; Utumi, H.¹; Bonzanini, F.¹; Bueno, M.S.³

¹ Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais, Departamento de Bioquímica da Universidade Estadual de Maringá – UEM – Av. Colombo 5790 – CEP 87020-900- Maringá – PR. E-mail: dnz1210@hotmail.com. ² Pós-doutorando – Departamento de Botânica da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Rubião Júnior – CEP 18618-000 – Botucatu – SP. ³ Mestrando – Departamento de Botânica da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Rubião Júnior – CEP 18618-000 – Botucatu – SP.

RESUMO: O microorganismo *Sclerotinia* foi isolado de raízes de *Stevia rebaudiana* (Bert.) Berton em plantações na região noroeste do Paraná; e submetido ao cultivo na presença de extratos e bálsamos vegetais de Estragão (*Artemisia dracunculoides*), Tomilho (*Thymus vulgaris*), Manjerona (*Origanum majorana*), Menta citrata (*Mentha piperita* var. *Citrata*), Manjerição roxo (*Ocimum basilicum* L.), Andiroba (*Carapa guianensis*) e Copaíba (*Copaifera reticulata* Ducke). Os cinco primeiros óleos foram extraídos por arraste a vapor, após secagem do vegetal em estufa com circulação de ar, a 45° C, enquanto os dois últimos, foram usados *in natura*. A cada placa foi adicionado 100ml de uma suspensão de fungos previamente cultivada. Os resultados mostram que após 7 dias de incubação os óleos de tomilho (10ml), manjerição roxo (25ml), manjerona (25ml), menta citrata (50ml), estragão (50ml), foram capazes de inibir o crescimento de *Sclerotinia*, enquanto que o óleo de andiroba só alcançou este resultado com 200ml. O óleo de copaíba, mesmo na concentração de 500ml, foi incapaz de inibir o crescimento do fungo.

Palavras-Chave: Defensivos naturais, óleos essenciais, atividade antimicrobiana, plantas medicinais

ABSTRACT: Bioactivity of medicinal plants in the control of isolated *Sclerotinia* of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Berton. The microorganism *Sclerotinia* was isolated from roots of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Berton in plantations in the northwest of Paraná and submitted to the cultivation in the presence of extracts and vegetable balsams of Tarragon (*Artemisia dracunculoides*), Thyme (*Thymus vulgaris*), Manjerona (*Origanum majorana*), Mint citrata (*Mentha piperita* var. *citrata*), Purple Basil (*Ocimum basilicum* L.), Andiroba (*Carapa guianensis*) and Copaíba (*Copaifera reticulata* Ducke). The first five oils were extracted by steam drags, after the drying of the vegetable in greenhouse with circulation of air at 45°C. The last two were used *in natura*. A suspension (100il) of fungus previously cultivated, was added to each plate. The results show that after 7 days of incubation the thyme oils 10il, purple basil 25il, manjerona 25il, mint citrata 50il, tarragon 50il were capable to inhibit the growth of *Sclerotinia*, while the andiroba oil only reached this result with 200il. The copaiba balsam, even in the concentration of 500il, was unable to inhibit the growth of the microorganism.

Key words: Natural defensives, essential oils, anti-microbial activity, medicinal plants.

INTRODUÇÃO

A pesquisa fitopatológica visando o controle da população de fungos e outros microorganismos, principalmente aqueles que provocam danos à agricultura, através do emprego de óleos, bálsamos e extratos vegetais, tem tido um considerável incremento nos últimos anos (Chalfoun & Carvalho, 1987; Bastos, 1997). Os fungos *Sclerotinia*

sclerotiorum e *S. minor*, estão amplamente distribuídos em todo o mundo, com pelo menos 408 espécies de plantas hospedeiras (Boland & Hall, 1994). O controle desses patógenos em diversas culturas tem sido dificultado, devido à capacidade dos mesmos em formar estruturas de resistência (escleródios), que garantem a sobrevivência destes por vários anos, mesmo em condições adversas

Recebido para publicação em 05/12/2002

Aceito para publicação em 14/02/2005

(Ferraz *et al.*, 2003). Estes fungos são responsáveis pelo murchamento das folhas e podridão dos tecidos vegetais infectados (Pereira *et al.*, 1996).

A *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni (Asteraceae), é uma planta semi-arbustiva, com aproximadamente um metro de altura, originária do Paraguai, é intensamente cultivada na região noroeste do Paraná (Lewis, 1992), sendo esta espécie uma dos 154 membros do gênero *Stevia* (Soejarto *et al.*, 1983). Atualmente, a produção de estêvia está centrada na China, tendo o Japão como mercado majoritário para consumo (Kingham & Soejarto, 1985).

A *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni foi à única espécie desse gênero, na qual foram identificados princípios adoçantes (Yao *et al.*, 1999). Os principais edulcorantes presentes nas folhas de estêvia são o esteviosídeo e rebaudiosídeo A, os quais apresentam dulçor entre 300 e 450 vezes mais que a sacarose (Swanson *et al.*, 1992). Segundo Tateo *et al.* (1999), o esteviosídeo é o componente edulcorante de maior teor encontrado nas folhas de estêvia (5 a 15% em peso seco), seguido do rebaudiosídeo A (3 a 6% em peso seco). O esteviosídeo é um diterpenoide tetracíclico, sendo um adoçante não calórico com elevado poder de dulçor. Atualmente, tem sido empregado largamente na indústria de alimentos dietéticos artificiais (Bespalkov & Hattori, 1997).

O plantio de estêvia (*Stevia rebaudiana*, Bert.), tem tido seu crescimento nos últimos 5 anos intensificado na região noroeste do Paraná, principalmente nas regiões de Maringá e Marialva. Foi isolado de raízes desta planta em cultivo comercial, o microorganismo *Sclerotinia minor* (identificado pelo Laboratório de Culturas Tropicais da Fundação André Tosello, Campinas, SP). Este trabalho teve por objetivo avaliar o controle de *Sclerotinia minor* por extratos de estragão (*Artemisia dracunculoides*), tomilho (*Thymus vulgaris*), manjerona (*Origanum majorana*), menta-citrata (*Mentha piperita* var. Citrata), manjerição roxo (*Ocimum basilicum* L.); óleo de andiroba (*Carapa guianensis*) e bálsamo de copaíba (*Copaifera reticulata* Ducke).

MATERIAL E MÉTODO

1. Meio de cultivo dos microorganismos

O meio de cultivo utilizado possuía a seguinte composição, expressa em gramas/litro: 30g de farinha de aveia, 10g de sacarose, 16g de ágar. O meio de cultivo e todas as vidrarias empregadas foram autoclavadas.

2. Isolamento do Microorganismo

Foram usadas plantas de estêvia (*Stevia rebaudiana*, Bert.) com 10 meses de plantio, procedentes da área experimental do NEPRON (Núcleo de Estudos em Produtos Naturais da UEM),

Marialva, PR. As raízes destas plantas, variedade 308-A da coleção do NEPRON, foram colhidas, cortadas em frações de 1,5 cm e distribuídas em meio de cultivo aveia sólido, suplementado com estreptomicina (200mg/litro). Após 5 dias de incubação, as colônias isoladas foram purificadas no mesmo meio, até a obtenção de uma colônia pura e com crescimento característico.

3. Obtenção dos Óleos

A exceção dos bálsamos de copaíba e andiroba que foram usados *in natura*, os demais foram extraídos por arraste a vapor, após secagem da parte aérea do vegetal, em estufa com circulação de ar a 45°C (marca: Fanen) e moídas em moinho tipo faca (marca: Tecnal Te-340). Sendo os óleos essenciais extraídos por arraste a vapor, em extrator (marca: Fisatom). O rendimento do processo extrativo para 100 gramas de matéria seca, foi de 1,4 ml de óleo de tomilho; 0,9 ml de óleo de estragão; 1,6 ml de óleo de manjerição roxo; 1,5 ml de óleo de manjerona e 4,1 ml de óleo de menta citrata. A matéria seca continha aproximadamente 6% de umidade.

4. Ensaio Microbiológico

Foi realizado em placas de Petri (60x15 mm), contendo meio aveia adicionada do respectivo óleo ou bálsamo em estudo, nas concentrações de 100 a 500 mL por 10 ml de meio de cultivo. Estes óleos e bálsamos foram agregados ao meio ainda fundente para permitir uma distribuição homogênea destes extratos. A cada placa foi adicionado um disco de papel (1cm de diâmetro) contendo 50 mL de suspensão do fungo *Sclerotinia minor* previamente cultivada. A incubação foi realizada a 28°C (+ 1°C) em estufa microbiológica (marca: Fanen), durante 7 dias. O controle do experimento foi realizado com o uso do fungicida pentacloronitrobenzeno (3000ppm), nome comercial kobutol. A determinação da inibição do crescimento do fungo foi realizada pela média de 5 repetições para cada tratamento, através dos valores de PIC (Percentual de Inibição do Crescimento Micelial), método descrito por Edginton *et al.* (1971), cuja fórmula é a seguinte:

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

RESULTADO E DISCUSSÃO

Os resultados apresentados na Tabela 1 mostram que após 7 dias de incubação os óleos apresentaram capacidade inibitória de crescimento de *Sclerotinia minor* na seguinte ordem: tomilho (10mL), manjerição roxo (25mL), manjerona (25mL), estragão (50mL), menta-citrata (50mL) e andiroba (200mL). O bálsamo de copaíba (500mL), foi incapaz de inibir o crescimento deste fungo.

TABELA 1 – Dose Inibitória do crescimento de *Sclerotinia minor* por óleos vegetais

Óleos	Dose mínima inibitória (μ L/10ml de meio) ao nível de 100% de inibição
Tomilho	10
Manjerição Roxo	25
Manjerona	25
Menta Citrata	50
Estragão	50
Andiroba	200
Copaíba	Não inibiu o crescimento
Controle ¹	Não inibiu o crescimento
Controle ² (Meio + fungicida)	750

Controle 1 – Meio padrão para crescimento

Controle 2 – Fungicida= Kobutol (3000ppm)

A atividade antifúngica registrada neste trabalho é resultante da presença de óleos essenciais na composição dos extratos de tomilho, estragão, manjerição roxo, majerona e menta citrata (Charai *et al.*, 1996). Os óleos essenciais de timol, carvacrol, mentol, anetol, estragol, chavicol, metil-chavicol estão presentes em concentrações significativas nestes extratos vegetais (Passino *et al.*, 1999.). Andiroba e copaiba são óleos ou bálsamos naturais que possuem em sua composição o copaeno, cariofileno, α -cariofileno e outros isômeros de natureza sesquiterpênica (Stanshenko *et al.*, 1995; Veiga Jr. *et al.*, 1997; Diniz *et al.*, 2002). Resultados similares do controle de diversos fitopatógenos através do uso de óleos e extratos vegetais têm sido reportado por autores como Bolkan & Ribeiro (1981) em *Alternaria zinniae*; Chalfoun & Carvalho (1987) em *Macrophomina phaseolina* e por Bastos (1997) em *Giberella zeae*.

CONCLUSÃO

Os dados aqui apresentados mostram que todos os óleos testados apresentaram capacidade inibitória sobre o desenvolvimento de *Sclerotinia minor*, fungo este, isolado de raízes de *Stevia rebaudiana*. Nestes estudos realizados *in vitro*, verificou-se que o grau de inibição promovida por estes óleos variava em função da concentração testada. O bálsamo de copaíba foi incapaz de inibir o desenvolvimento do microorganismo. O potencial destes extratos e óleos como fungicidas alternativos ao uso de fungicidas químicos deve continuar sendo investigado.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- BASTOS, C.N. Efeito do óleo de *Piper aduncum* sobre *Crinipelis perniciosus* e outros fungos fitopatogênicos. **Fitopatologia Brasileira** v. 22, n. 3, p. 441-3, 1997.
- BESPALHOK, J.C.; HATTORI, K. Embryogenic callus formation and histological studies from *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni floret explants. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 9, n. 3, p. 185-8, 1997.
- BOLAND, G.J.; HALL, R. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 16, p. 93-108, 1994.
- BOLKAN, H.A.; RIBEIRO, W.R.C. Efeito do extrato de alho em *Cylindrocladium clivatum*, *Fusarium moniliforme* var. *Subglutinans* e *Rhizoctonia solani*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 6, p.565-6, 1981. (Resumo).
- CHALFOUN, S.M.; CARVALHO, V.D. Efeito do extrato de óleo industrial de alho sobre o desenvolvimento de fungos. **Fitopatologia Brasileira**, v. 12, p. 234-5, 1987.
- CHARAI, M.; MOSADDAK, M.; FAID, M. Chemical composition and antimicrobial activities of two aromatic plants: *Origanum majorana* L. and *O. compactum* Benth. **Journal Essential Oil Research**, v. 8, n. 6, p. 657-64, 1996.
- DINIZ, S.P.S.S.; BONZANINI, F.; BUENO, M.A.S., *et al.* Efeito do bálsamo de copaíba (*Copaifera reticulata* Ducke) sobre a germinação de esporos de *Fusarium*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais** v. 5, n. 1, p. 60-2, 2002.
- EDGINTON, L.V.; KNEW, K.L.; BARRON, G.L. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. **Phytopathology**, v. 62, p. 42-4, 1971.
- FERRAZ, L.C.L.; BERGAMIN-FILHO, A.; AMORIM, L., *et al.* Viabilidade de *Sclerotinia sclerotiorum* após a solarização do solo na presença de cobertura morta. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, p. 17-26, 2003.
- KINGHORN, N.D.; SOEJARTO, D.D. Current status of stevioside as a sweetening agent for human use. In: WAGNER, H.; HIKINO, H.; FARNSNORTH, N.R. **Economic and medicinal plant research**. London: Academic Press, 1985, v. 1, p. 1-52.
- LEWIS, W.H. Early uses of *Stevia rebaudiana* (Asteraceae) leaves as a sweetener in Paraguay. **Economic Botany**, v. 46, n. 3, p. 336-7, 1992.
- PASSINO, G.S.; BAZZONI, E.; MORETTI, M.D.L., *et al.* Effects of essential oil formulation on *Ceratitis capitata* Wiede. Adult flies. **Journal Applied**

- entomology**, v. 123, n. 3, p. 145-9, 1999.
- PEREIRA, J.C.R.; ZAMBOLIM, L.; MATSUOKA, K., *et al.* Controle integrado de *Sclerotinia sclerotiorum*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 21, p. 254-60, 1996.
- SOEJARTO, D.D.; COMPADRE, C.M.; MEDON, P.J., *et al.* Potential sweetening agents of plant origin. II. Field search for sweet-tasting *Stevia* species. **Economic Botany** v. 37, p. 71-9, 1983.
- STANSHENKO, E.; WIAME, H.; DASSY, S., *et al.* Catalytic transformation of Copaiba (*Copaifera officinalis*) oil over zeolite ZSM-5. **Journal of High Resolution Chromatography**, v. 18, p. 54-8, 1995.
- SWANSON, S.M.; MAHADY, G.B.; CHRISTOPHER, W.W. Stevioside biosynthesis by callus, root, shoot and rooted-shoot cultures in vitro. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 28, n. 2, p. 151-7, 1992.
- TATEO, F.; SANCHEZ, M.L.E.; BONONI, M., Stevioside content of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni grown in east Paraguay. **Italian Journal of Food Science**, v. 11, n. 3, p. 265-9, 1999.
- VEIGA JR., V.F.; PATITUCCI, M.L.; PINTO, A.C. Controle de autenticidade de óleos de copaíba comerciais por cromatografia gasosa de alta resolução. **Química Nova**, v. 20, n. 6, p. 612-5, 1997.
- YAO, Y.; BAN, M.; BRANDLE, J. A genetic linkage map for *Stevia rebaudiana*. **Genome**, v. 42, n. 4, p. 657-61, 1999.